UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE

Place de l'activation microgliale associée à la dégénérescence des neurones dopaminergiques provoquée par la 6-OHDA chez le rat. Implication dans la compréhension de la pathogénie de la maladie de Parkinson.

THÈSE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale : CHIMIE-BIOLOGIE
Discipline : Sciences de la vie
Spécialité : Neurosciences

Présentée
et soutenue publiquement par

Vincent HENRY

le 25 septembre 2008, devant le jury ci-dessous :

Président	**Dr Michel Mallat,** INSERM U711, Paris
Rapporteurs	**Pr Mohamed Jaber,** CNRS UMR 6187, Poitiers **Pr Miquel Vila,** ICREA, Barcelona
Examinateur	**Dr Stéphane Hunot,** INSERM U679, Paris **Dr Michel Neunlist,** INSERM U913, Nantes

Directeur de thèse : Pr Philippe DAMIER

Abréviations

^{11}C CFT : Carbon-11-labeled 2-carbomethoxy-3 [4-flurophenyl] tropane
6-OHDA : Hydroxy-6-dopamine ou 6-hydroxydopamine (anglosaxon)
α-syn : α-synucléine
Ac.-YVAD-cmk : Acétyle-tyrosine-valine-alanine-aspartate-chloromethylketone
Ac-DEVD-CHO : Acétyle-aspartate-glutamate-valine-aspartate-aldéhyde
ADN : Acide désoxyribonucléïque
AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien
AM : Acide malonique
Apaf-1 : Apoptotic protease-activating factor 1
ARN : Acide ribonucléïque
ATP : Adénosine tri-phosphate
ATV : Aire tegmentale ventrale
BDNF : Brain-derived neurotrophic factor
bFGF : Basic fibroblast grouth factor
BHE : Barrière hématoencéphalique
CA : Catécholamine ou Catécholaminergique
CD4 : Cluster de différentiation 4
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
CSF (G- ou M-) : Colony stimulating factor (granulocyte ou macrophage)
DA : Dopamine ou dopaminergique
DAB : Diaminobenzidine
DAT : Transporteur de la dopamine
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 : Glodus pallidus interne
GPx : Glutathion peroxydase
GSSG : Glutathion oxidé
GT1b: Trisialogangliosid-1b
H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène
HBSS : Hank's Balanced Salt Solution
HPRT : Hypoxanthine Phosphoribosyl transferase
ICAM-1 : Intercellular adhesion molecule 1
IFNγ : Interféron gamma
IgG : Immunogloguline G
Il1β : Interleukine 1 béta
iNOS : Inducible nitric oxyde synthase
KO : Knock out
LCA : Leukocyte common antigen
LCR : Liquide céphalo-rachidien
L-DOPA : Lévodopa
L-NAME : N^{ω}-nitro-L-arginine methyl ester

LT : Lymphocyte T
MAF : Macrophage arming factor
MAIs : Mouvements anormaux involontaires
MAO_B : Monoamine oxydase B
MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1
MIP-1 : Macrophage inflammatory protein-1
MMP : Matrix metalloprotease
MP : Maladie de Parkinson
MPTP : 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
NAD : Nicotinamide adenine dinucleotide
NF κB : Nuclear factor kappa B
NGF : Nerve grouth factor
NMDA : N-methyl-D-aspartic acid
NMEs : Neurones moyens épineux du striatum
NO : Nitric oxyde
NOS : Nitric oxide synthase
NST : Noyau subthalamique
NT3 ou 4 : Neurotrophin 3 ou 4
O_2•- : 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
SO : Stress Oxydatif
SOD : Superoxyde dismutase
SPD : Sprague Dawley
SUP : Système ubiquitine protéasome
SVF : Serum de veau fœtal
TEP : Tomographie à émission de positons
TH : Tyrosine Hydroxylase
TNFα : Tumor necrosis factor alpha
TNFαP : Tumor necrosis factor alpha receptor
TUNEL : terminal deoxytransferase- mediated dUTP-biotin nick end labelling
UPDRS : Unified Parkinson's disease rating scale
zVAD-fmk : N-benzyloxycarbonyvaline-alanine-aspartate-(OMe)- fluoromethylketone
TGFβ1 : Transforming Growth factor beta 1

Table des matières

En quelques lignes....5
En quelques pages....7
Avant propos....15
Introduction....16
1 Description clinique de la maladie de Parkinson....17
2 Description anatomo-pathologique de la maladie de Parkinson....18
2-1 La perte dopaminergique....18
2-2 Autres pertes....22
2-3 Les corps de Lewy....22
3 Etiologie de la maladie de Parkinson....23
3-0-1 L'hypothèse génétique....23
3-0-2 Hypothèse environnementale....24
1-3-1 Les mécanismes de mort cellulaire....25
3-1-1 L'apoptose (généralités)....25
3-1-2 La nécrose (généralités)....27
3-1-3 Apoptose et maladie de Parkinson....29
3-2 Les hypothèses d'induction de l'apoptose....30
3-2-1 Le système ubiquitine/protéasome....30
3-2-2 Exitotoxicité....31
3-2-3 Ca2+ 31
3-2-4 Les facteurs neurotrophiques....31
3-2-5 Le stress oxydatif 32
4 Les traitements actuels....36
4-1 Approche pharmacologique 37
4-1-1 DOPAthérapie....37
4-1-2 Les agonistes dopaminergiques....39
4-1-3 Inhibiteurs enzymatiques....39
4-2 Le traitement chirurgical: La stimulation cérébrale profonde....40
5 Perspectives thérapeutiques....41
5-1 Thérapies visant à agir sur le processus dégénératif....42
5-1-1 Les traitements anti-oxydants 42
Expérimentation....42
Résultats chez l'humain....42
5-1-2 Les traitements anti-apoptotiques 43
5-1-3 Les thérapies anti-excitotoxiques....44
5-1-4 Les traitements anti-inflammatoires....45
Expérimentation....45
Chez l'humain....46
5-1-5 Les facteurs neurotrophiques....47
5-2 Les greffes de tissus embryonnaires....47
5-2-1 L’expérimentation animale....47
5-2-2 L’allotransplantation en clinique....48
6 Les modèles actuels de la maladie....52
6-1 Les différentes espèces animales utilisées....52
6-2 Les différents modes d'induction de la Maladie de Parkinson....53
6-2-1 Les modèles génétiques :....53
la souris porteuse d’une mutation sur le gène de l’α-synucléine....53
L'expression de l'a-synucleine mutée chez le rat....53
6-2-2 Les modèles par intoxication....54
Les modèles MPTP....54

MPTP chez la souris....55
MPTP chez le rat....55
MPTP chez le primate....55
Les modèles de rats 6-OHDA....56
Lésion totale par injection de 6-OHDA dans le faisceau médian du téléncéphale....59
Lésions partielles....59
Aspects comportementaux des lésions à la 6-OHDA....60
Les dyskinésies induites par la L-DOPA chez le rat....61
7 Inflammation et réponse immunitaire dans le Système nerveux central....63
7-1 Les acteurs de l'inflammation dans le SNC, l'inflammation et la MP....64
7-1-1 Les Oligodendrocytes....65
7-1-2 La Microglie....65
7-1-3 Les Astrocytes....67
7-1-4 Infiltration lymphocytaire....68
7-1-5 Principales cytokines et substances cytotoxiques du CNC....69
Les cytokines anti-inflammatoires....69
Les cytokines pro-inflammatoires....70
Les interleukines pro-inflammatoires....70
Les chimioattracteurs....70
Les substances cytotoxiques....71
Le TNFα (tumor necrosis factor)....71
L'Interferon γ (IFNγ)....71
Le Monoxyde d'Azote....72
7-1-6 Le SNC dans le cadre non-inflammatoire et inflammatoire....73
Cadre non inflammatoire....73
Cadre inflammatoire....74
7-2 Inflammation et Maladie de Parkinson....76
7-2-1 Susceptibilité particulière des neurones DA de la SN....76
Une augmentation du risque inflammatoire avec l'âge....76
La SN, une zone particulièrement riche en microglie de manière constitutive....76
Observation dans les modèles....76
7-2-2 Une neurodégénérescence induite par l'inflammation....77
Le LPS....77
Autres substances pro-inflammatoire....78
Infection....79
Inhibition de l'inflammation....79
a-synucleine: une substance inflammatoire?....80
7-2-3 Mécanismes probables....81
7-2-4 Chez l'humain....82
La présence d'élément indiquant la présence d'inflammation chez le patient....82
Traumatisme/infection intracérébrale et risque de MP....84
Prise de traitement anti-inflammatoire et risque de MP....85
Objectifs....87
1 Développement d'un modèle animal le plus proche possible de la maladie de Parkinson humaine....88
2 Cinétique de l'activation microgliale associée au processus neurodégénératif induit par la 6-OHDA....88
3 Caractérisation, d'un point de vue moléculaire, de l'environnement trophique et immunologique du modèle bilatéral....89
4 Conséquence de l'inhibition de l'activation microgliale sur le processus dégénératif induit par la 6-OHDA....89
Considérations méthodologiques....90

1 Lésion à la 6-OHDA....91
2 Traitements....92
2-1 L-DOPA....92
2-2 Minocycline....92
3 Comportement....92
3-1 Stepping test....92
3-2 Rotarod....93
3-3 Ball test....93
3-4 Dyskinésie....94
4 Sacrifice....95
5 Immunohistochimie....96
5-1 Colorimétrie....96
5-2 Fluorescence....97
5-3 Fluoro-jade B....98
5-4 Stéréologie....98
6 Analyse moléculaire....99
6-1 Extraction d'ARN et rétrotranscription....99
6-2 Analyse semi-quantitative par PCR en temps réel (TaqMan®)....100
7 Préparation cellulaire pour les greffes....101
Résultats....102
1 Développement d'un modèle animal le plus proche possible de la maladie de Parkinson humaine....103
1-1 Présentation....103
1-2 Synopsis de l'étude....104
1-3 Principaux résultats....104
1-4 Perspectives....105
2 Cinétique de l'activation microgliale associée au processus neurodégénératif induit par la 6-OHDA....106
2-1 Présentation....106
2-2 Synopsis de l'étude....107
2-3 Principaux résultats....107
2-4 Perspectives....108
3 Caractérisation, d'un point de vue moléculaire, de l'environnement trophique et immunologique du modèle bilatéral....108
3-1 Présentation....108
3-2 Synopsis de l'étude....109
3-3 Principaux résultats....109
3-4 Perspectives....110
4 Effet délétère d'un traitement à la minocycline....112
4-1 Présentation....112
4-2 Méthode simplifiée....113
4-2-1 Animaux....113
4-2-2 Administration de la minocycline....114
4-2-3 Réalisation des lésions dopaminergiques....114
4-2-4 Test comportemental: Le stepping test....115
4-2-5 Marquages immunohistochimiques....115
4-2-6 Analyse et quantification histologiques....115
4-2-7 Analyse statistique....115
4-3 Synopsis de l'étude....116
4-4 Résultats....116
4-4-1 Suivis des animaux....116
4-4-2 Test comportemental....117

4-4-3 Études histologiques....117
Marqueurs neuronaux....117
Marqueurs de l'inflammation....118
Corrélation entre la mort cellulaire et l'activation microgliale....119
Étude astrocytaire....119
4-5 Discussion....119
4-6 Conclusion et Perspectives....122
Discussion générale....125
1 Questions techniques....126
1-1 Intoxication la 6-OHDA....126
1-2 Viabilité....127
1-3 Compensation motrice....128
1-4 Dyskinésies....130
1-5 Importance des shams....131
1-6 Validation du prélèvement pour l'analyse moléculaire....131
2 Synthèse des résultats....132
2-1 Intérêt de notre modèle dans l'étude de nouvelles stratégies thérapeutiques....132
2-2 Etude moléculaire et histologique de l'activation microgliale....134
2-3 Traitement minocycline....136
Conclusion et perspectives....138
1 Conclusion générale....139
2 Perspectives....140
Bibliographie....142

En quelques lignes

La maladie de Parkinson (MP) est un trouble neurodégénératif caractérisé par une perte massive et progressive des neurones dopaminergiques (DA) de la substance noire (SN). Cette perte est responsable d'une diminution drastique de DA dans le striatum entraînant un dysfonctionnement de cette structure. Cette dénervation provoque l'apparition de symptômes moteurs. Aujourd'hui, il existe des traitements symptomatiques efficaces basés sur une restauration du niveau de DA dans le striatum (L-DOPA) ou basés sur un contrôle des structures dépendantes du striatum (stimulation cérébrale profonde). Malgré ces traitements, le processus neurodégénératif reste encore non contrôlé et la poursuite évolutive de la maladie conduit, à terme, à des complications sources de handicaps.

Aujourd'hui, il semble donc important de mieux comprendre les événements associés au processus dégénératif des neurones DA dans la SN afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces.

Les travaux de cette thèse ont poursuivi deux objectifs principaux: 1) développer un nouveau modèle rat de MP le plus proche des caractéristiques de la maladie humaine dans le but de disposer d'un "outil" d'évaluation thérapeutique plus performant; 2) préciser le rôle de l'environnement glial dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques provoquée par le neurotoxique qu'est la 6-OHDA.

Nous avons ainsi mis au point un modèle expérimental de MP chez le rat par injection bilatérale de 6-OHDA dans la faisceau médian du télencéphale (FMT). Ces animaux présentent les caractéristiques proches de la MP humaine suivantes: 1) Des troubles moteurs bilatéraux spécifiques, quantifiables et prédictifs de l'état de dénervation DA du rat. 2) Le traitement à la L-DOPA permet de réduire significativement les troubles moteurs, et provoque l'apparition de dyskinésies chez les animaux les plus atteints.

En parallèle, nous avons étudié la cinétique de l'activation microgliale dans une version unilatérale de notre modèle sur 35 jours. L'analyse histologique démontre: 1) Une activation microgliale strictement concomitante au processus dégénératif des neurones DA au niveau de la SN. 2) Une activation microgliale exclusivement présente dans la zone en neurodégénérescence de la SN. Ainsi, le processus dégénératif des neurones DA et l'activation microgliale seraientt corrélés dans le temps et dans l'espace.

Dans le modèle bilatéral, l'analyse sur 28 jours, des variations d'ARNm par RT-PCR quantitative de facteurs neurotrophiques et de substances inflammatoires possiblement sécrétées par

la microglie, a montré: 1) Une augmentation transitoire d'ARNm de TNFα le 1er jour. Celle-ci est commune aux animaux shams intoxiqués au sein du mésencéphale ventral et suggère que l'inflammation induite par le traumatisme opératoire ne provoque pas de perte neuronale. 2) Un effet spécifique de la 6-OHDA sur ces facteurs plutôt secondaires au processus neurodégénératif. 3) L'augmentation d'ARNm de GDNF au 28ème jour suivant l'injection de 6-OHDA semble même indiquer un environnement bénéfique pour les neurones DA une fois leur perte stabilisée dans la SN.

Enfin, dans le but de préciser le rôle de cette l'inflammation accompagnant la dégénérescence des neurones DA au 7ème jour de notre cinétique sur 35 jours, nous avons utilisé un inhibiteur de l'activation microgliale: la minocycline. Un traitement avant l'injection de 6-OHDA jusqu'au sacrifice des animaux (une semaine après) a mis en évidence un effet délétère de la minocycline sur la survie des neurones DA dans la SN. Les variations de neurodégénérescence observées s'accompagnaient d'un état inflammatoire proportionnel.

En conclusion, dans le cadre d'une meilleur compréhension de la pathogénie de la MP, nous avons optimisé le modèle rat par injection à la 6-OHDA. Après avoir caractérisé sur le plan moteur ce nouveau modèle, nous avons précisé la place de l'environnement glial par rapport à la dégénérescence des neurones DA provoquée par ce toxique. Il apparaît en particulier dans ce modèle, que l'activation microgliale est plutôt une conséquence du processus neurodégénératif que l'inverse .

En quelques pages

Avec une prévalence de 1/1000, la maladie de Parkinson (MP) est le second trouble neurodégénératif après la maladie d'Alzheimer. Les principaux symptômes décrits chez les patients sont l'akinésie, la bradykinésie et le tremblement de repos. A terme, des troubles de la posture et de l'équilibre apparaissent. Enfin, il est de plus en plus fréquent de décrire quelques troubles cognitifs tels qu'un état dépressif et anxieux. Les symptômes cliniques observés sont logiques au vue de l'anapathologie de la MP.

En effet, la MP est caractérisée par une perte massive et progressive des neurones dopaminergiques (DA) de la substance noire (SN) et en particulier de sa partie dite « compacte » (SNpc). La perte des neurones DA n'est pas homogène, mais suit un gradient rostro-caudal. La neurodégénérescence bilatérale est à l'origine d'un déficit en DA dans la structure cible de la SN: le striatum. Au centre des interactions des noyaux gris centraux, le dysfonctionnement induit du striatum explique l'apparition de symptômes. Ces éléments ont permis de mettre au point des traitements symptomatiques.

Le traitement le plus logique consiste à rétablir une concentration en DA au niveau du système nerveux central (SNC) et en particulier au niveau du striatum. La prise orale de L-DOPA, un précurseur de la DA qui franchit la barrière hémato-encéphalique (BHE), permet la néosynthèse de DA dans le SNC et la disparition des principaux symptômes moteurs. Ce traitement a été optimisé en étant couplé à des inhibiteurs enzymatiques, puis associé à l'utilisation d'agonistes DA. Malgré tout, après 5 ans de traitement, dans 60% des cas, il apparaît des fluctuations d'efficacité et le développement de mouvements involontaires anormaux appelés dyskinésies. De nouvelles stratégies thérapeutiques plus en aval ont donc été développées en parallèle.

Le dysfonctionnement du striatum entraîne un dérèglement de ses structures cibles. Ainsi le noyau subthalamique (NST) n'est plus contrôlé et se retrouve suractivé. Les progrès dans l'électrophysiologie ont permis de mettre au point l'utilisation d'électrodes stimulatrices à hautes fréquences pouvant inhiber le NST et donc réduire significativement les troubles moteurs des patients.

Si les symptômes moteurs peuvent donc être contrecarrés pendant un certain temps, les traitemenst actuels de la MP ne sont pas curatifs. La maladie continue donc à évoluer, rendant les traitements insuffisants avec le temps. Il est donc nécessaire de développer des stratégies curatives en s'appuyant sur les connaissances de la pathogénie de la MP. Dans ce but, il est nécessaire de pouvoir compter sur des modèles expérimentaux de la MP de plus en plus proche de la maladie humaine, que ce soit au niveau comportemental, anatomopathologique ou dans le rétablissement

fonctionnel par traitement.

Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques nécessite aussi une meilleurs compréhension du phénomène neurodégénératif. Or, aujourd'hui, les origines et mécanismes d'évolution de la MP sont encore mal connus. Il existe tout de même plusieurs hypothèses.

Certains gènes mutés ont été mis en cause dans des formes familiales de MP, comme le gène codant pour l'α-synucleine (α-syn). Ainsi, pour 10 à 15% des cas, un facteur génétique semble être la cause de la maladie. Concernant les autres cas, l'explication s'oriente plus vers une cause multifactorielle.

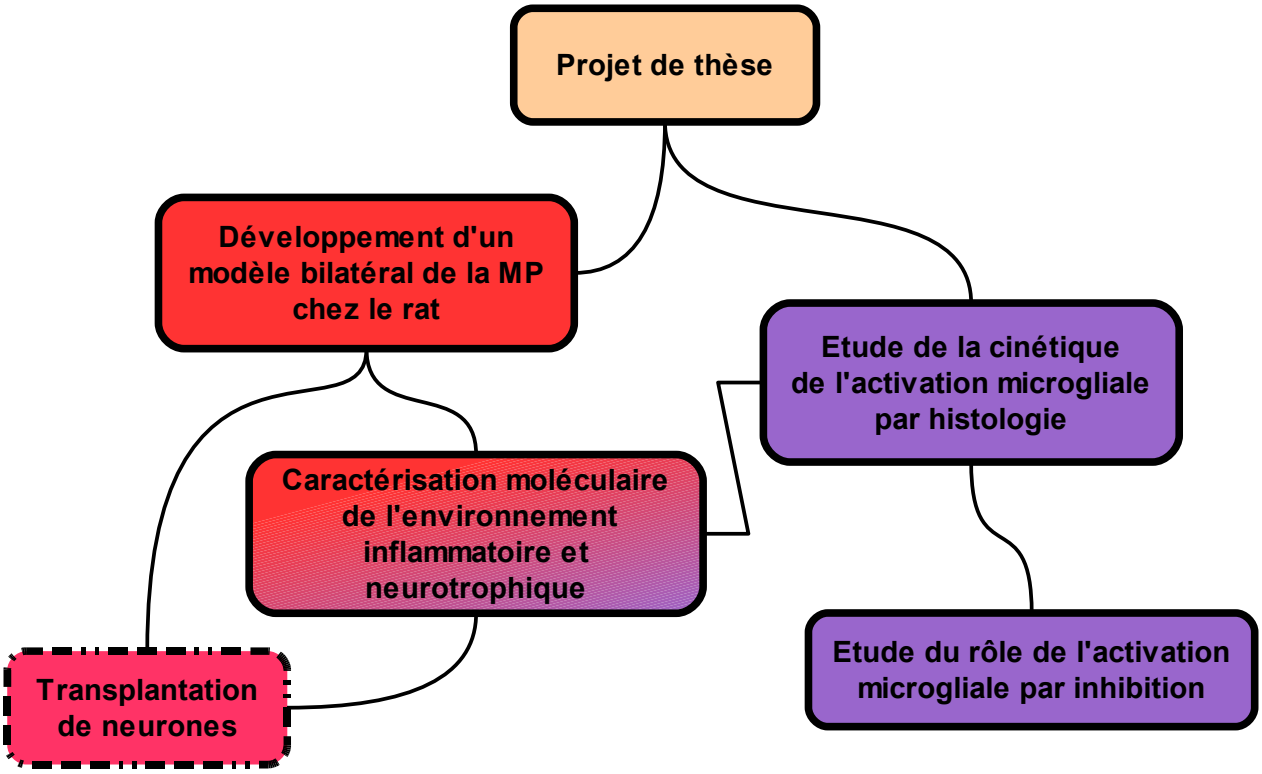
En effet, différents facteurs environnementaux comme certains pesticides pourraient être mis en causes, mais ne semblent pas suffisants à eux seuls. D'autres substances comme le MPTP sont capables d'induire un syndrome parkinsonien accompagné d'une perte spécifique des neurones DA de la SN. Enfin, certains phénomènes inflammatoires sont de plus en plus suspectés de jouer un rôle actif dans la dégénérescence. En effet, une activité microgliale significative a été mise en évidence dans le cadre d'analyse *post-mortem* de cerveaux de patients MP et intoxiqués au MPTP ainsi que dans différents modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo* de MP. La microglie est le médiateur cellulaire principal de la réponse immunitaire primaire dans le SNC. Lors de son activation, elle synthétise et sécrète un certain de nombre de substances pro-inflammatoires et cytotoxiques susceptibles d'induire un stress oxydatif (SO). Ces éléments ont aussi été détectés chez les patients et dans différents modèles expérimentaux. Or il est reconnu que les neurones DA de la SN sont particulièrement sensibles au SO. La SN étant la zone du SNC la plus riche en microglie, certaines équipes ont étudié un possible rôle primaire de la microglie dans la pathogénie de la MP. Ainsi, il a été démontré que l'induction d'une inflammation par le LPS était à l'origine d'une dégénérescence spécifique des neurones et spécifique de la SN. En parallèle, l'utilisation de substances anti-inflammatoires dans des modèles animaux de MP par intoxication a montré le rôle neuroprotecteur de ce type de traitement. Cependant, les dernières études épidémiologiques n'ont pu mettre en évidence un rapport entre le risque de MP et la prise d'anti-inflammatoire non stéroïdien, de traumatismes ou d'infections au niveau du SNC chez l'humain. De même, la prise de minocycline (classiquement reconnu comme un inhibiteur de l'activation microgliale) n'a pas encore montré d'effets bénéfiques chez les patients MP.

Ainsi, les conséquences de la réaction inflammatoire et en particulier de la microglie ne sont pas encore clairement établies. D'autant plus que la microglie est aussi capable d'effets neuroprotecteurs via son rôle phagocytaire et la sécrétion de facteurs neurotrophiques. Une connaissance plus précise de la place des interactions entre les neurones en voix de dégénérescence et la réaction microgliale permettrait d'éclaircir certains points.

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes de la MP et de développer de nouveaux

traitements, nous avons cherché à mettre au point un nouveau modèle de la MP, puis, à déterminer l'activation microgliale associée à la neurodégénerescence.

Synopsis de la thèse



Développement d'un modèle de rat la plus proche de la maladie humaine

Dans un premier temps, nous avons donc cherché à induire une perte neuronale DA bilatérale au niveau de la SN responsable de l'apparition de troubles moteurs quantifiables et réversibles chez des rats SPD.

Cette étude nous a permis de développer un modèle de MP chez le rat plus proche de la MP humaine que ceux existant précédemment. En effet, l'injection de doses modérées de 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale (FMT) de manière bilatérale mime des troubles dégénératifs et moteurs communs à la MP humaine. Grâce à une batterie de tests comportementaux, il est possible de quantifier l'apparition de déficiences motrices bilatérales: akinésie des membres antérieurs, atteinte de la coordination motrice et du déclenchement du mouvement. Ces observations cliniques sont prédictives de la perte des neurones DA de la SN. Les troubles moteurs observés sont réversibles sous traitement oral à la L-DOPA. De plus, ce traitement provoque l'apparition de mouvements involontaires anormaux chez les animaux les plus atteints. De même, la présence de ces dyskinésies peut être cliniquement prédite et est quantifiable.

Du point de vue anatomopathologie, comme dans la MP humaine, la perte des neurones DA est partielle, asymétrique et suit un gradient rostro-caudal dans la SN. L'aire tegmentale ventrale (ATV) est relativement épargnée et la neurodégénéréscence DA dans la SNpc induit une sévère dénervation DA au niveau du striatum à l'origine des troubles moteurs.

La dénervation DA au niveau du striatum est très rapide, puis est suivie par la perte des corps cellulaires des neurones DA de la SN plus progressive. Celle-ci est stable à partir de 3 semaines

Ces résultats observés dans un premier temps chez les rats SPD ont été reproduits sur les souches Lewis 1A et Lewis 1W.

L'ensemble de ces éléments valide l'utilisation de ce modèle dans le cadre de la caractérisation de nouvelles stratégies thérapeutiques chez le rongeur pour traiter la MP. Ainsi, la mise au point d'un tel modèle ouvre plusieurs perspectives expérimentales intéressantes. En effet, notre modèle permet une étude clinique des troubles moteurs par des techniques non-invasives. Ainsi, il est possible de comparer l'efficacité de nouvelles stratégies thérapeutiques à l'ensemble des effets bénéfiques et indésirables d'un traitement de référence chez l'humain comme la L-DOPA.

Activation microgliale associée à la neurodégénérescence

Le temps de terminer la validation de notre modèle bilatéral, nous avons cherché à caractériser l'activation microgliale induite par l'injection de 6-OHDA dans le FMT de rat SPD.

Dans ce but, nous avons analysé de manière histologique la perte des neurones DA et l'activation microgliale sur 35 jours.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence une réaction microgliale intimement liée à la perte des neurones DA dans la SN. En effet, nous avons pu établir que la neurodégénerescence DA et l'activation microgliale sont strictement concomitantes. Plus précisément, l'activation microgliale se situe autour des neurones en voix de dégénérescence et semble exclue des zones encore saines de la SN. D'autre part, la réaction microgliale induite par le traumatisme opératoire observée chez les shams (injection du véhicule sans 6-OHDA) est transitoire et n'induit pas de neurodégénérescence. Dans ce modèle, il semble donc que l'activation microgliale ne soit pas primaire à la perte des neurones DA mais plutôt rapidement induite par cette dernière.

L'établissement de cette cinétique a permis de mieux comprendre les relations spatio-temporelles entre la microglie et les neurones DA au sein de la SN. Le nombre de points dans le temps (les jours 2 et 3 suivant l'injection de 6-OHDA ne lissant que les courbes entre J1 et J5) et l'étude spatiale suggère un rôle de nettoyage de la microglie, cependant celui-ci reste à préciser. Dans ce but, nous avons décidé d'étudier l'environnement inflammatoire et neurotrophique dans notre modèle bilatéral et d'utiliser un inhibiteur de l'activation microgliale afin de mieux définir l'effet de la relation entre les neurones DA et la microglie au jour le plus marquant dans notre modèle unilatéral.

Caractérisation moléculaire de l'environnement inflammatoire et neurotrophique induit par l'injection de 6-OHDA

Enfin, nous avons cherché à évaluer les conséquences de la réaction microgliale dans notre modèle bilatéral. Dans cette étude, nous avons observé les variations d'ARNm de marqueurs de l'inflammation (CD11b, iNOS et TNFα) et de facteurs neurotrophiques (GDNF, BDNF, NT3) dans le mésencéphale ventral et le striatum de rats SPD suite à l'injection bilatérale de 6-OHDA dans le FMT le 1er jour, puis chaque semaine pendant 28 jours.

L'analyse moléculaire par RT-PCR quantitative a montré 1) une augmentation transitoire de la quantité en ARNm codant pour le TNFα le premier jour suivant l'opération commune aux shams et aux rats lésés semble due au traumatisme. 2) Une augmentation transitoire de la quantité

d'ARNm codant pour iNOS 21 jours après l'injection de 6-OHDA. 3) Une augmentation de la quantité d'ARNm codant pour GDNF et CD11b 28 jours après l'injection de 6-OHDA.

C'est résultats suggèrent une inflammation précoce et transitoire due au traumatisme opératoire. L'effet spécifique de la 6-OHDA semble entraîner une action de la microglie postérieure à l'initiation du processus neurodégénératif. Cette activation pourrait ne pas avoir le même rôle en fonction du temps: Une première phase inflammatoire et une seconde plutôt trophique.

Effet délétère d'un traitement à la minocycline

Afin de définir le rôle de l'activation microgliale associée à la neurodégénérescence, nous avons voulu nous affranchir de son activation par le traitement de rats SPD à la minocycline (classiquement reconnue comme inhibiteur de l'activation microgliale). Dans l'étude précédente, le maximum de réaction microgliale et de neurodégénérescence était atteint à 7 jours. Nous avons donc décidé de traiter les rats à la minocycline quotidiennement sur 10 jours: de 3 jours avant jusqu'au 7éme jour après l'injection de 6-OHDA.

De manière surprenante, le traitement à la minocycline n'a pas eu d'effet inhibiteur. De plus, les rats traités présentaient une neurodégénérescence significativement accrue et accompagnée par une réaction microgliale proportionnelle. Ces résultats suggèrent un rôle délétère de la minocycline dans nos conditions et une activation microgliale plutôt induite par le phénomène neurodégénératif que l'inverse.

L'interaction entre le traitement et un facteur déclencheur de la perte neuronale, porte à réfléchir sur l'opportunité de l'utilisation d'une substance active en fonction des origines (et du mécanisme) de la perte des neurones.

L'ensemble des résultats et des observations collectés lors de ce travail de thèse à permis de mettre en évidence l'importance de certains points techniques et d'éclaircir la relation entre la microglie et les neurones DA suite aux désordres provoqués par la 6-OHDA.

Les animaux ne déclenchent pas de MP de manière naturelle. Il est donc nécessaire d'induire artificiellement la MP chez les animaux pour pouvoir l'étudier. Lors de nos différents travaux, nous utilisons un modèle de la MP induit par injection de 6-OHDA chez le rat. Cette toxine spécifique des neurones catécholaminergiques provoque la mort des neurones DA via un stress oxydatif et/ou un dysfonctionnement de la mitochondrie. Ces mécanismes sont suspectés d'intervenir dans la progression de la MP chez l'humain. Nous effectuons les injections au niveau du FMT pour

s'affranchir d'artefacts dûs à une lésion mécanique dans la SN et car l'effet est plus stable et plus reproductible que l'injection dans le striatum. L'injection de doses modérées de 6-OHDA dans le FMT entraîne une perte partielle des neurones DA dans la SN suffisante pour l'apparition de troubles moteurs significatifs. Cependant, l'intoxication des animaux induit une perte de poids parfois létale pour les animaux. La survie des animaux nécessite une attention particulière lors des 15 premiers jours suivant l'opération.

L'intérêt majeur de l'injection bilatérale de 6-OHDA est d'éviter les mécanismes de compensation: Au niveau physiologique, des phénomènes de bourgeonnement de fibres DA provenant du côté non injecté sont susceptibles de restituer une certaine quantité de DA du côté injecté. Au niveau physique, de nombreux tests comportementaux sont moins discriminants quand ils sont pratiqués avec des animaux « hémiparkinsoniens ». Or, connaissant mal les effets de l'apomorphine (utilisée régulièrement lors du test du rotomètre), nous préférons utiliser des tests non-invasifs comme le stepping test, le rotarod et le ball-test (mis au point au laboratoire). Ces 2 derniers ne sont pas utilisables avec les rats « hémiparkinsoniens » qui compensent leur handicap avec leur côté valide. Au contraire, ces tests sont prédictifs de l'état lésionnel et du risque d'apparition de dyskinésies chez les rats intoxiqués de manière bilatérale. Ces dyskinésies induites par le traitement à la L-DOPA sont elles-mêmes quantifiables.

Lors de nos études, l'utilisation de rats shams nous permet de préciser le rôle de la 6-OHDA. En effet, les shams subissent le même acte chirurgical que les rats intoxiqués, ainsi, il est possible de différencier les effets du traumatisme opératoire du rôle spécifique de la 6-OHDA.

Enfin, lors de notre étude moléculaire, nous avons validé la précision de la technique de RT-PCR et de dissection en ne détectant pas d'ARNm de GDNF dans le striatum, mais en mettant en évidence sa présence dans la SN.

L'ensemble de ces points techniques mettent en valeur nos résultats.

Suite à la mise au point de notre modèle bilatéral, nous avons voulu tester l'impact sur les troubles moteurs et l'apparition de dyskinésies de la transplantation de neurones embryonnaires (E15) dans la striatum et la SN comparé au traitement à la L-DOPA. L'augmentation d'ARNm de GDNF dans le mésencéphale ventrale nous a encouragé à pratiquer les transplantation 28 jours après la lésion. Nous avons sélectionné les rats à greffer grâce à nos test comportementaux. Nos greffons présentaient une différentiation en neurones TH-positifs en périphérie avec une activité métabolique. Nous n'avons détecté aucun indice de rejet. Cependant, nous n'avons pu mettre en évidence d'effets comportementaux induit par les greffons contrairement aux rats contrôles (traité à la L-DOPA). Si notre étude de transplantation s'est soldée par un échec, notre modèle est renforcé par sa reproductibilité et la possibilité de présélection comportementale (le traitement à L-DOPA a induit l'apparition de dyskinésies chez 80% des rats traités).

La caractérisation de l'environnement inflammatoire associé à l'injection de 6-OHDA nous a apporté différentes informations intéressantes. Nous avons pu observer que l'opération induit une activation précoce de la microglie au niveau du mésencéphale ventral chez les rats intoxiqués et shams. Cet état inflammatoire transitoire ne provoque pas de neurodégénérescence chez les shams, tandis que l'injection de 6-OHDA induit progressivement la mort des neurones DA dans la SN. Ce processus neurodégénératif est accompagné par une activation concomitante et localisée de la microglie. Nous avons aussi observé pour un même temps d'intoxication que l'activation microgliale était proportionnelle aux neurones DA en voie de dégénérescence.

Bien que nous n'ayons pas réussi à inhiber l'activation microgliale, il semble que dans notre modèle d'intoxication, celle-ci soit dépendante du processus neurodégénératif dans la SN. La prochaine étape serait de préciser la nature des interactions entre les neurones DA et la microglie dans ce cadre.

En conclusion, ce travail de thèse a permis de mettre au point et d'utiliser un nouveau modèle de la MP chez le rat. Ce modèle, plus proche de la MP humaine que les précédents semble être un bon outil pour l'étude de nouvelles stratégies thérapeutiques: autant pour leurs côtés bénéfiques que leurs effets secondaires.

Ce travail de thèse a aussi permis de caractériser la cinétique d'activation de la microglie accompagnant la dégénérescence des neurones DA dans la SN dans notre modèle. Nous avons ainsi pu mettre évidence une réaction strictement concomitante. Nos résultats suggèrent un phénomène inflammatoire plutôt secondaire, induit par le processus dégénératif et peut être bénéfique à terme, mais nous n'avons pas encore pu le prouver formellement.

La suite logique de ce travail serait de préciser le rôle de l'activation microgliale observée précédemment.

Avant propos

La fonction du système nerveux central (SNC) est d'intégrer les stimuli provenant de l'environnement interne et externe à l'organisme. Il permet alors une réponse de manière adaptée et coordonnée. Le SNC est constitué d'un réseau inter-communicant dont les éléments principaux sont les neurones.

Les neurones sont des cellules hautement différenciées, spécialisées dans la communication intercellulaire. Ils peuvent être subclassés de plusieurs façons en s'appuyant sur les messages qu'ils sont susceptibles de passer via leurs neurotransmetteurs. Dans le SNC, les neurones synthétisant et sécrétant les mêmes types de neurotransmetteurs sont généralement regroupés dans une même région.

Les neurones sont considérés comme irremplaçables et l'altération partielle ou totale d'une de leurs ultra-structures est à l'origine de diverses maladies neurodégénératives en fonction du groupe de neurones touchés de façon préférentielle:

- ✓ les neurones Dopaminergiques de la Substance Noire pour la maladie de Parkinson
- ✓ les neurones Cholinergiques de l'Hippocampe pour la maladie d'Alzheimer
- ✓ les neurones Gabaergiques du Striatum pour la maladie de Huntington, pour ne citer que ces maladies.

Le SNC à longtemps été considéré comme une structure immunologiquement privilégiée: l'activité du système immunitaire y étant plus inerte que dans le reste de l'organisme. Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses études ont démontré un rôle certes particulier, mais tout de même actif des cellules immunitaires au niveau du SNC. Les principales cellules immunitaires dans le SNC sont les cellules microgliales (équivalent des macrophages du système immunitaire périphérique). Il en résulte un certain nombre de questions concernant l'interaction que pourraient avoir ces cellules avec les neurones et notamment leurs rôles directs ou indirects dans la protection ou la destruction des neurones dans le cadre de maladies neurodégénératives.

Aujourd'hui, il semble donc important de mieux comprendre les interactions entre neurones et cellules de l'immunité (comme la microglie) dans le SNC dans le cadre de maladies neurodégénératives. Les travaux de cette thèse ont porté sur les phénomènes dégénératifs de la maladie de Parkinson, analysés dans un modèle rat.

Introduction

Dans de nombreux domaines, les progrès propices à une meilleure santé ont permis globalement aux populations de vivre plus longtemps. Cependant le vieillissement démographique augmente les risques d'apparition de maladies dues à l'âge comme les troubles neurodégénératifs telle que la maladie de Parkinson (MP). La MP, dont la prévalence ne cesse de croître, est en fréquence la 2ème affection neurodégénérative après la maladie d'Alzheimer (MA), avec une prévalence de 1/1000. En plus de pallier les désagréments directs à la personne, la compréhension et le soin de la MP sont aussi des enjeux socio-économiques.

1 Description clinique de la maladie de Parkinson

Les principaux symptômes de la MP furent décrits pour la première fois en 1817 par James Parkinson qui qualifiait alors la maladie de « paralysie agitante ».

D'un point de vue clinique, la MP est diagnostiquée suite à l'association de différents syndromes moteurs (Fénelon 1997; Damier 2002a) dont les plus visibles sont les suivants:

- un tremblement de repos
- une akinésie ou bradykinésie: difficulté à l'initiation des mouvements et ralentissement de ceux-ci
- une rigidité plastique
- un affaissement de la posture. Ces symptômes moteurs apparaissent généralement de manière unilatérale avant de progresser de manière bilatérale. Ils perturbent la posture, la marche puis l'équilibre (figure 1). Ils deviennent très invalidants pour le patient s'ils ne sont pas traités. La MP est aussi accompagnée de syndromes psychiques comme l'anxiété ou la dépression (Fénelon 1997; Damier 2002a). Néanmoins, les fonctions intellectuelles sont le plus souvent longtemps épargnées, mais avec l'évolution il existe une altération cognitive, même si celle-ci est différente de celle de la maladie d'Alzheimer.

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

2 Description anatomo-pathologique de la maladie de Parkinson

De manière générale, les maladies neurodégénératives sont caractérisées dans un premier temps par la perte de neurones spécifiques au niveau du SNC. Dans le cas de la MP, les neurones atteints sont majoritairement les neurones DA de la voie nigrostriatale dont les corps cellulaires sont au niveau de la SN et dont les afférences axonales projettent sur le Striatum.

La perte de ces neurones est donc responsable d'un déficit en DA au niveau du Striatum. Ce déficit entraîne un dysfonctionnement du Striatum qui provoque un déséquilibre de communication au sein des ganglions de la base (ou noyaux gris centraux; boîte 1). La perturbation de cette structure est à l'origine de l'apparition des symptômes.

2-1 La perte dopaminergique

La perte des neurones est bilatérale, progressive et massive mais pas homogène au niveau du mésencéphale. A ce niveau, sont distingués plusieurs groupes de neurones DA dont la sévérité de l'atteinte varie (figure 2; Hirsch et coll. 1988; Graybiel et coll. 1990; Damier et coll. 1999):

- la SN, région la plus touchée (de l'ordre de 80% de perte)
- la région périaqueducale (PAG ou CGS) où la perte est nulle ou faible (de 0 à 10%)
- la région médio-ventrale (A10), équivalent à l'aire tegmentale ventrale (ATV) chez le rat, présente une perte intermédiare (30 à 50%)
- l'aire péri- et rétro-rubrale (A8) qui présente aussi une perte de 30 à 50%

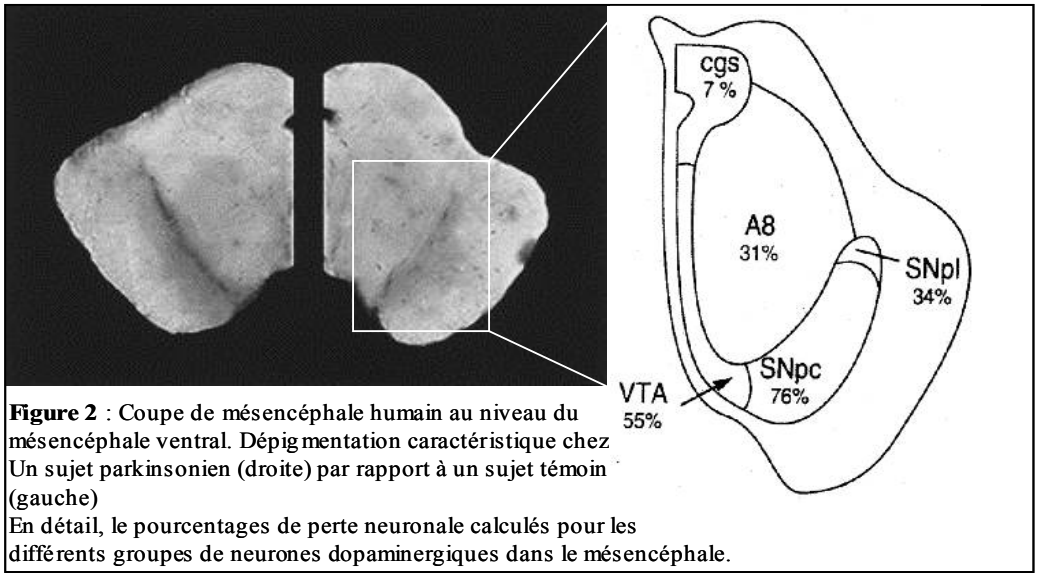


Figure 2 : Coupe de mésencéphale humain au niveau du mésencéphale ventral. Dépigmentation caractéristique chez Un sujet parkinsonien (droite) par rapport à un sujet témoin (gauche)
En détail, le pourcentages de perte neuronale calculés pour les différents groupes de neurones dopaminergiques dans le mésencéphale.

La perte DA, semble dans un premier temps se limiter à ces zones, en effet, d'autres structures riches en neurones DA comme l'hypothalamus sont épargnées (Matzuk et Saper 1985).

Par ailleurs, l'hétérogénéité de la perte en neurone DA au niveau des régions précédemment

citées est présente sous forme d'un gradient rostro-caudal. Les territoires postérieurs de chaque région sont plus sévèrement atteints que les territoires antérieurs (Bernheimer et coll. 1973; Damier et coll. 1999). Il existe donc une différence de vulnérabilité des neurones DA même dans des régions très proches. Ceci peut être du aux neurones eux-mêmes mais aussi à leur environnement direct.

L'hétérogénéité de la perte des corps cellulaires se répercute au niveau des projections de ces neurones au niveau du striatum (Haber et Fudge 1997; François et coll. 1999; Joel et Weiner 2000; Smith et Kieval 2000). Ainsi le pourcentage de perte de fibres afférentes DA est plus importante au niveau du putamen (85%) que dans le noyau caudé (75%). Au sein de ces deux structures, il existe aussi un gradient de perte: le déficit DA est plus important dans les parties dorso-latérales que dans les parties ventro-médiales (Kish et coll. 1988; Graybiel et coll. 1990; Y Agid et coll. 1993). Or la région dorso-latérale du putamen correspond au territoire sensori-moteur du striatum (Künzle 1975).

Ainsi, la topographie lésionnelle des neurones DA au niveau de la SN et donc la dénervation DA striatale contribuent à expliquer le caractère essentiellement moteur de la MP. Des différences inter-individuelles d'intensité et de distribution de la perte des neurones permettent d'expliquer certaines différences cliniques observées entre différents patients.

Il est communément admis qu'il faut un déficit DA de 70 à 80% au niveau du striatum (équivalent à 50/60% de perte cellulaire au niveau de la SN) pour qu'apparaissent les premiers symptômes de la MP (boîte 1; Agid 1991; Agid et coll. 1990; Agid et coll. 1993). Le rythme de la dégénérescence neuronale est difficile à évaluer de ce fait. Cependant, il semble que le processus dégénératif est d'autant plus rapide que la maladie se déclare tôt (Agid 1991; Lang et Lozano 1998; Agid et coll. 1990; Scherman et coll. 1989). De même il est difficile d'évaluer la durée de la phase présymptômatique, période où la perte neuronale est significative mais où les signes cliniques ne sont pas encore visibles (due à un déficit DA striatal insuffisant ou compensé par la plasticité cérébrale).

Cependant, il semble de plus en plus évident qu'il existe d'autres sites touchés qui pourraient permettre un diagnostic de la MP plus précoce (Kranick et Duda 2008; Marras et Lang 2008). En effet, plusieurs études ont montré une perte des afférences DA au niveau de la rétine ou du système olfactif. De plus, il semble que des régions externes au SNC soient aussi victimes d'une dégénérescence neuronale qui reste spécifique aux neurones DA, notamment au niveau du tube digestif, et plus particulièrement au niveau du gros colon (Sakakibara et coll. 2008)

Boîte 1: Maladie de Parkinson et ganglion de la base

Les progrès concernant les connaissances anatomiques et physiologiques des ganglions de la base ont conduit

à l'élaboration de modèles d'organisation du système. 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).

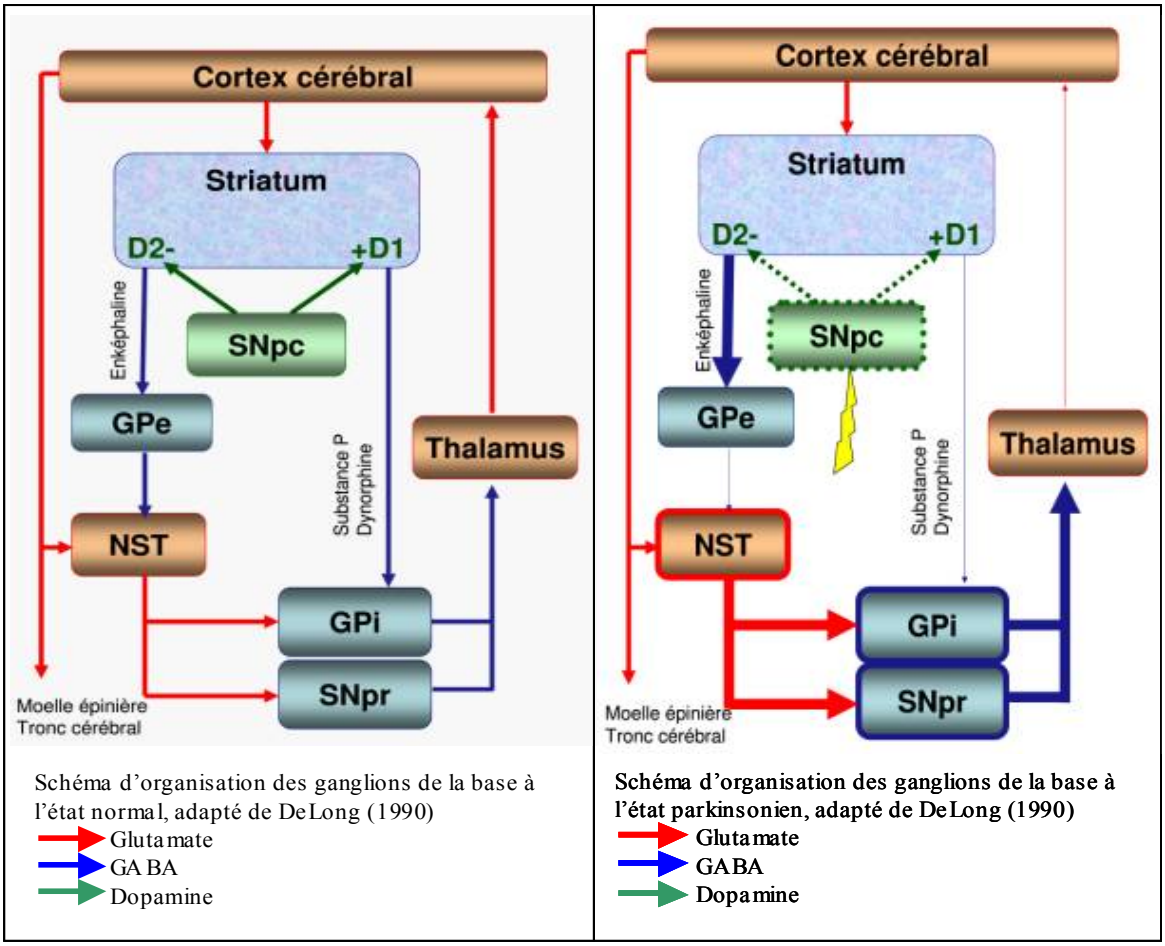


Schéma d'organisation des ganglions de la base à l'état normal, adapté de DeLong (1990)
Glutamate
GABA
Dopamine

Schéma d'organisation des ganglions de la base à l'état parkinsonien, adapté de DeLong (1990)
Glutamate
GABA
Dopamine

A l'état « normal », le circuit des ganglions de la base 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-thalainiques 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'enképbaline 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.

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 » . 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.

2-2 Autres pertes

La DOPAthérapie (rétablissement du déficit DA) fait disparaître la majorité des symptômes. Toutefois, certains signes cliniques comme l'instabilité posturale et les troubles de la marche ainsi que des déficits cognitifs peuvent résister à ce traitement. Ces données suggèrent que des systèmes non DA sont aussi altérés dans la MP (Agid et coll. 1990). Chez de nombreux patients, il existe des variations de taux de neurotransmetteurs ou neuropeptides qui peuvent être augmentés ou diminués.

Ces variations observées peuvent être dues à la perte cellulaire de neurones non DA dans d'autres structures cérébrales (Mann et coll. 1983; Arendt et coll. 1983; Hirsch et coll. 1987; Jellinger 1988; Agid et coll. 1990) comme:

- les neurones noradrénergiques dans le *locus coeruleus*.
- les neurones sérotoninergiques dans les noyaux du raphé
- les neurones cholinergiques dans le noyau basal de Meynet et dans le noyau pédonculopontin.

La MP est donc principalement caractérisée par une perte cellulaire localisée (les neurones DA de la SNpc). A ces lésions neuronales s'ajoute un stigmate neuropathologique caractéristique de la maladie les corps de Lewy.

2-3 Les corps de Lewy

Les corps de Lewy sont des inclusions cytoplasmiques éosinophiles sphériques (5 à 25µm de diamètre; figure 3). Ces inclusions présentent un coeur dense et un halo périphérique plus clair (Lang et Lozano 1998; Goedert et coll. 1998). Ils sont présents dans la SNpc, dans les neurones DA et dans certains neurones catécholaminergiques (Halliday et coll. 1990; Jellinger 1991). Les corps de Lewy sont des structures filamenteuses et granuleuses, ils sont partiellement composés de neurofilaments et de tubuline, et on y note aussi la présence d'α-synucleine et d'ubiquitine. Ainsi la présence des corps de Lewy suggère des altérations du cytosquelette et d'agrégation/dégradation des protéines (Goldman et coll. 1983; Gibb et coll. 1991). Cependant, on se sait pas si leurs présences est un signe de la souffrance cellulaire où s'ils participent au processus dégénératif (Agid 1991; Agid et coll. 1993; Langston 1996).

Si les corps de Lewy sont un argument important au diagnostic de la MP, ils ne sont pas spécifiques de cette maladie et sont parfois détectés dans la maladie d'Alzeimer et même au cours du vieillissement normal (Fearnley et Lees 1991).

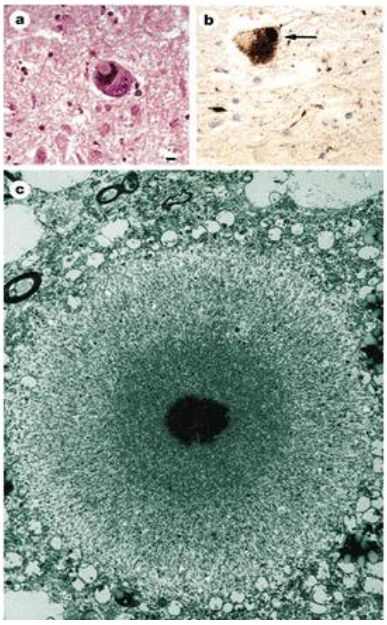


Figure 3 : Les corps de Lewy
Les corps de lewy son des inclusions éosinophiles (a), qui contiennent de l'a-synucléine (b). Ils sont constitués d'un cœur dense et granulaire et d'une couronne d'aspect filamenteux (c).
D'après Beal et coll. (2001)

La compréhension de l'anatomopathologie de la MP a permis de définir un système relativement précis (comparé aux autres affections neurodégéneratives): Un déficit DA striatal induit par la disparition des neurones DA de la SN est à l'origine de l'apparition des principaux symptômes moteurs. La réduction de ce déficit a donc été l'origine du développement des traitements symptomatiques.

3 Etiologie de la maladie de Parkinson

Il existe de nombreuses hypothèses concernant les origines de la maladie et les raisons de la neurodégénérescence. Cependant la, ou plutôt, les causes de la MP sont encore mal connues malgré de nombreuses études *post-mortem* chez l'humain ou sur des modèles animaux de la MP. La difficulté est de séparer les causes des conséquences de la mort des neurones. Un des facteurs commun à tout les cas est le vieillissement. D'ailleurs, la prévalence de la MP augmente avec l'âge. Cependant, l'amélioration des diagnostics, permet la détection de cas de plus en plus jeunes. Tout

au long de la vie, des neurones meurent au niveau du SNC. Reste donc à savoir quels seraient les phénomènes à l'origine d'une neurodégénérescence pathologique accélérée et ciblée?

3-0-1 L'hypothèse génétique

Il existe différentes données en faveur d'une cause génétique pour certains cas de la MP. Un facteur génétique unique est impliqué dans 10 à 15% des cas, pourcentage dans lesquels il existe une apparenté de premier degré atteint. De plus, des études menées à l'intérieur de paires de jumeaux monozygotes ont montré une concordance forte. Enfin, des mutations sont associées à certaines formes familiales de la MP. Ces familles ont permis de détecter plusieurs loci de gènes dont la mutation semble en cause dans la MP. C'est le cas pour les gènes codant pour l'a-synucléine, l'ubiquitin carboxy-terminal hydroxylase L1 et la Parkin (classés sous les noms de PARK1 à PARK13). Ces trois protéines sont impliquées dans le système ubiquitine/protéasome et sont présentes dans les corps de Lewy. Il semble donc qu'une altération des mécanismes de dégradation, élimination et recyclage des protéines puissent être en cause dans la physiopathologie de la MP (Mizuno et coll. 2006; Belin et Westerlund 2008).

En outre, la découverte de gènes directement liés à la maladie, permet de mettre au point des modèles avec des animaux transgéniques qui sont d'excellents outils d'investigation (Vila et Przedborski 2004; Terzioglu et Galter 2008)

3-0-2 Hypothèse environnementale

Comme de nombreuses maladies, l'exposition à un environnement particulier peut être une des causes du déclenchement de la maladie. Dans le cas de la MP, différents facteurs ont été évoqués.

Il existe quelques exemples d'apparition de syndromes parkinsoniens suite à l'exposition à un virus. Ainsi, au début du siècle, il a été constaté une augmentation de ces syndromes suite à l'épidémie virale de Von Economo. Toutefois, la topographie de la perte dopaminergique était différente de celle observée chez les patients parkinsoniens.

En fait, aujourd'hui, une seule toxine a pu être déterminée comme facteur déclenchant de la MP: le 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropiridine (MPTP). En effet, à la fin des année 70, une épidémie de syndromes parkinsoniens est apparue chez des héroïnomanes de la côte californienne. En plus des symptômes cliniques détectés, l'autopsie d'un des premiers cas montrait une perte

sélective des neurones DA dans la SN (Davis et coll. 1979). Ainsi, le MPTP, présent dans de la mépéridine frelatée, fut identifié comme un neurotoxique spécifique des neurones DA susceptible de franchir la barrière hématoencéphalique (BHE; Langston et coll. 1983 ; Langston et coll. 1984 ; Burns et coll. 1983 ; Snyder et D'Amato 1986).

Suite à ces observations, des études épidémiologiques ont été lancées afin de rechercher une éventuelle surexposition de patients parkinsoniens à des agents chimiques de structure proche de celle du MPTP. Ainsi, la prévalence de la MP semble augmenter dans certains lieux, notamment les régions exposées à de fortes concentrations en herbicides, insecticides ou pesticides contenant des toxiques type roténone ou paraquat (Semchuk et coll. 1992 ; Le Couteur et coll. 1999). Cependant, aucune substance chimique proche du MPTP n'a pu être isolée à partir de ces produits et il existe trop d'études contradictoires pour conclure sur le rôle néfaste ou non de ces substances. Pourtant, aujourd'hui, il existe des modèles animaux de la MP produits suite à l'intoxication au MPTP et à la rotenone (Perier et coll. 2003).

L'environnement « direct » sur la stimulation général du cerveau pourrait aussi avoir un rôle sur une plus forte résistance des neurones DA. Ainsi, il a été montré que des rongeurs élevés dans un environnement propice à la stimulation du cerveau (dit cage enrichie) résistaient mieux à l'intoxication des neurones DA de la SN (Bezard et coll. 2003; Laviola et coll. 2008).

En résumé, il est encore impossible de conclure sur une origine précise de la MP, d'autant plus que l'ensemble des études menées sous-tendent plutôt vers une origine multifactorielle. Cette perte pathologique ciblée sera sans doute expliquée par la résultante de diverses prédispositions, qu'elles soient génétiques et/ou environnementales.

Les causes de la MP étant encore mal connues, une meilleurs compréhensions des phénomènes responsables du processus neurodégénératif permettrait d'envisager des traitements ciblant directement les acteurs de la mort neuronale. Ceci permettant d'améliorer la survie des neurones et pourquoi pas à terme remonter aux causes de cette mort. Aujourd'hui, les mécanismes de cette mort sont de plus en plus précis.

1-3-1 Les mécanismes de mort cellulaire

Il existe trois grands mécanismes de mort cellulaire: L'apoptose, la nécrose et l'autophagie (nous ne développerons pas cette dernière).

3-1-1 L'apoptose (généralités)

L'apoptose a été mise en évidence lors de l'étude de tissu par microscopie électronique (Kerr et coll., 1972). Ce phénomène fût désigné sous le terme de mort cellulaire naturelle ou *apoptosis*, terme provenant du grec : « la chute des feuilles ».

On nomme apoptose (ou mort cellulaire programmée), le processus par lequel des cellules déclenchent leur auto destruction en réponse à un signal. C'est une mort cellulaire physiologique, contrôlée et parfois génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires. Elle est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire. Contrairement à la nécrose, elle ne provoque pas d'inflammation générale ou massive (figure 4). En effet, la cellule contrôle l'évolution de sa destruction: les membranes plasmiques ne sont pas détruites, et la cellule émet des signaux qui permettront sa phagocytose par les macrophages.

L'apoptose a un rôle primordial dans la formation et la survie de l'organisme. Elle intervient notamment au court de l'embryogénèse. Elle permet ainsi la « sculpture » de l'organisme en faisant disparaître les excroissances tissulaires. Plus particulièrement l'apoptose joue un rôle majeur dans la formation du système nerveux central en deux temps. Tout d'abord lors de la formation du cerveau primordial, la disparition de certaines cellules va permettre de modeler petit à petit le futur cerveau. Ensuite, dans les premiers mois suivant la naissance (pour revue Lossi et Merighi, 2003), les neurones qui n'auront pas établi de connexions suffisamment stables avec leurs cibles disparaîtront, permettant ainsi la sélection des neurones les plus efficaces (Clarke et coll., 1998 ; Lossi et coll., 2002).

De manière générale (pour revu Blum et coll., 2001, Lossi et Merighi 2003), l'apoptose est liée au cycle cellulaire. Ce mécanisme permet le renouvellement des cellules au sein des organes. Il existe donc un équilibre entre prolifération cellulaire et apoptose. D'ailleurs un dysfonctionnement des voies apoptotiques entraîne un dérèglement de cet équilibre et est à l'origine de proliférations cellulaires incontrôlées génératrices de cancer. Le cas des neurones reste particulier. En effet, contrairement aux autres cellules de l'organisme, il n'y a plus de prolifération des neurones au stade mature (à quelques exceptions près), les neurones ne sont donc pas remplacés après leur disparition.

L'apoptose est gouvernée par deux voies principales d'activation (pour revu Blum et coll., 2001):

- ✓ une voie extrinsèque dépendante des récepteurs de « mort » de la super famille des récepteurs au TNFα (Yuan, 1997 ; Ashkenazi et Dixit, 1998, 1999).
- ✓ une voie intrinsèque essentiellement contrôlée par le fonctionnement mitochondrial (Bossy-Wetzel et Green, 1999 ; Desagher et Martinou, 2000).

Le mécanisme de l'apoptose met en jeu un système complexe de cascades protéiques (pour

revu Blum et coll., 2001, Lossi et Merighi 2003). Que les signaux soient intrinsèques ou extrinsèques, ils vont briser un équilibre entre des protéines dites « de survie » (anti-apoptotiques: Bcl-2, Bcl-x) et d'autres « de mort » (pro-apoptotiques) toutes issues de la famille Bax. Les protéines pro-apoptotiques vont répercuter le signal via une cascade protéique très rapide médiée par les caspases. Les caspases sont des pro-protéines de lyse dont le substrat est une autre caspase. L'activation des caspases initiatrices entraîne via une cascade de lyse, l'activation des caspases effectrices. Les caspases principales sont les caspases 3 et 9. L'aboutissement de ces signaux correspond à un changement morphologique de la cellule caractéristique de l'apoptose (Harmon et coll., 1998): la condensation de la chromatine et la diminution du volume cellulaire. L'ensemble de ces phénomènes parfaitement contrôlés par la cellule va permettre sa segmentation en plusieurs vacuoles lipidiques (il n'y a pas de rupture de la membrane) conservant les organites intacts appelés corps apoptotiques qui seront facilement phagocytés par les macrophages.

3-1-2 La nécrose (généralités)

La nécrose est la forme principale de mort cellulaire lors d'accidents traumatiques, suite à certaines pathologies ou lors de déficits métaboliques. La nécrose est causée par des enzymes spéciales, produites par les lysosomes. Elle se déroule en plusieurs étapes caractéristiques (figure 4): un gonflement cellulaire, la lésion puis destruction des organites et l'altération puis destruction de la chromatine. Contrairement à l'apoptose, la nécrose n'est pas un phénomène contrôlé. La cassure de la membrane plasmique qui en résulte conduit à la libération dans le milieu extérieur du contenu cytoplasmique. Il en résulte une réponse inflammatoire médiée par les lymphocytes et les macrophages. Ainsi, la mort par nécrose est à l'origine d'une action inflammatoire de grande ampleur contrairement à l'apoptose.Enfin, techniquement il est important de préciser qu'il est possible de différencier, d'un point de vue morphologique, l'apoptose de la nécrose. Par contre, s'il existe des marqueurs spécifiques de l'apoptose, ce n'est pas le cas pour la nécrose.

Figure 4 : Mécanismes de la mort par apoptose
Légende du schéma: Pendant la phase d'initiation, le signal de mort (exemple du TNFα) active une cascade d'évènements intracellulaire qui vont aug
Suite à ces même signaux cellulaires, la cellule peut perdre le contrôle de sa mort et s'orienter vers la nécrose. La cellule gonfle, les membranes lipidiq
D'après Mattson (2000)

3-1-3 Apoptose et maladie de Parkinson

Depuis 1995, différentes équipes se sont posées les questions du mode de disparition des neurones DA lors du processus dégénératif. Mochizuki et coll (1996) a mis le premier en évidence la présence de neurones apoptotiques au sein de la SN sur des coupes post-mortem de patients parkinsoniens grâce à une technique de marquage en 3'-terminal de l'ADN. Ces résultats ont été confirmés (Tompkins et coll. 1997; Kingsbury et coll. 1998; Tatton et coll. 1998) en montrant que les neurones ainsi mis en évidence avaient d'autres signes morphologiques caractéristiques de l'apoptose comme une diminution du volume cellulaire, une irrégularité de la membrane nucléaire, une condensation de la chromatine ainsi que des corps apoptotiques parfois phagocytés par des cellules microgliales. De plus Anglade et coll. (1997) précisa encore mieux ces données grâce à la microscopie électronique. Enfin ces études chez l'humain ont aussi pu mettre en évidence une apoptose neuronale en dehors de la SN, notamment dans le pont et le colliculus supérieur. De même l'apoptose ne concerne pas que les neurones mais aussi un certain de nombre de cellules gliales. Or il est intéressant de noter que suite à une activation inflammatoire, il est fréquent d'observer l'apoptose des cellules immunitaires à la fin du cycle de l'inflammation. Il a d'ailleurs aussi été observé un certain nombre de cellules gliales nécrotiques.

Cependant, en parallèle de ces démonstrations, plusieurs autres équipes n'ont pu mettre en évidence de neurones apoptotiques dans la SN de patients (Dragunow et coll. 1995; Kösel et coll. 1997; Banati et coll. 1998; Wüllner et coll. 1999; Jellinger 2000). Certains ont voulu expliquer cette contradiction par des raisons techniques comme le temps entre le décès et la fixation du cerveau ou par rapport aux méthodes de conservation ou de coupe de ceux-ci. Pourtant, il semble que ces variations d'observation peuvent s'expliquer par le processus même de l'apoptose. En effet, il s'écoule seulement une à deux heures entre l'induction de l'apoptose et la disparition d'une cellule *in vivo*. Or selon McGeer et coll. (1988) dans un cerveau mature, l'humain perd physiologiquement de 0,5 à 0,7 % de neurones DA par an tandis qu'un patient parkinsonien en perd environ 5% par an. En admettant un nombre de 300 000 à 400 000 neurones DA dans la SN au début du processus neurodégénératif et qu'ils meurent tous par apoptose et régulièrement (ce qui n'est sans doute pas le cas), on peut compter sur un maximum de 2 neurones DA apoptotiques par heure dans la SN. Ainsi la détection de ces neurones dépend essentiellement de la taille et du nombre des coupes.

A la vue de ce raisonnement, les résultats obtenus par les équipes ayant détecté ces neurones (de 2 à 12%) soulèvent la question de la spécificité du marquage ou alors l'hypothèse d'une perte irrégulière des neurones avec des variations d'intensité du processus dégénératif de la MP.

Bien entendu ces résultats n'excluent pas la présence de neurones DA nécrotiques. Cependant, les différentes pistes étiologiques actuelles sont pour la plupart des potentiels inducteurs de l'apoptose. Ainsi, aujourd'hui, l'apoptose reste une hypothèse très sérieuse concernant la disparition des neurones. En plus, la plupart des modèles animaux ou cellulaires de la MP induits par des toxines, impliquent une mort neuronale par apoptose comme avec la 6-OHDA (He et coll. 2000).

3-2 Les hypothèses d'induction de l'apoptose

3-2-1 Le système ubiquitine/protéasome

Comme le suggèrent les gènes impliqués dans les formes familiales de la MP, le système ubiquitine/protéasome a potentiellement un rôle central.

Le protéasome est un complexe enzymatique de protéolyse. Les protéines à éliminer (physiologiquement ou suite à une mauvaise synthèse ou une mauvaise conformation) sont ubiquitinées pour être adressées au protéasome. L'ubiquitination consiste à former une queue polyubiquitinée à la protéine. Ainsi marquée, la protéine est reconnue et dégradée par le protéasome. En règle générale, un dysfonctionnement du protéasome induit l'apoptose de la cellule à cause d'agrégations protéiques. Dans la MP, les corps de Lewy pourraient correspondre à de telles agrégations.

Dans les formes familiales de la MP, les mutations identifiées concernent les gènes de la Parkin et l'ubiquitin carboxy-terminal hydroxylase L1 (impliquées dans le système ubiquitine protéasome). Ces mutations seraient responsables de l'agglutination de proteines normalement dégradées et de la mort des neurones concernés. De même l'α-synucléine mutée pourrait causer la neurodégénérescence en étant surproduite et en inhibant le protéasome. Reste à mieux comprendre la spécifité de la neurodégénérescence impliquée lors de ces mutations.

3-2-2 Exitotoxicité

La mort des neurones DA peut aussi être induite par des phénomènes de toxicité cellulaire. En effet, les neurones DA sont sensibles à différents facteurs, comme le Glutamate. Une suractivation des récepteurs NMDA (récepteurs au glutamate présent sur les neurones DA de la SN)

peut être à l'origine d'une excitotoxicité (Turski et coll. 1991). Les sources principales de glutamate au niveau de la SN sont le NST et le noyau pédonculopontin (Kita et Kitai 1987; Lavoie et Parent 1994). Comme nous l'avons déjà expliqué, suite à la dénervation DA du Striatum, le NST est suractivé. Cette suractivation pourrait être à l'origine d'une excitotoxicité vis à vis des neurones DA survivants. D'ailleurs, chez le rat, la lésion du NST protégerait les neurones DA contre la toxicité de la 6-OHDA (Benazzouz et coll.).

3-2-3 Ca^{2+}

Comme toutes les cellules de l'organisme, les neurones DA sont sensibles à une augmentation intracellulaire de concentration en Ca^{2+} libre (Rothman et coll. 1987). Cette augmentation est reconnue comme une étape de l'induction de l'apoptose. L'homéostasie calcique peut être assurée par des protéines capables de fixer le Ca^{2+} libre comme la calbaldine ou la calrétinine. Or il a été démontré une diminution de ces protéines au niveau des neurones DA de la SN sur des coupes de cerveau de patients parkinsoniens. Ces résultats proposent la possibilité d'une cytotoxicité calcique (Yamada et coll. 1990; Mouatt-Prigent et coll. 1996).

3-2-4 Les facteurs neurotrophiques

S'il existe des agents qui agissent sur la mort neuronale par leurs présences, il est aussi possible que des agents neuroprotecteurs manquent et soient responsables de la neurodégénération par leurs absences. Partant de ce postulat, certaines équipes se sont particulièrement intéressées aux facteurs neurotrophiques. Deux de ces facteurs neurotrophiques ont particulièrement été étudiés:

- Le Brain-dericed neurotrophic factor (BDNF). Le BDNF a un rôle neuroprotecteur plutôt général.
- Le Glial-derived neurotrophic factor (GDNF). Le GDNF semble avoir un rôle plutôt spécifique envers les neurones DA.

Toutefois, les résultats ne montrent pas qu'une absence de facteurs neurotrophiques ait un rôle prépondérant chez l'humain et dans différents modèles animaux de la MP (Ernfors, et coll. 1994; Hunot et coll. 1996; Granholm et coll. 1997). En revanche, l'utilisation du GDNF ou BDNF pourrait être une piste thérapeutique dans le cadre de traitements neuroprotecteurs (Weinreb et coll. 2007; Evans et Barker 2008; Peterson et Nutt 2008).

3-2-5 Le stress oxydatif

Aujourd'hui, divers éléments convergent vers un rôle important de l'action du stress oxydatif dans la mort de ces neurones. En effet, tout le monde s'accorde sur l'implication du stress oxydatif via l'action des radicaux libres. Il existe plusieurs raisons :

- Dans la SN, les neurones DA sont exposés à de grandes quantités de radicaux libres oxygénés.
- Le rôle du stress oxydatif a été montré dans d'autres affections neurodégénératives et dans certains syndromes parkinsoniens non idiopathiques.
- Les neurones préférentiellement atteints dans la MP, sont les neurones mélanisés, reconnus comme potentiellement exposés à de plus fortes quantités de radicaux libres.
- Il existe des indices de stress oxydatif chez des patients atteints de la MP, notamment la mise en évidence de dysfonctionnements mitochondriaux et d'accumulation de fer dans la SN.

Le terme « stress oxydatif » fut évoqué la première fois par Sies et Cadenas en 1985. Il désigne une variation de l'environnement due à la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène. En fonction de la capacité de la cellule à s'adapter, cette variation peut avoir des conséquences nulles ou cytopathologiques. Des situations de stress oxydatif cytopathologiques apparaissent donc lorsque la production d'espèces réactives oxygénées augmente et/ou que les systèmes de défense antioxydant sont diminués. L'accumulation des molécules oxydées peut entraîner la mort cellulaire notamment en induisant l'apoptose.

L'idée de l'intervention d'un stress oxydatif dans l'étiologie de la MP est venue suite à l'observation du mécanisme d'intoxication des neurones DA par le MPTP où les mécanismes oxydants jouent un rôle prépondérant (Bloem et coll. 1990). De plus, il a été observé des dysfonctions de la voie nigro-striatale suite à un déficit congénital en vitamine E (substance anti-oxydante; Dexter et coll. 1994). Enfin, différentes études *post-morterm* ont pu mettre en évidence le résultat de l'action du stress oxydatif au niveau de la SN. Chez les patients, il existe une augmentation des formes oxydées de lipides membranaires, protéines, ARN et ADN de manière simultanée ou non (Dexter et coll. 1989; Dexter, et coll. 1994).

Ceci peut être du à différents facteurs (figure 5). En effet, de manière constitutive les neurones DA de la SN sont les plus exposés aux radicaux libres:

- Premièrement, la dégradation de la DA se fait selon une voie enzymatique ou une voie dite auto-oxydative. Ces deux voies génèrent d'importantes quantités de radicaux libres. La Monoamine Oxydase (MAO) est une des enzymes principales de la voie enzymatique. Lors de son action, elle produit du peroxyde d'hydrogène, un précurseur direct de radicaux libres (Spina et Cohen 1989). De son côté la dégradation auto-oxydative conduit à la production de

neuromélanine (pigment présent dans de nombreux neurones DA et responsable de l'appellation de la SN). Cette production est aussi source de radicaux libres (Graham et coll. 1978). La mélanine possède elle-même un fort potentiel générateur de radicaux libre via son affinité avec le Fer (Ben-Shachar et Youdim 1990). Ces interactions Fer favorisent la transformation du fer ferreux (Fe^{2+}) en fer ferrique [(Fe^{3+}), (Swartz, et coll. 1992)]. Cette ionisation est génératrice de radicaux libres par la réaction de Fenton (boîte 2). Cette affinité particulière avec le Fer est d'autant plus importante que la SNpc est une des régions cérébrales les plus riches en fer (Jellinger et coll. 1992; Sofic et coll. 1991).

- Deuxièmement, les neurones DA contiennent d'importantes quantités de mitochondries. Or la chaîne respiratoire dans la membrane interne des mitochondries est une source de production importante de radicaux libres.
- Troisièmement, l'hétérogénéité de la perte neuronale au sein de la SN est aussi un argument en faveur d'un rôle du stress oxydatif. En effet, la localisation des lésions est corrélée avec la vulnérabilité au stress oxydatif des neurones DA. Dans la SNpc (zone la plus atteinte), les mécanismes de défense ne sont pas également répartis. Par exemple, une des enzymes de détoxification des radicaux libres est la glutathion peroxydase. Seuls les astrocytes possèdent cette enzyme dans le parenchyme cérébral, or la SNpc est une des régions cérébrales où les astrocytes sont les moins présents (Damier et coll. 1993), limitant ainsi les coopérations cellulaires de détoxification. Au contraire la région périacqueducale (quasi-préservée) est très riche en astrocytes. De plus il n'y a pas de neuromélanines dans les neurones de cette région (Hirsch et coll. 1988) ce qui semble aussi diminuer leur vulnérabilité au stress oxydatif.
- De plus, la SN est une région du SNC particulièrement riche en microglie, or l'inflammation, médiée dans le cerveau par la microglie peut être source de stress oxydatif et de production de molécules cytotoxiques comme le TNFα et l'IFNg. La présence de cellules microgliales activées, observées dans la SN de patient ou dans de nombreux modèles de la MP, pourrait participer au processus neurodégénératif. La forte densité microgliale dans la SN et la grande sensibilité des neurones DA au stress oxydatif sont à l'origine de plusieurs hypothèses émises récemment sur le rôle potentiel de l'inflammation (Hald et Lotharius 2005).
- Soit dans un phénomène de cercle vicieux (mort des neurones DA entraînant une inflammation provocant la mort d'autres neurones DA...).
- Ou même d'un rôle primaire de l'inflammation.

  Nous reviendrons plus précisément sur le rôle de l'inflammation par rapport à la MP.

Boîte 2. Le Fer et les espèces oxygénées actives.

La combinaison du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) avec les ions ferreux Fe^{2+} conduit à la formation de radicaux hydroxyles ($OH^{\bullet}$) extrêmements réactifs, selon une réaction décrite pour la première fois en 1894 par Fenton:

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^-$$

Les ions ferriques Fe^{3+} qui résultent de la réaction de Fenton peuvent à leur tour être réduits par différents réducteurs comme l'acide ascorbique ou le glutathion, mais également par les anions $O_2^{\bullet -}$ (Halliwell, 1992):

$$O_2^{\bullet -} + Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$$

Par ce processus, les $O_2^{\bullet -}$ peuvent régénérer les catalyseurs Fe^{2+} de la réaction de Fenton accélérant ainsi la production d'$OH^{\bullet}$ à partir d'H_2O_2. La combinaison de ces différentes réactions aboutie à la réaction dite d'Haber-Weiss (1934):

$$H_2O_2 + O_2^{\bullet -} \xrightarrow{Fe\ (catalyseur)} OH^{\bullet} + OH^- + O_2$$

L'ensemble de ces données désigne le stress oxydatif comme un des acteurs principaux de la dégénérescence neuronale au niveau de la SN et suggère même qu'un déséquilibre dans la gestion de ce stress, puisse être à l'origine de la mort des neurones. Cependant, il est très difficile de discerner si l'augmentation du stress oxydatif est une cause ou une conséquence de la neurodégénérescence.

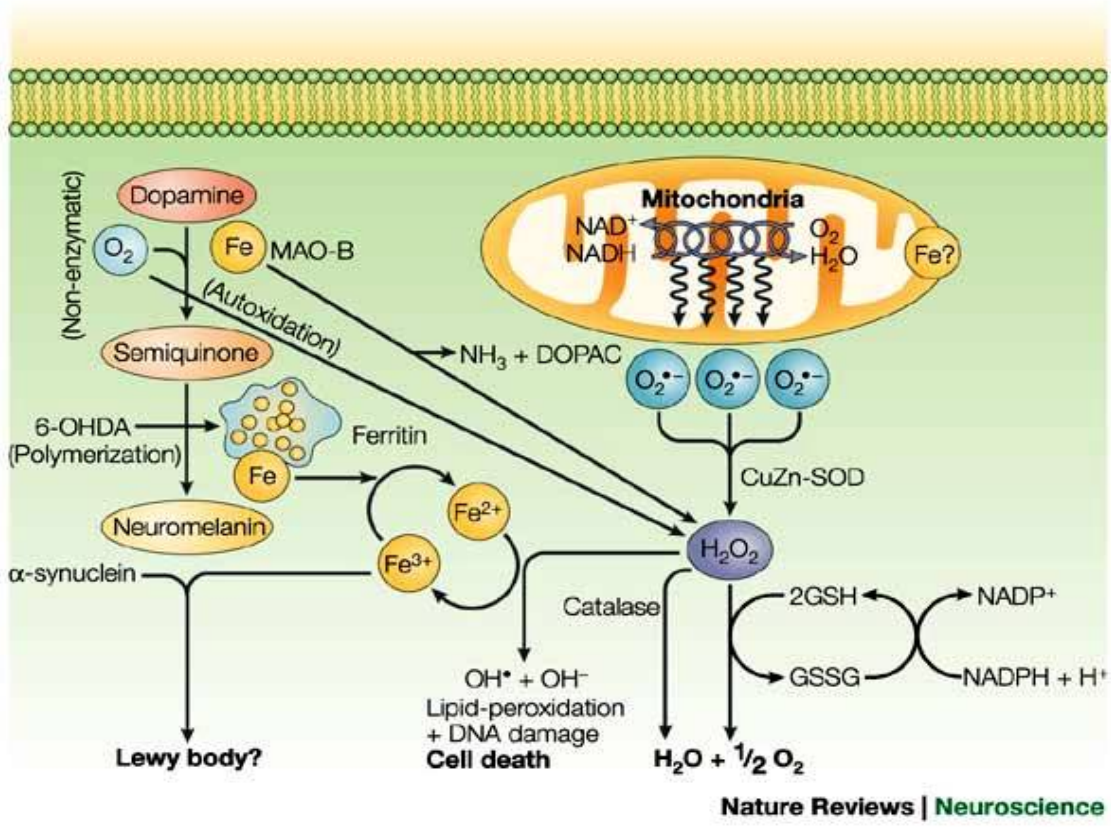


Figure 5 | Hypothèse impliquant le fer et le stress oxydant dans la MP. Ce schéma résume les découvertes pathochimiques dans la MP, et tente d'expliquer les cascades synergiques, impliquant le stress oxydant, pouvant conduire à la mort neuronale. Ce modèle est basé sur les découvertes des études post 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).

Ainsi, des hypothèses exposées précédemment concernant l'origine de la dégénérescence, le stress oxydatif semble être une des plus intéressantes. Les autres n'en sont pas néanmoins incompatibles. L'exitotoxicité pouvant être liée à un déséquilibre calcique intracellulaire. Ainsi, comme pour son origine, les mécanismes et l'évolution de la MP semblent plurifactoriels.

Enfin, il est important de préciser que les études menées *post-mortem* concernent la plupart du temps un stade avancé de la maladie. Ainsi les événements biochimiques mis en exergue représentent le bout d'une chaîne complexe plutôt que le début de celle-ci, d'où

l'intérêt des investigations menées sur les modèles animaux de la MP, afin d'appréhender des phénomènes plus en amont.

De même, il est important d'élargir les pistes, en particulier celles des interactions cellulaires. En effet, nous nous sommes concentrés sur la perte des neurones DA qui est à l'évidence l'évènement le plus conséquent de la MP. Cependant le parenchyme cérébral est aussi composé en grande partie de cellules gliales. Le rôle de ces cellules de la glie et leurs interactions peuvent avoir un rôle moteur ou au contraire de frein dans le cadre de la MP.

En conclusion, la MP est, aujourd'hui, aussi bien définie cliniquement que anatomopathologiquement. Ces connaissances ont permis, à ce jour, le développement de traitements symptomatiques efficaces. Cependant les causes et les origines du processus dégénératif ne sont pas encore clairement comprises. De ce fait, à part la découverte de certaines mutations responsables de la MP, il n'existe encore aucun moyen prédictif. Toutefois, les pistes étiologiques présentées précédemment sont de bonnes bases pour nombres d'études visant à développer des nouvelles stratégie thérapeutiques qui ralentiraient ou stopperaient le processus dégénératif voire remplaceraient les neurones perdus.

4 Les traitements actuels

La caractérisation anatomopathologique de la MP a permis de mieux la comprendre la maladie afin de lutter contre ces symptômes. Actuellement, il existe des traitements symptomatiques, mais malheureusement il n'existe encore aucun traitement curatif à proprement parler. En effet le déclenchement, puis l'entretien voire les raisons de la mort des neurones DA ne sont pas encore assez connus. Cependant la bonne connaissance du reste de la maladie permet de réduire les effets handicapant des symptômes, ce qui est un avantage non négligeable comparé aux autres maladies neurodégénératives dépourvues de tels traitements.

4-1 Approche pharmacologique

L'origine des symptômes moteurs de la MP étant essentiellement liée au déficit DA dans le Striatum, il est logique que la réflexion sur les traitements potentiels ait tourné autour d'un rétablissement de la concentration DA dans le striatum. Ainsi, le traitement de la MP a connu 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 est cependant souvent à l'origine à moyen terme d'effets indésirables (fluctuations d'efficacité du traitement et dyskinésies). Ensuite les agonistes DA ont été ajoutés à l'arsenal thérapeutique avec l'intérêt de réduire le risque de ces complications motrices. Enfin, le traitement a été optimisé avec l'utilisation d'inhibiteurs enzymatiques permettant de potentialiser l'effet de la L-DOPA. Le rétablissement de la transmission DA déficiente reste actuellement la base du traitement de la MP.

4-1-1 DOPAthérapie

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. Il s'agit du précurseur direct de la dopamine (figure 6). Contrairement à cette dernière, elle est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE), permettant aux neurones nigrostriaux encore actifs de synthétiser de la dopamine par décarboxylation via la DOPA-décarboxylase. En outre, d'autres cellules comme les neurones sérotoninergiques ou les cellules gliales pourraient également capter la L-DOPA et la décarboxyler en DA lorsque les neurones DA sont en faible nombre (Schwarting et Huston 1996). Ces différentes possibilités permettent une augmentation de la concentration DA au niveau du parenchyme cérébral et donc au niveau du striatum. Cependant, la L-DOPA, administrée par voie orale, peut également être décarboxylée en périphérie et entraîner des nausées, des vomissements et de l'hypertension artérielle. Pour réduire ces effets indésirables, 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). 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 l'évolution de la concentration plasmatique en L-DOPA, et des troubles moteurs ré-apparaissent. Ces sont les fluctuations d'efficacité du traitement. Au début la symptomatologie parkinsonienne apparaît à distance des prises médicamenteuse, puis avec l'évolution de façon plus anarchique et parfois de manière brutale (phénomènes dits « on-off »). A côté des fluctuations se développe chez un grand nombre de patients une nouvelle symptomatologie, les dyskinésies, 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 traitements: des dyskinésies, c'est à dire 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.

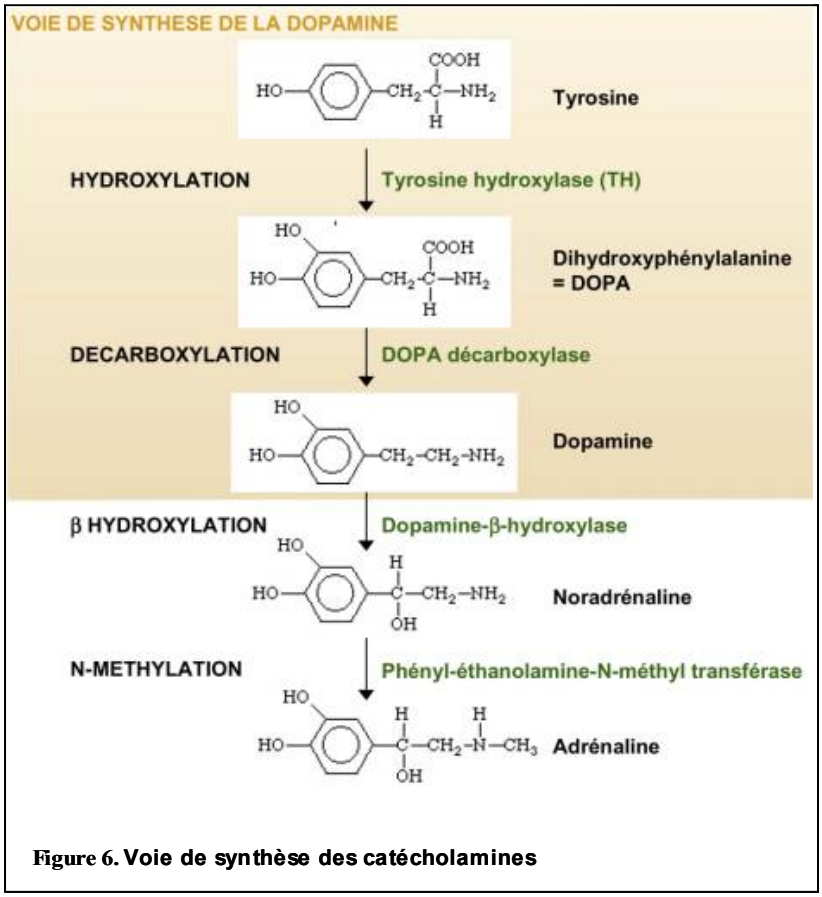


Figure 6. Voie de synthèse des catécholamines

4-1-2 Les agonistes dopaminergiques

En raison de ces complications, il a été développé de nouveaux traitements pharmaceurtiques à partir d'agonistes DA. Les agonistes DA agissent directement sur les récepteurs de la DA (dont il existe 5 catégories). Les agonistes dopaminergiques utilisés en clinique humaine stimulent principalement les récepteurs D2 (initialement considérés comme étant seuls impliqués dans les effets moteurs de la dopamine). On distingue deux classes parmi ces produits. Les plus anciens appelés "ergopeptines" (car ils sont dérivés des alcaloïdes de l'ergot de seigle). Ils possèdent, outre des propriétés agonistes dopaminergiques, des propriétés alpha - adrénergiques ou sérotoninergiques, pouvant être 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 (Koller et Tolosa 1998).

Les agonistes DA sont recommandés en monothérapie pour le traitement initial afin de réduire le risque d'apparition des dyskinésies (Damier 2002b; Rascol et coll. 2002; Rascol 1999; Schwarz 2003). Cependant, ils semblent moins efficaces que la L-DOPA en monothérapie et une association avec cette dernière s'avère souvent nécessaire après quelques années. En outre, la moins bonne tolérance cognitive et psychiatrique des agonistes DA par rapport à la L-DOPA en fait réserver l'utilisation à des sujets relativement jeunes (<60 à 70 ans; Inzelberg et coll. 1996).

4-1-3 Inhibiteurs enzymatiques

Afin de potentialiser l'effet thérapeutique de la L-DOPA, elle peut être associée à des inhibiteurs d'enzymes participant à sa dégradation.
La monoamine-oxydase (MAO) a été la première cible pharmacologique dans ce domaine avec l'utilisation d'un inhibiteur non compétitif sélectif de la MAO-B. En inhibant la dégradation de la DA cérébrale, ce produit prolonge effectivement la durée d'action de la L-DOPA ce qui lui confère un léger effet symptomatique propre (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. Les ICOMT augmentent la biodisponibilité de la L-DOPA. 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).

Si le déficit DA dans le Striatum est à l'origine de l'apparition des symptômes moteurs, cela est du au dysfonctionnement du Striatum qui se répercute directement sur les autres structures qui lui sont liées au niveau des ganglions de la base. Le fonctionnement de ces structures est donc aussi altéré. Les neurones du NST ou ceux du globus pallidus intrene (Gpi) se retrouvent ainsi hyperactifs. Il est donc possible d'améliorer les symptômes moteurs agissant à ce niveau. Il existe actuellement des traitements chirurgicaux ciblant ces structures.

4-2 Le traitement chirurgical: La stimulation cérébrale profonde

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

L'idée que la stimulation cérébrale profonde (ou stimulation à haute fréquence) puisse 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. (1987) 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. Ces résultats ont été confirmés par d'autres équipes (Blond et coll. 1992; Tasker et coll. 1997) et ont ainsi offert 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, ainsi que certains effets secondaires de la L-DOPA permettant souvent la réduction du dosage de celle-ci. Le NST est considéré maintenant comme une cible privilégiée (figure 7).

Une étude récente sur des singes MPTP, (Drouot 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.

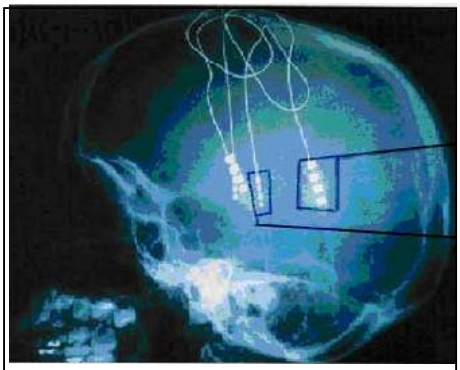


Figure 7 : Electrodes quadripolaires implantées de manière bilatérale dans le noyau subthalamique d'un patient parkinsonien

Ainsi, les patients atteints de la MP peuvent voir leurs symptômes limités ou même éliminés grâce à un rétablissement de la concentration DA au niveau du striatum via la DOPAthérapie. Le dysfonctionnement du striatum peut aussi être pallié en intervenant en aval de celui-ci via l'inhibition du SNT électrophysiologiquement. Cependant, les neurones continuent à dégénérer et donc la maladie ne cesse d'évoluer, rendant les traitements utilisés moins efficaces. Il est donc important de pouvoir compter à terme sur des traitements curatifs qui stopperaient la mort des neurones.

5 Perspectives thérapeutiques

Deux grands axes de nouveaux traitements se sont développés dans les 20 dernières années :
- Des traitements visant à agir sur les processus dégénératifs. Ces traitements ont pour vocation d'augmenter la neuroprotection en augmentant plus ou moins artificiellement la présence de facteurs neurotrophiques ou en limitant les processus inflammatoires et de stress oxydatif.
- Des traitements visant à remplacer les neurones disparus. Le but de ces traitements est de rétablir une circuiterie DA innervant le striatum via la transplantation de nouvelles cellules.

5-1 Thérapies visant à agir sur le processus dégénératif

5-1-1 Les traitements anti-oxydants

Expérimentation

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le stress oxydant est certainement un des facteurs principaux induisant la mort des neurones DA. Différentes études ont donc été menées sur des modèles animaux avec des résultats encourageants concernant le potentiel neuroprotecteur d'agents anti-oxydants (résumé dans le tableau 1).

Agents anti-oxydants	Modèle utilisé
Deprenyl* (inhibiteur MAO)	MPTP
α-tocopherol (vitamine E)* (anti-oxydant direct)	6-OHDA
7-nitroindazole (inhibiteur Nitric Oxyde synthase)	MPTP, AM
L-NAME (inhibiteur Nitric Oxyde synthase)	AM
S-méthylthiocitrulline (inhibiteur Nitric Oxyde synthase)	MPTP
PBN/S-PBN	MPTP
Desferrioxamine	6-OHDA
Benzamide	MPTP
nNOS*	MPTP
SOD Tg	MPTP, 6-OHDA

Tableau 1 : 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.

Résultats chez l'humain

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 (comprenant 800 patients) 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 (Anon 1993). En revanche, l'α-tocophérol était sans effet. 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 1998). Au final, l'inhibition de la MAO peut avoir un rôle antioxydant mais permet aussi d'augmenter la concentration en DA dans le cerveau car elle est moins dégradée. Il est donc impossible de déterminer exactement le mécanisme positif du déprényl (Olanow et coll. 1998).

Ainsi les traitements antioxydants sont efficaces sur les modèles animaux de la maladie de Parkinson. En revanche, l'essai clinique DATATOP a montré des résultats chez l'homme beaucoup plus modestes.

5-1-2 Les traitements anti-apoptotiques

Il est de plus en plus évident que l'apoptose soit le mode de mort des neurones DA dans la MP. Cependant, les mécanismes de l'apoptose sont complexes et l'action de mort de la cellule résulte d'une longue et complexe cascade protéique comme nous l'avons vu précédemment.

En utilisant des modèles expérimentaux de la maladie de Parkinson (essentiellement des souris génétiquement modifiées), le rôle d'un grand nombre de protéines impliquées dans l'apoptose a été logiquement mis en évidence dans la perte des neurones. Par exemple, des souris transgéniques surexprimant Bcl2 (molécule anti-apoptotique; Offen et coll. 1998; Yang et coll. 1998), et des souris n'exprimant plus P53 (molécule pro-apoptotique; Trimmer et coll. 1996) présentent un déficit DA significativement inférieur aux souris sauvages suite à l'intoxication au MPTP. D'autres études ciblant différentes molécules anti ou pro-apoptotiques ont permis d'émettre certaines hypothèses. Ainsi, le MPTP pourrait jouer l'expression du gène pro-apoptotique bax chez la souris (Hassouna et coll. 1996; Perier et coll. 2005; Perier et coll. 2007). 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+. Dans les mêmes modèles, les chaînes de transductions impliquant les protéines Fas ou Bcl ont été mises en avant comme signaux clefs interférant avec la mort induite des neurones DA.

L'utilisation de substances anti-apoptotiques peut donc sembler être un traitement de choix.

D'ailleurs, in vitro, des inhibiteurs de la caspase 3 [la protéase zVAD-fmk (N-benzyloxycarbonyvaline-alanine-aspartate-(OMe)-¯fluoromethylketone) et l'Ac-DEVD-CHO (acétyle-aspartate-glutamate-valine-aspartate-aldéhyde)] atténuent la mort des neurones dopaminergiques par le MPTP (Dodel et coll. 1998).

Cependant, si ces résultats sont encourageants, tous les mécanismes de l'apoptose ne sont pas encore connus. Ils sont complexes et mettent en jeu de nombreuses protéines pouvant faire intervenir des voies de compensation (Zheng et coll. 2000). Mais le problème principal reste le contrôle des substances anti-apoptotiques, l'apoptose ayant un rôle majeur dans la protection de l'organisme en particulier pour l'élimination des cellules cancéreuses. Or le risque de cancer augmentant avec l'âge comme le risque de MP, l'utilisation de traitement anti-apoptotique peut s'avérer être un risque pour un bénéfice non encore prouvé.

Ainsi, les traitements anti-apoptotiques constituent une approche encore trop récente et techniquement complexe (implication de toute une série de gènes associés à toute une série de signaux physiologiques) pour être envisagés chez l'humain

5-1-3 Les thérapies anti-excitotoxiques

Comme nous l'avons évoqué dans l'étiologie de la MP, des phénomènes d'excitotoxicité participent sans doute 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, sur des modèles animaux de la MP, que l'utilisation de différents antagonistes du récepteur NMDA pouvait améliorer les symptômes parkinsoniens comme la rigidité et l'akinésie (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, les résultats obtenus sont controversés par d'autres équipes qui ne réussissent pas à les reproduire. (Sonsalla et coll. 1992). Par ailleurs, il semble que certains antagonistes retarderaient la toxicité du MPTP sur les neurones de la SNpc mais ne les protégeaient pas à long terme (Chan et coll. 1997). Enfin, la suppression du 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, l'excitotoxicité jouant un rôle certain dans la neurodégénérescence de

la MP, un traitement anti-excitotoxique pourrait avoir des effets neuroprotecteurs et au minimum un effet symptomatique.

5-1-4 Les traitements anti-inflammatoires

Expérimentation

L'inflammation a potentiellement un rôle délétère au niveau de la SN à cause de l'activation microgliale et de la perméabilisation de la BHE comme nous le détaillerons plus tard.

Chez l'humain, seul l'effet neuroprotecteur des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) a été étudié. L'éventuel effet bénéfique des AINS provient de leur effet anti-inflammatoire suite à l'inhibition des protéines COX (cyclooxygénase) et en particulier COX-2. Celle-ci jouant un rôle direct dans la mise en place du stress oxydatif médié par la microglie (Teismann et coll. 2003, Hunot et coll. 2004), ce stress oxydatif étant susceptible d'être délétère pour les neurones DA. En effet, différentes études ont montré un effet neuroprotecteur de certain AINS chez les souris intoxiquées au MPTP (tableau2).

De plus, les manipulations génétiques sur des souris ont montré que les molécules COX2 et iNOS pouvaient être particulièrement intéressantes dans le développement de ces stratégies (Hirsch et coll. 2003). Cependant, il apparaît que la manipulation d'une seule voie spécifique des processus inflammatoires ne protégerait pas de la dégénérescence des neurones DA dans la MP. Ainsi, des molécules avec un spectre d'action plus large seraient plus susceptibles de protéger ces neurones de la dégénérescence.

Les AINS sont aussi des activateurs du « peroxisome proliferator-activated receptor-γ » (PPAR-γ; un inhibiteur de NFkB) et des inhibiteurs de NFkB. Le NFkB est reconnu pour son rôle dans la transduction de signaux pro-inflammatoires. Or l'utilisation d'agoniste de PPAR-γ comme le pioglitazone diminue la neurodégénérescence DA dans la SNpc de souris intoxiquées au MPTP (Breidert et coll. 2002). Les AINS sont donc de bon candidats pour réduire les phénomènes inflammatoires, leurs effets neuroprtecteurs lors d'intoxication au MPTP sont résumés tableau 2

Substance	Action	Dose	Model	Regimen	Parameter	Protection
salicylate	COX1/2, NFκB, radicals ↓	100 mg/kg ip −1h or +1h	MPTP mouse [1]	1× 15 mg/kg sc † 2ds	ST: DA, metabolites	complete
		50 mg/kg ip −0.5h 2×	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	1× 15 mg/kg sc † 2ds	ST: DA, metabolites	complete
		100 mg/kg ip −0h	MPTP mouse	1× 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	1× 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	1× 15 mg/kg sc † 2ds	ST: DA, metabolites	none
diclofenac	COX1/2	100 mg/kg ip −1h	MPTP mouse	1× 15 mg/kg sc † 2ds	ST: DA, metabolites	none
ibuprofen	COX1/2, PPAR_/γ	20 mg/kg ip −1h	MPTP mouse	1× 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 1×/2ds until †	MPTP mouse (age 8-10 ms)	4×10 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 2: Effet des AINS sur des modèles expérimentaux de MP par intoxication de souris au MPTP
D'après Hirsh et coll. 2003

Ainsi, ces résultats montrent que l'inflammation 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'humain.

Chez l'humain

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. Dernièrement, différentes études cliniques rétroactives sur des cohortes de patients prenant des AINS ont cherché à mettre en évidence un lien entre la prise de tels traitements et l'apparition de MP. Les premiers résultats obtenus semblaient encourageants, mais sur les 3 dernières études (Ton et coll. 2006; Bornebroek et coll. 2007; Etminan et coll. 2008) ne parviennent pas à mettre en évidence de lien entre la prise d'AINS et la diminution du risque de MP.

5-1-5 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, la neurotrophine 3, et surtout le GDNF (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 l'intoxication 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 (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 coll. 2003).

5-2 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 ambitieuse puisqu'elle vise à remplacer les neurones dopaminergiques morts par d'autres neurones embryonnaires.

5-2-1 L'expérimentation animale

Le parenchyme cérébral adulte est un terrain très peu propice à la croissance axonale. C'est pourquoi la réinnervation du striatum à partir de neurones implantés dans la substance noire est extrêmement limitée (Isacson et Deacon 1997), cependant, une croissance axonale locale reste possible (Gaillard et coll. 2007). Ce type de greffe, effectué 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 (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 (Herman et Abrous 1994). Ces expérimentations ont également montré que des neurones foetaux allogéniques survivaient efficacement dans le striatum sans traitement immunosuppresseur. 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 foetus humains.

5-2-2 L'allotransplantation en clinique

Les bénéfices apportés par les greffes de neurones dopaminergiques chez les patients parkinsoniens peuvent être évalués grâce à une technique d'imagerie médicale associés à des marqueurs particuliers: la tomographie par émission de positons (dite TEP, ou PETscan). Dans la maladie de Parkinson, la fluoro-DOPA ([18F]-L-DOPA) 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 8; Remy et coll. 1995; Brooks 2003).

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. 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. 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 résultats encourageants ont été confirmés 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 (Lindvall et coll. 1992; Lindvall et coll. 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. Ils mettent en évidence l'intégration d'un greffon fonctionnel à l'origine d'une amélioration du traitement. Ainsi, durant les 15 dernières années, plusieurs études cliniques ont été menées chez plus de 350 personnes atteintes de maladie de Parkinson. (Widner et coll. 1992;

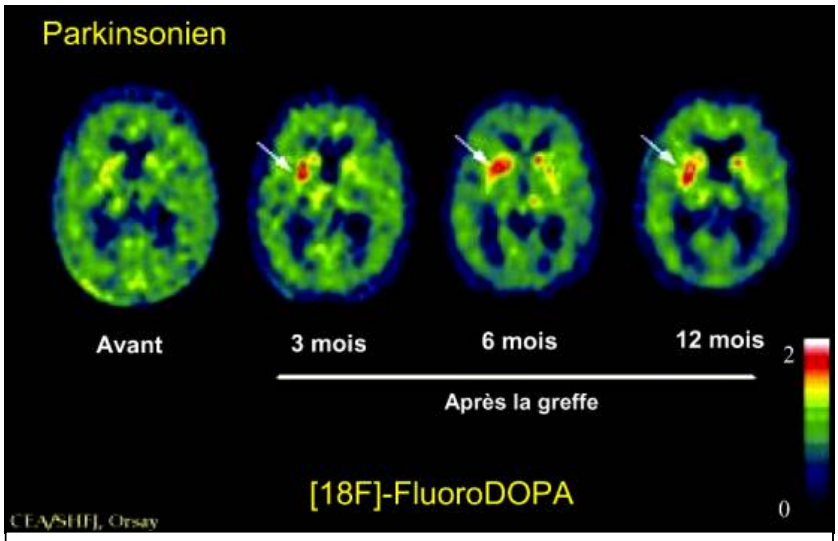


Figure 8 : Le suivi de l'effet des greffes neuronales *in vivo* par TEP

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 3ème 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.

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. 1999). Il s'en est suivi 2 essais en « double aveugle » 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. 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. 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 (Winkler et coll. 2005).

Par ailleurs, l'étude des greffons de patients décédés a permis de mettre en évidence des inclusions cytoplasmiques semblables à des corps de Lewy dans les neurones greffés (Li et coll. 2008; Kordower et coll. 2008). Ces résultats suggéreraient une possible extension de l'évolution de la MP à de nouveaux neurones DA en contact avec le striatum.

Ainsi, des résultats positifs indiscutables ont été obtenus chez les patients (Peschanski et coll. 1994; Kordower et coll. 1995). Néanmoins, si la survie des greffons semble actuellement correcte, un grand nombre d'inconnues persiste. 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.

En conclusion, 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 des connaissances sur la physiopathologie de la maladie en particulier grâce à l'utilisation de modèles animaux, a permis l'apparition de nouvelles stratégies thérapeutiques. Si les résultats obtenus chez l'animal sont souvent encourageants, il s'avèrent souvent moins positifs que prévu chez l'humain. Il est donc nécessaire de continuer les études chez l'animal, si possible avec des modèles le plus proche possible de la MP humaine.

6 Les modèles actuels de la maladie

Afin de mieux appréhender les causes et les conséquences d'une maladie, il est important de disposer de « versions » animales de celle-ci. Concernant la MP, les animaux ne la développent pas spontanément. Pour étudier celle-ci et mieux comprendre ses mécanismes, il est donc nécessaire de l'induire « artificiellement » chez certains animaux. L'induction « artificielle » de la maladie explique les lacunes de connaissances concernant l'étiologie de la MP. Les modèles peuvent être produits à partir de différents types d'animaux et l'induction peut se faire de plusieurs manières. Ces modèles étant des versions « schématiques » de la MP, ils ne répondent pas tous à la même question. Il est donc important de bien choisir le mode d'induction et le type d'animal en fonction du but de l'étude (mécanismes, conséquences, mise au point de nouveaux traitements...).

6-1 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 Bender 2000). Sa facilité de stockage et sa reproduction rapide permettent de travailler sur des milliers d'animaux en même temps et d'analyser un grand nombre de gènes. Cependant, même si ce modèle apporte des données très intéressantes, il reste trop éloigné des mammifères et donc de l'humain.
- ✓ La souris est un animal de laboratoire facile à stocker, peu cher, dont la neuroanatomie présente des similitudes avec celle de l'humain. De plus, il est possible d'obtenir des animaux pratiquement identiques sur le plan génétique. On peut bénéficier plus facilement avec cet animal, des 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 excepté la facilité d'effectuer de la transgénèse. C'est un bon compromis entre les différentes espèces possible. En effet, sa neuroanatomie est très bien définie et sa taille permet de pratiquer la chirurgie stéréotaxique avec précision. Son génome est bien caractérisé ce qui permet l'utilisation de la plus part des outils de la biologie moléculaire. Enfin, il existe différentes souches génétiquement plus ou moins semblables, ce qui permet de nombreuses possibilités d'études *in vivo*. Lors de ce chapitre, nous développerons donc plus précisément les modèles de MP chez le rat.

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

6-2 Les différents modes d'induction de la Maladie de Parkinson

Il existe deux grands types d'inductions de la MP chez les animaux:

- L'expression d'un gène muté observé dans une forme familiale de la MP.
- L'intoxication des neurones DA de la SN.

6-2-1 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 (α-syn) et ces mutations chez l'humain ont fait l'objet d'un grand nombre d'études. La réalisation de souris transgéniques porteuses de ces mutations dans le gène de l'α-syn a permis d'obtenir un modèle de la maladie de Parkinson (Abeliovich et coll. 2000). Les souris surexprimant l'α-syn mutée humaine présentent également des déficits moteurs; des inclusions similaires aux corps de Lewy sont présentes dans de nombreuses régions du cerveau (van der Putten et coll. 2000; Matsuoka et coll. 2001; Giasson et coll. 2002; Lee et coll. 2002; Steece-Collier et coll. 2002). C'est donc un bon modèle pour l'étude de l'étiologie de la MP. Cependant, ces souris ne présentent qu'une faible perte des neurones DA.

L'expression de l'a-synucleine mutée chez le rat

Il est beaucoup plus difficile d'obtenir des rats génétiquement modifiés que des souris. Ainsi, les différents modèles d'expression d'α-syn mutées chez le rat sont du à l'injection de vecteurs viraux. Ces techniques ont les mêmes inconvénients que l'utilisation de toxine chez le rat: utilisation de chirurgie stéréotaxique avec rupture de la BHE (Recchia et coll. 2008). Par contre, l'utilisation de modèle génétique permet l'apparition d'inclusion cytoplasmique proche des corps de Lewy (Kirik et coll. 2002).

L'α-syn étant directement impliquée dans l'action du protéasome, des modèles d'inhibition du protéasome ont aussi été mis au point chez le rat (McNaught et coll. 2004).

6-2-2 Les modèles par intoxication

Il existe deux grands types de toxines spécifiques des neurones DA utilisées: Le MPTP et la 6-OHDA. Récemment des modèles à partir de substances présentes dans la composition de certains insecticides comme la roténone ou le pasquat ont été testés, mais ne sont pas encore totalement mis au point.

Les modèles MPTP

Comme décrit précédemment, la neurotoxicité du MPTP a d'abord été mis en évidence chez l'Homme suite à une épidémie de syndromes extrapyramidaux sévères chez des toxicomanes en Californie. L'analyse de ces cas a permis l'identification du toxique responsable, le MPTP (Davis et coll. 1979; Langston et coll. 1983). Plus particulièrement c'est sa forme ionique oxydée MPP^+ qui s'avère être l'agent réactif (figure 9). La proximité de ce syndrome clinique et neuropathologique avec la MP a amené les chercheurs à développer un modèle utilisant cette toxine chez le rat. Cependant, après injections systémiques aucun des effets observés chez l'humain n'a été observés chez le rat (Sahgal et coll. 1984). En effet, le rat a la particularité, contrairement aux souris, aux singes et à l'humain, de posséder une grande quantité de MAOB 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, alors que cette méthode fonctionne très bien chez la souris et le singe (Kolata 1983). D'où, pour travailler chez le rat, il faut 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; Przedborski et coll. 2004). Ainsi le modèle MPTP est plus avantageux chez la souris et le singe.

MPTP chez la souris

Le modèle de souris MPTP est facile d'utilisation (injections systémiques) et présente des lésions bilatérales de la substance noire. Les animaux ainsi intoxiqués présentent des symptômes de la maladie de Parkinson (Sedelis et coll. 2001). De plus, le traitement par la L-DOPA améliore la

symptomatologie. Cependant, ce traitement n'induit pas clairement de dyskinésie. Si la taille de l'animal limite les études comportementales, c'est un bon modèle pour étudier les mécanismes moléculaires de la MP et les phénomènes inflammatoires l'accompagnant (Liberatore et coll. 1999; Vila et coll. 2001).

MPTP chez le rat

L'utilisation de MPTP chez le rat implique une injection directe au niveau de la voie nigro-striée. Ce modèle présente une lésion partielle de la SN et du striatum. Il possède peu d'altération motrice et il est donc essentiellement utilisé pour étudier les troubles cognitifs (Bellissimo et coll. 2004; Da Cunha et coll. 2001; Da Cunha et coll. 2003; Braga et coll. 2005).

MPTP chez le primate

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 (Langston et coll. 2000), qui sont quantifiées en utilisant une échelle d'évaluation humaine (Schneider 1989; Boyce et coll. 1990; Gomez-Mancilla et Bédard 1993; Brotchie et Fox 1999).

Comme dans la maladie, les neurones DA de la SNpc sont particulièrement vulnérables 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.

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.

L'utilisation du MPTP est donc surtout intéressante chez la souris et le singe. Il permet

d'obtenir de bons modèles mécanistiques de la MP. Par contre, chez la souris, le comportement est difficile à étudier. Chez le singe, le MPTP est à l'origine du modèle animal le plus proche de la MP, mais l'utilisation de primates non humains est plutôt logiquement utilisé pour confirmer des résultats obtenus chez les rongeurs avant de passer chez l'humain. D'où l'intérêt de l'utilisation d'autres modèles chez le rat.

Les modèles de rats 6-OHDA

La 6-OHDA est une forme hydroxylée de la dopamine. Ses propriétés neurotoxiques ont été mises en évidence au niveau du système nerveux périphérique. En effet, il a d'abord été montré que l'injection systémique de 6-OHDA entraîne la dégénérescence des terminaisons catécholaminergiques (noradrénergiques) du système nerveux sympathique (Thoenen et Tranzer 1968). Par contre, ces injections sont sans effet sur le système nerveux central car la 6-OHDA ne franchit pas la barrière BHE. Ainsi, les premières études de la toxicité de la 6-OHDA au niveau du SNC ont été réalisées par injection intracérébrale, plus précisément, intraventriculaire (Ungerstedt 1968; Blum et coll. 2001a). Ces injections entraînent une déplétion sévère et générale du système catécholaminergique du SNC.

De manière plus spécifique, la 6-OHDA permet aussi la réalisation de modèle de dénervation de la voie dopaminergique nigro-striatale en étant injectée directement dans le striatum, la substance noire ou le faisceau médian du télencéphale (FMT; Schwarting et Huston 1996; Tolwani et coll. 1999; Blum et coll. 2001a). Ce mode de destruction de l'innervation DA par injection de 6-OHDA directement dans un de ces éléments par stéréotaxie est utilisé pour mimer chez l'animal (en particulier le rat) la perte neuronale observée dans la MP.

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. 2001b). 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. Enfin, une prolongation de l'action de la 6-OHDA est obtenue par l'administration d'un inhibiteur des monoamines oxydases (la pargyline).

Les mécanismes de toxicité de la 6-OHDA sont médiés par l'induction d'un stress oxydatif via la genèse de composés réactifs de l'oxygène et par l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale (Blum et coll. 2001b; figure 9). 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 mitochondrial sont deux phénomènes impliqués dans les processus dégénératifs de la MP.

Il existe de la 6-OHDA endogène naturellement présente au niveau des neurones DA. Cette 6-OHDA serait produite à partir de la DA. Bien que celle-ci soit un neurotransmetteur naturel dans le SNC, elle peut s'avérer être toxique. Ainsi, dans les conditions physiologiques, la DA est séquestrée dans des vésicules intracellulaires afin d'être isolée du cytoplasme et du milieu extra-cellulaire. En effet, la DA peut s'auto-oxyder dans le cytoplasme pour donner de la 6-OHDA avec les conséquences décrites précédemment. Partant entre autre de cette idée, différentes études ont montré une toxicité potentielle de la DA *in vitro* et *in* vivo (Jellinger et coll. 1995; Pileblad et coll. 1988; Michel et Hefti 1990). Ainsi, dans certaines conditions particulières la DA s'avère toxique, ce qui en fait aussi un autre facteur de risque d'exposition au stress oxydatif pour les neurones DA.

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.

L'utilisation de la 6-OHDA comme toxine de la voie nigro-striée est utilisée en injection directe. Il existes 3 points d'injection principaux: La SN, le FMT et le striatum (Deumens et coll. 2002). Il est possible de contrôler le degré de perte DA en utilisant des doses de 6-OHDA différentes. Les injections peuvent se faire de manière uni- ou bi-latérale. Actuellement, il existe donc plusieurs modèles de rat 6-OHDA. L'intoxication du rat permet l'utilisation de différents tests moteurs permettant un suivi clinique des perturbations motrices ou cognitives induites.

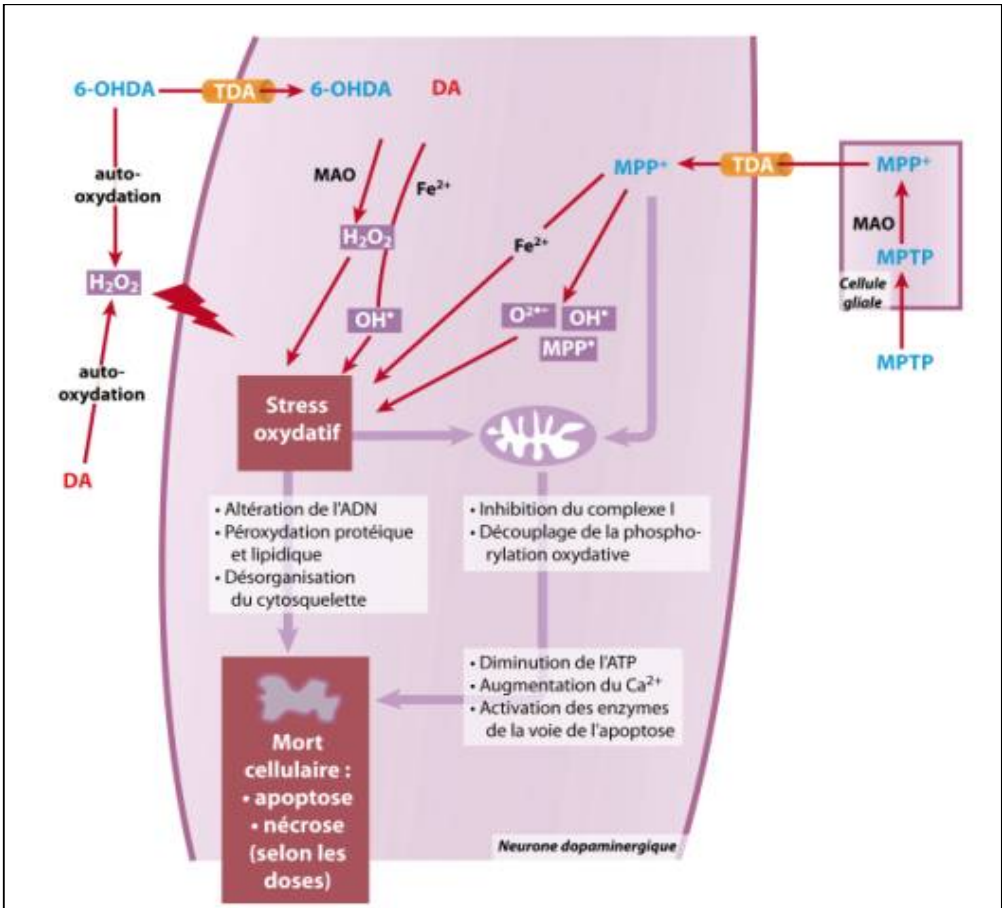


Figure 9 : Les mécanismes impliqués dans la toxicité de la 6-OHDA et du MPTP
L'accumulation de 6-OHDA dans les neurones dopaminergiques, à la suite d'une injection intra-cérébrale ou d'une synthèse endogène mettant en jeu la dopamine et le fer, conduit à: des modifications mitochondriales qui concourent 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 stucture cellulaire. Ces évènements 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. Il est a noter que la DA est aussi capable de « s'auto-oxyder » dans une moindre mesure. 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).

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

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. Cependant, les neurones DA de l'aire tegmentale ventrale (ATV) sont aussi fortement atteints. Pour cette raison, il a longtemps été considéré qu'une injection bilatérale était létale pour les animaux suite à l'adipsie et l'aphagie induite (Ungerstedt 1968). D'où une utilisation plus courante du modèle par injection unilatérale.

Afin de mieux contrôler la perte DA et de la focaliser au maximum vers les neurones DA de la SN, il a été développé des modèles de lésion partielle avec des doses de 6-OHDA plus modérées et des cibles différentes.

Lésions partielles

Faisceau médian du télencéphale (FMT)

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. Des dyskinésies ont été décrites sur ce modèle, plutôt appelées MAIs (mouvements anormaux incontrôlés; Cenci et coll. 1998). Avant que notre laboratoire ne le mette au point (Paillé et coll. 2007), il n'existait pas de modèle bilatéral viable.

Substantia nigra pars compacta (SNpc).

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, 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). Malgré la petite taille de la SN, les neurones DA environnement sont relativement épargnés (30% de perte au niveau de la ATV; Carman et coll. 1991). Enfin, la déplétion DA au niveau du Striatum est aussi plus latérale que médiale. Ces rats ayant une lésion DA dans la SNpc de plus de 90%, développent un mouvement rotatoire sous traitement à l'apomorphine. Un modèle bilatéral partiel a été développé (van Oosten et coll. 2005).

Striatum

La cible est facilement atteignable du fait de sa grande taille. Cependant, la taille du striatum est aussi un désavantage. En effet, 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. 2001) 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 MP 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). Cependant les lésions striatales mettent du temps à se stabiliser. Lindner et coll (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).

Aspects comportementaux des lésions à la 6-OHDA

Les déficits moteurs 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 controlatérales à la lésion alors que l'injection d'amphétamines entraîne des rotations ipsilatérales à la lésion. 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). Le nombre de tours comptés est généralement proportionnel à l'importance de la lésion. Cependant, les mécanismes à l'origine de ces rotations ne sont pas encore compris ce qui a fini par entraîner des critiques sur la fiabilité et le manque de subtilité de ces tests (Chang et coll. 1999). De plus l'utilisation de ces substances joue certainement un rôle sur la plasticité cérébrale et ajoute donc un paramètre supplémentaire aux études. D'autres 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 coordination motrice, la piscine de Morris

permettant d'analyser les déficits cognitifs, et le test de l'escalier permettant d'analyser le contrôle fin du mouvement. Nous avons nous même développé un test de rigidité (test de la balle; voir considérations méthodologiques). Cependant, la majorité de ces tests sont plus révélateurs quand ils sont pratiqués sur des animaux lésés de manière bilatérale. En effet, le côté valide des animaux « hémi-parkinsonnien » permet souvent une compensation.

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 (Cenci et coll. 1998; Andersson et coll. 1999; Lee et coll. 2000; Paillé et coll. 2004; Lundblad et coll. 2002).

Ces mouvements peuvent être quantifiés en se basant sur leurs distributions, leurs amplitudes et leurs durées, en utilisant des critères similaires à ceux utilisés en clinique (Hagell et Widner 1999). Après une prise de L-DOPA, ces mouvements perturbent l'activité motrice physiologique avec une cinétique d'apparition semblable aux dyskinésies de « pic de dose » observées chez les patients MP. Enfin, 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; Kanda et coll. 1998; Metz et Whishaw 2002). 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.

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 moteurs de la maladie, et peut développer des dyskinésies sous traitement par la L-DOPA.

Bien que ces modèles soient le plus souvent unilatéraux, des modèles bilatéraux, par conséquent plus proches de la maladie humaine, sont développés. La mise au point de modèles bilatéraux développant des dyskinésies sous traitement par la L-DOPA, et présentant presque tous les caractéristiques de la maladie humaine, sont des outils de choix pour étudier de nouvelles stratégies restauratrices et contrôler leurs potentiels effets secondaires.

7 Inflammation et réponse immunitaire dans le Système nerveux central

Le cerveau (et l'ensemble du SNC) a été longtemps considéré comme un site immunologique privilégié (Barker et Billingham 1977) en raison d'une anatomie et la présence de cellules immunitaires particulières. Leslie Brent en déduisait qu'il était « plus bénéfique pour l'organisme de ne pas transformer le cerveau en un champ de bataille dans lequel la réponse immunitaire pouvait être plus endommageante que l'antigène qui l'a provoqué ». Aujourd'hui, le statut dogmatique de l'immunoprivilège du SNC a changé suite aux études réalisées sur des greffes dans le cerveau et leur rejet. Depuis, la présence d'inflammation a été détectée dans de nombreuses conditions. Elle est actuellement suspectée d'avoir des liens avec certaines maladies neurodégénératives. Cependant, le cerveau reste toujours considéré comme un site immunologique particulier.

En effet, le cerveau est délimité par des barrières qui l'isolent et le protègent au niveau anatomique, cellulaire et moléculaire. Le cerveau est entouré, au plus externe, de la boîte crânienne, un ensemble de plaques osseuses soudées entre-elles. Puis, avant le parenchyme, le cerveau est recouvert par les méninges, composées de trois couches: la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère. Enfin, le cerveau est isolé du sang par la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui lui permet de contrôler les échanges avec l'extérieur.

La BHE est très efficace, et a été évoquée pour la première fois au début du siècle par Paul Ehrlich et Edwin Goldman qui avaient constaté que l'injection de bleu trypan colorait tous les organes à l'exception du SNC, puis Grégoire (Grégoire) démontra l'inverse avec une coloration cantonnée au SNC suite à l'injection sous arachnoïdienne du bleu trypan.

Ainsi le cerveau régule ces échanges avec l'extérieur autant au niveau cellulaire qu'au niveau moléculaire, il est donc totalement isolé du système immunitaire périphérique.

Il existe tout de même un système de surveillance partielle du SNC par le système immunitaire périphérique. En effet, s'il n'existe pas de drainage lymphatique conventionnel dans le cerveau, il existe un drainage des ganglions lymphatiques cervicaux par le LCR (Widner et coll. 1988; Cserr et Knopf 1992). Ainsi, le LCR aurait un rôle fonctionnel dans le SNC équivalent à la lymphe en périphérie (Weller et coll. 1996). Il arrive d'ailleurs que des lymphocytes circulants pénètrent dans le parenchyme cérébral (surtout les LT), mais ces cellules se retrouvent dans un univers défavorable à l'inflammation. D'une part, la présence de molécules du CMH est extrêmement limitée, voir absente, dans le cerveau sain, ce qui rend impossible la restimulation intracérébrale des LT qui meurent alors rapidement par apoptose (Bauer et coll. 1998). De plus, il a été suggéré que le récepteur CD45 (Fas/Apo1) présent sur les LT reconnaît son ligand CD45L (fas ligand) présent à la surface de nombreuses cellules du tissus nerveux (Bechmann et coll. 1999; Lee

et coll. 2000) ce qui serait aussi à l'origine de l'apoptose des LT. D'autre part, la cytokine anti-inflammatoire TGF est exprimée constitutivement dans le parenchyme cérébral ce qui limite notamment la prolifération des LT (Taylor et Streilein).

Cependant, le SNC possède ses propres cellules régulatrices de l'inflammation comme les astrocytes et la microglie (équivalent des macrophages). Lors de réactions inflammatoires induites par ces cellules, l'environnement du parenchyme cérébral devient plus propice à une réaction immunitaire. Le TGF n'est plus exprimé tandis que les cellules du SNC, dont les neurones, augmentent l'expression des molécules du CMH sur leur membrane. De plus les cellules gliales sécrètent un certain nombre de cytokines capables de maintenir l'inflammation, d'attirer les lymphocytes et de perméabiliser la BHE.

Ainsi, les réponses immunitaires (primaires ou secondaires) sont des événements susceptibles de briser l'homéostasie du SNC. D'où l'isolement relatif du SNC par rapport au reste de l'organisme, le met à l'abri des réactions inflammatoires systémiques. Néanmoins, il est tout à fait capable de répondre par une réaction inflammatoire et mettre en place une réponse immunitaire spécifique.

7-1 Les acteurs de l'inflammation dans le SNC, l'inflammation et la MP.

Si les neurones sont les cellules principales du SNC, elles ne sont pas les seules (figure 10). En 1846, le chercheur allemand Rudolf Virchow exprima en premier le concept de glie. Il décrit cet ensemble de cellules comme une substance de soutien assimilée à de la glu. La glie comprend toutes les cellules du SNC à l'exception des neurones. Ces cellules représentent presque la moitié de la masse totale du SNC. On distingue 3 types principaux de cellules gliales: les oligodendrocytes, les astrocytes et la microglie qui ont toutes des relations essentielles avec les neurones (support mécanique, protecteur et métabolique).

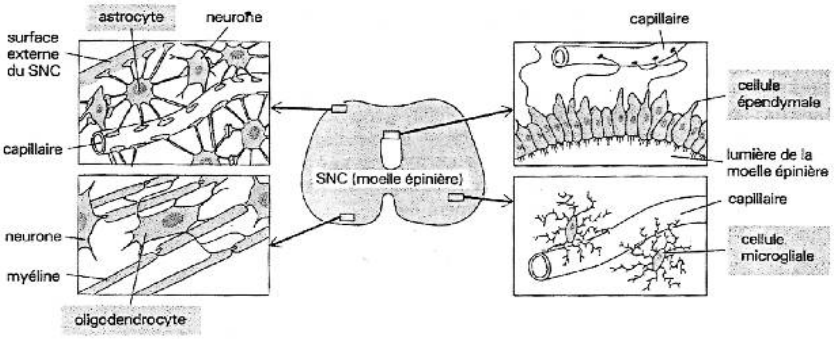


figure 10. Les quatre principales catégories de cellules gliales dans le système nerveux central (en grisé).
(d'après Alberts B. et coll., 1989)

7-1-1 Les Oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont les cellules gliales les plus nombreuses dans la substance blanche. Actuellement, elles sont surtout reconnues pour leur rôle dans la myélinisation des neurones. Contrairement aux cellules de Shwann (spécifiques d'une seule fibre nerveuse), un olidodendrocyte peut myéliniser plus de 50 fibres nerveuses. Du fait de leur rôle restreint et spécifique, peu d'études sont menées à leur propos concernant la MP, même si dans certains cas des oligodendrocytes activés ont pu être observés. Ces cellules sont surtout impliquées dans la Sclérose en Plaque (SEP) qui touche la myélinisation des neurones.

7-1-2 La Microglie

Le rôle des cellules microgliales a été décrit en plusieurs étapes. Le premier à s'y intéresser fut Nissl en 1899 (Nissl, 1899) qui leur attribua des fonctions similaires à celles des macrophages du système immunitaire périphérique. Puis, au début du siècle Del Rio-Hortega démontra que la microglie avait une origine mésenchymateuse (Del Rio-Hortega, 1919). En effet, au cours de l'embryogenèse, des monocytes pénètrent dans le cerveau puis effectuent une migration post-natale dans tout le SNC où ils représenteront 10% des cellules gliales (Lawson et coll., 1990 ; Ling et Wong, 1993). L'équipe de Perry (Perry et coll., 1985) confirma l'appartenance de la microglie au système immunitaire.

Aujourd'hui, on sait que dans un premier temps, ces cellules jouent un rôle dans la formation du SNC et qu'à ce titre elles participent activement au programme de sélection/élimination des neurones lors de la maturation postnatale du cerveau (Pearson et coll., 1993). Ensuite, dans le cerveau mature, elles jouent un rôle principalement dans l'immunité et sont définies comme les équivalents des macrophages dans le SNC. Cependant, contrairement aux macrophages, les cellules microgliales possèdent diverses morphologies correspondant à différents niveaux de leur activation. Ces morphologies différentes correspondent aussi à des phénotypes particuliers (pour revue Streit et al., 1988).

A l'état de repos, la microglie a une forme ramifiée: un petit cytoplasme et de nombreux prolongements fins. Elle est dite quiéscente. Bien qu'elle possède une activité régulière, à ce moment très peu de marqueurs macrophagiques sont détectés au niveau de la microglie (CMH, récepteur au fragment Fc des immunoglobulines, CD4 et CD45 ; Kreutzberg, 1996).

Dans le cas d'infection ou de traumatisme au niveau du SNC, la microglie réagit très rapidement pour tendre vers sa forme dite « activée » (pour revue Wojtera et coll., 2005). Lors de son activation, la microglie ramifiée transforme sa morphologie pour devenir amiboïde. Cette

transition se déroule en plusieurs étapes : rétractation et épaississement des prolongements, grossissement du cytoplasme, pour donner la forme activée finale ronde. Ces événements sont accompagnés par une variation des marqueurs phénotypiques « macrophages » qui augmentent en nombre et en densité (Dickson et coll., 1991) tout au long de l'activation comme : la sécrétion d'Il1β (Banati et Greaber, 1994), la sécrétion de TNFα (Dickson et coll., 1993 ; Liberski et coll., 1993), la sécrétion d'IL6 (Dickson et coll., 1993) ainsi que certains chimio-attractant des monocytes circulants (Marty et coll., 1991).

Dès lors quelles sont pleinement activées, les cellules microgliales sont capables de macrophagie. Cette capacité, leur permet de se débarrasser de certains éléments pathogéniques ainsi que des débris cellulaires (pour revue Nakamura, 2002 ; Orr et coll., 2002). Ainsi, la microglie, en jouant le rôle de médiateur de la réponse immunitaire primaire (dite non-spécifique), permet de conserver une certaine homéostasie, de promouvoir la réparation tissulaire dans le parenchyme cérébral et de débarrasser les différentes cellules d'éléments gênants.

Par ailleurs, la microglie activée possède aussi un rôle neuroprotecteur direct (Nagata et coll., 1993) en sécrétant des facteurs neurotrophiques comme le GDNF, le BDNF ou le NT-3. La sécrétion de ces molécules joue un rôle important dans la sauvegarde des neurones (Shimojo et coll. 1991), ainsi que dans la plasticité cérébrale, en particulier dans le cas de sprouting (pour revue Aloisi, 1999 ; Bachelor et coll., 1991).

7-1-3 Les Astrocytes

Les astrocytes sont les cellules les plus représentées dans le cerveau. Elles sont 10 fois plus nombreuses que les neurones et occupent 1/3 du volume du cortex cérébral. Leur nom provient directement de leur forme étoilée décrite pas Dieters en 1865. Leurs prolongements multiples permettent la création d'un réseau tridimensionnel important au sein du SNC. Ce réseau occupe la majeure partie de l'espace interneuronal. Il se termine par des expansions sur les membranes basales des capillaires par les pieds périvasculaires des astrocytes qui jouent un rôle déterminant dans l'étanchéité de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Une autre partie des prolongements de ce réseau est en contact direct avec les neurones. Ces caractéristiques anatomiques sont nécessaires pour optimiser le rôle des astrocytes:

- ✓ Rôle architectural
- ✓ Rôle dans les échanges métaboliques entre les neurones et le sang
- ✓ Rôle dans l'homéostasie intra-cérébrale

De plus les astrocytes sont aussi impliqués dans diverses actions neuroprotectrices:

- ✔ Synthèse et sécrétion de nombreux facteurs neurotrophiques (NGF, GDNF, MANF)

- ✔ Recapture et métabolisme du Glutamate par la glutamine synthétase
- ✔ Détoxification des radicaux libres (ce sont les seules cellules à posséder la gluthation peroxydase)

Enfin, les astrocytes jouent aussi un rôle dans l'inflammation appelée l'astrogliose. En raison de leur position stratégique à l'interface sang/parenchyme nerveux et de leurs interactions avec les neurones, les astrocytes répondent rapidement aux variations de l'environnement. Cette réponse se traduit par leur activation. Celle-ci est caractérisée par une hypertrophie cellulaire et, dans une moindre mesure, une prolifération. L'astrogliose se distingue également par l'augmentation de l'expression d'un filament intermédiaire spécifique des astrocytes, la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein; Amaducci et coll. 1981; Aquino et coll. 1988) et par l'induction d'un autre filament intermédiaire souvent exprimé par les cellules immatures en cours de prolifération, la vimentine (Schiffer et coll. 1986; Petito et coll. 1990). Outre ces modifications phénotypiques, les astrocytes activés vont exprimer de nombreuses molécules membranaires et secréter divers facteurs pro-inflammatoires comme le G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor), le M-CSF (Macrophages-CSF) qui attire les cellules microgliales/macrophages et le GM-CSF (Granulocyte/ Macrophages-CSF) qui induit notamment l'activation et la prolifération des cellules microgliales/macrophages. La sécrétion de ces cytokines proinflammatoires participe à l'activation macrogliale et à l'entretien de la réponse inflammatoire.

Cependant, les astrocytes se caractérisent davantage comme des régulateurs de l'inflammation. En effet, ces cellules sont aussi capables de sécréter des cytokines anti-inflammatoires comme le TGF-β (Transforming Gorwth Factor-β).

Ainsi, les propriétés neurotrophiques des astrocytes associées à leur capacité d'élimination des substances neurotoxiques tels que les radicaux libres ou le glutamate, donnent à ces cellules un rôle particulier dans la gestion d'un environnement favorable aux neurones. Dès lors, les astrocytes sont devenus une cible thérapeutique privilégiée pour le traitement préventif de la MP (Chen et coll. 2005). D'autant plus qu'au niveau quiescent ou activé, les astrocytes ont des relations privilégiées actives et permanentes avec les cellules microgliales.

7-1-4 Infiltration lymphocytaire

Les lymphocytes sont des cellules circulantes du sang. Ce sont les médiateurs de la réponse immunitaire secondaire dite spécifique. Ils sont activés suite à la présentation d'un antigène précis. Suite à leur activation, ils répondent contre l'antigène grâce à des anticorps (lymphocytes B; réponse humorale) ou par contact cellulaire (lymphocytes T; réponse cellulaire). Il existe aussi d'autres

lymphocytes nécessaires à la régulation de la réponse immunitaire, ils sont appelés « helper ».

Bien qu'isolé du système périphérique notamment par la barrière hémato-encéphalique, le SNC est parfois infiltré par des lymphocytes. En effet, lors d'inflammation la sécrétion de cytokines médiée par la réponse immunitaire primaire (la microglie en particulier) perméabilise la BHE et permet l'entrée de lymphocytes activés par diapédèse. Tout récemment, il vient d'être démontré que la perméabilisation de la BHE pouvait avoir un rôle actif dans la dégénérescence DA (Rite et coll. 2007).

L'infiltration de lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) et régulateurs (CD4+) à pu être observée dans le striatum et la SN de souris injectées au MPTP (Kurkowska-Jastrzebska et coll. 1999). Mc Geer et coll. en 1988 avaient déjà évoqué la présence de T CD8+ dans la SN sur des coupes *post mortem* de patients MP. Plus précisément, ces lymphocytes se retrouvaient au contact de neurones DA en dégénérescence. La présence de lymphocytes dans le parenchyme cérébral est aussi suspectée par Hunot et coll.

Si le rôle des T CD8+ est sans ambiguïté quant à sa cytotoxicité, des études récentes ont mis en évidence un rôle plutôt neuroprotecteur des T CD4+ (Laurie et coll. 2007) en particulier s'ils sont aussi CD25+ (Reynolds et coll. 2007). Les T CD4+ interagiraient avec les cellules microgliales et limiteraient la cytotoxicité dans des souris injectées au MPTP.

Plus largement, il a été démontré qu'il y a une variation des sous populations lymphocytaires CD8 et CD4 dans le sang et le LCR de patients MP (Hisanaga et coll. 2001).

Enfin, s'il n'est pas question d'infiltration lymphocytaire B (ce ne sont pas des cellules infiltrantes) des équipes ont montré la présence d'Ac anti-neurones DA dans le serum (Defazio et coll. 1994) et le LCR (Carvey et coll. 1991) de patients MP. De plus, il a aussi été montré que certaines IgG issues de serum de patients pouvaient induire la dégénérescence de neurones DA du mésencéphale (Chen et coll. 1998; Le et coll. 2001; He et coll. 2002).

Il semble donc que la réaction inflammatoire/ immunitaire observée dans le cadre de la MP soit singulière, sans doute due aussi au statut immunitaire particulier du SNC. Il existe encore peu de données. Mais les indications de la présence d'une réponse immunitaire spécifique orientée vers les neurones DA peut suggérer une présentation d'antigènes via une cellule spécialisée (CPA: cellules dendritiques ou microglie) impliquée à un moment ou à un autre à l'origine ou dans l'évolution de la MP.

7-1-5 Principales cytokines et substances cytotoxiques du CNC

Les cellules microgliales et les astrocytes apparaissent comme les principales sources de cytokines dans le SNC. Il existe deux grands types de cytokines: les cytokines Pro- ou anti-inflammatoire (figures 11, 12, 13 et tableau 3).

Les cytokines anti-inflammatoires.

Deux principales cytokines anti-inflammatoires sont sécrétées au sein du SNC: l'Il10 et le TGFb. Elles permettent de maintenir le parenchyme cérébral à un faible niveau immunogène. Associées à certains neuropeptides, elles contribuent au statut immuno-particulier du SNC. Au vue des différentes hypothèses concernant le rôle de l'inflammation et la MP, la minimisation du risque inflammatoire dans le SNC est de première importance.

Les cytokines pro-inflammatoires.

Ce sont les médiateurs de l'inflammation, les plus nombreux. Les cytokines pro-inflammatoires favorisent ainsi l'entretien et l'amplification des réactions inflammatoires par l'activation, la prolifération et le recrutement des cellules immunitaires. De manière générale, elles ne sont pas sécrétées de manière constitutive, mais suite à un stimulus inflammatoire, infectieux ou traumatique.

Les cytokines pro-inflammatoires présentes dans le SNC comprennent différentes interleukines, des substances chimioattractantes et on y associera aussi certaines molécules cytotoxiques.

Les interleukines pro-inflammatoires

Les principales interleukines pro-inflammatoires synthétisées par la microglie sont les Il1, 6, 12 et 18. Elles ont pour but d'amplifier l'inflammation et de l'orienter vers une réponse immunitaire spécifique. Ainsi, elles vont stimuler plus fortement la microglie, augmenter la synthèse de prostaglandine (et donc jouer un rôle important dans l'induction du stress oxydatif), et faciliter la diapédèse des LT (perméabilisation la BHE, augmentation de l'activation lymphocytaire). Enfin, il est à noter que l'Il1 possède un potentiel cytotoxique.

Les chimioattracteurs.

La perméabilisation de la BHE se fait en parallèle de la synthèse de molécules d'adhésions pour les LT sur les cellules endothéliales et de la sécrétion de chimioattracteurs.
MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) et MIP-1 (Macrophage Inflammatory Protein-1) facilitent l'infiltration des leucocytes et des monocytes circulants dans le SNC (Calvo et coll. 1996) ainsi que le recrutement des cellules immunitaires déjà présentes dans le parenchyme du SNC vers le site inflammé.

De plus, la migration intracérébrale des leucocytes via le BHE, nécessite la présence d'enzymes, les métalloprotéinases matricielles (MMP). Or, il a été rapporté que les cellules microgliales activées pouvaient également secréter ces enzymes (Anthony et coll. 1997; Cross et Woodroofe 1999; Nakanishi 2003). Celles-ci sont notamment capables d'inhiber la protéine de défense α-1 antitrypsine (ou inhibiteur de la protéase α-1) dont la fonction dans le cerveau sain est d'empêcher l'entrée des leucocytes activés en paralysant l'activité des leucocytes élastases (Ryan et Ashley 1998). De plus certaines MMP ont un rôle direct ou indirect dans la lyse des membranes basales comme celle du tissus conjonctif de la BHE. Ainsi, en synthétisant des MMP, les cellules microgliales activées favorisent la rupture de la BHE et l'invasion leucocytaire du SNC.

Les substances cytotoxiques

Le TNFα (tumor necrosis factor)

Le TNFα est une des principales molécules dont l'augmentation est observée chez les patients MP et dans la plupart des modèles animaux de la maladie. Cette molécule synthétisée par la microglie et les astrocytes est un activateur macrophagique/microglia ainsi que des autres cellules immunitaires. En plus de son rôle pro-inflammatoire, le TNFα est avant tout une molécule cytotoxique qui adhére à l'un de ses récepteurs TNFαRI. La fixation du TNFα ce récepteur induit un signal cellulaire aboutissant à l'engagement de la cellule dans l'apoptose.

Le TNFα est particulièrement intéressant dans le cadre de la MP, car les neurones DA (entourés par une densité microgliale importante de manière constitutive) possèdent le TNFαRI. On pourrait donc spéculer qu'une forte concentration en TNFα au voisinage de ces neurones puisse participer activement à la mort de ces neurones.

L'Interferon γ (IFNγ)

De même que le TNFα, l'IFNg est retrouvé en grande quantité dans le LCR des patients MP. Cette molécule induit une augmentation de l'expression des molécules de classe I et II du CMH et est la principale cytokine de l'activité MAF (macrophage arming factor). Ainsi, dans le cadre inflammatoire, cette cytokine augmente les capacités de la réponse des macrophages (phagocytose et présentation d'antigène) et des cellules à les attirer vers elles.

Le Monoxyde d'Azote

On ne peut considérer le NO comme une cytokine à proprement parler, mais l'augmentation de sa production suite à une importante synthèse de NOsyntase (NOS) par la microglie activée fait partie des phénomènes cytotoxiques induits par l'inflammation. Toxique envers certaines bactéries, le NO est aussi fortement neurotoxique, en particulier vis a vis des neurones sensibles au stress oxydatif. De nombreuses études ont montré une augmentation de iNOS (inductible NOS) dans la SN de patient ou dans des modèles animaux de la MP.

Il est difficile d'aller plus loin dans la description des cytokines, car si elles possèdent des fonctions bien établies, en fonction des situations, leur rôle varie.

Après avoir longtemps considéré la microglie activée comme ayant un phénotype unique, on l'observe désormais comme une cellule capable de présenter une large plasticité. En effet, il semblerait qu'il existe un continuum dans l'activation microgliale avec une réponse phagocytaire attribuée à l'immunité innée non spécifique et une fonction de présentation de l'antigène caractéristique de l'immunité adaptative. La voie d'activation dépendrait donc du type de stimulation perçue (Town, et coll. 2005) sans oublier la participation active des astrocytes. Ainsi, l'origine du stimulus déterminerait la synthèse d'un cocktail de facteurs spécifiques (cytokines, chimiokines, radicaux libres, MMP et facteurs de croissances) pour optimiser la réponse induite.

7-1-6 Le SNC dans le cadre non-inflammatoire et inflammatoire

Cadre non inflammatoire

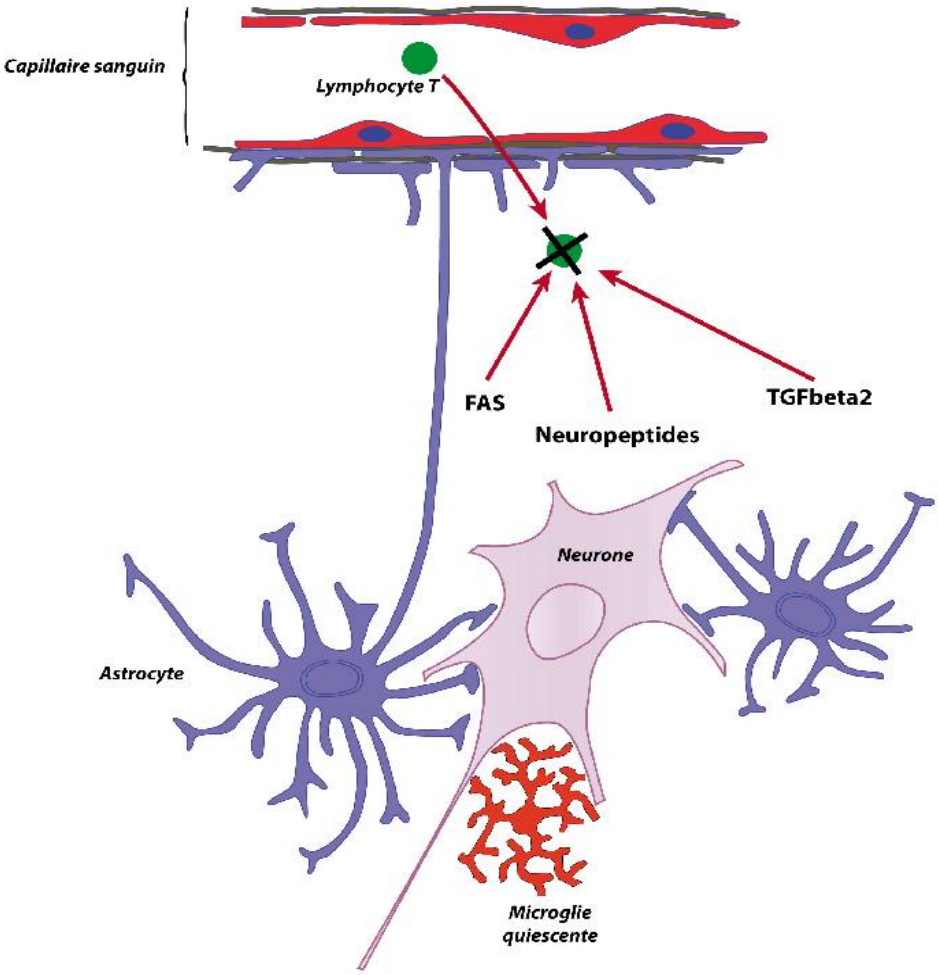


Figure 11 .Parenchyme cérébral au repos avec ces principales cellules.
Les astrocytes et la microglie communiquent entre-elles et avec les neurones. De plus les astrocytes participent à l'étanchéité de la BHE en contact avec les cellules endothéliales. Il arrive qu'un lymphocyte T activé pénètre malgré tout dans le parenchyme. Pour pallier à ce genre d'intrusion accidentelle, les cellules gliales et les neurones sécrètent différents facteurs anti-inflammatoires dirigés contre l'activité lymphocytaire.

Cadre inflammatoire

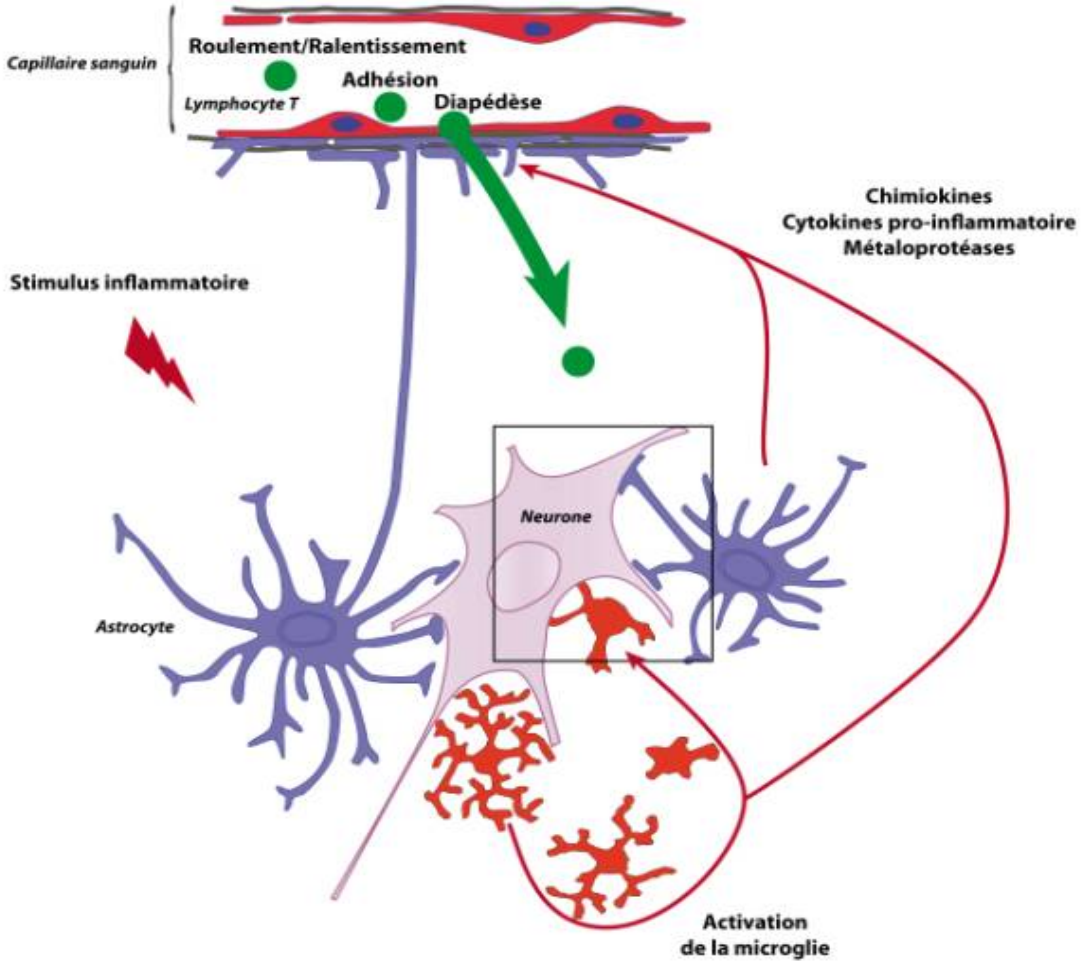


Figure 12 .Parenchyme cérébral après un stimulus inflammatoire.

Les astrocytes et la microglie changent de phénotypes et deviennent « activés ». Les astrocytes augmentent leur synthèse de GFAP et sécrète du TNFα. Les cellules microgliales changent de forme et évoluent vers une morphologie amiboïde. Elles synthétisent aussi un certain nombre de substances pro-inflammatoire (voir fig X). Ainsi, l'environnement du parenchyme cérébral devient propice l'infiltration des lymphocytes T activée qui peuvent franchir la BHE et jouer leur rôle dans la réponse immune spécifique.
Le détail des interractions entre les neurones, cellules microgliales et les astrocytes est précisé figure 13.

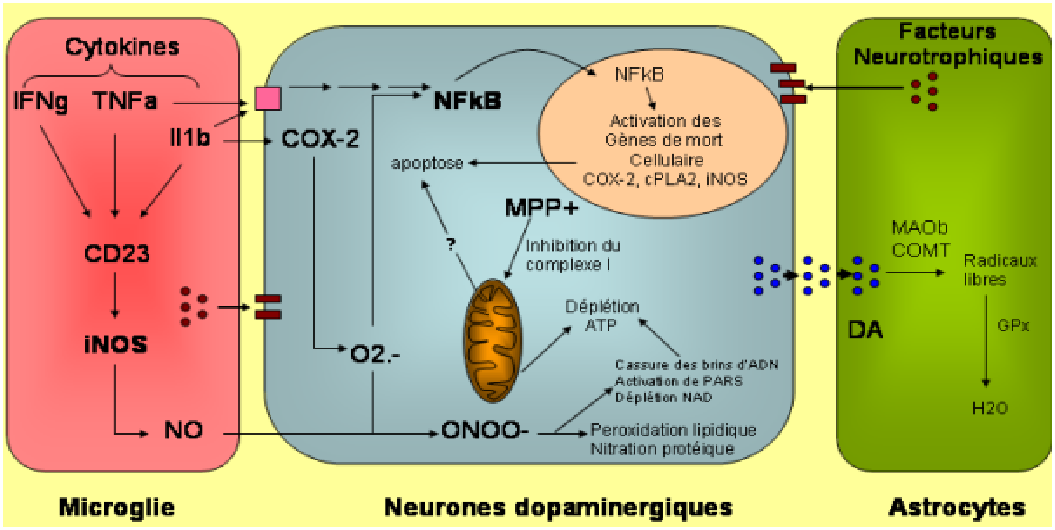


Figure 13. Hypothèses de l'implication des cellules gliales dans la pathogénie de la maladie de Parkinson. La microglie activée peut contribuer à la neurodégénérescence dopaminergique, en libérant des composés cytotoxiques comme TNFα ou l'Il1β. Ces cytokines peuvent avoir un effet direct sur les neurones dopaminergiques en activant la voie de transduction qui conduit à l'apoptose ou en induisant l'expression de COX-2 dans les neurones DA. Elles agissent aussi sur la microglie in induisant l'expression de iNOS dans qui stimule alors respectivement la formation de l'ion superoxyde ($O2^{\cdot-}$) et d'oxyde nitrique (NO). Le NO peut diffuser vers les neurones DA voisins. Si les cellules voisines ont un niveau élevé de $O2^{\cdot-}$, il existe une probabilité accrue que $O_2^{\cdot-}$ réagisse avec NO pour former du peroxynitrique (ONOO-), qui peut endomager les lipides, les protéines et l'ADN. L'ADN endommagé stimule l'activité Poly(ADP-ribose) synthase (PARS), qui déplète 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 (MAO_B) 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)

Famille	Membres	Fonctions majeures
Interleukines	IL-1α, IL-1β, IL-2 à 15	Immunorégulation, pas de similitude d'activité entre les différents membres.
Chémokines	IL-8, NAP-2, MIP-1 MCAF, MGSA	Effet chimio-tactique sur les macrophages, les monocytes et les lymphocytes-T.
Facteurs de nécrose	TNF-α, TNF-β	Immunorégulation, cytotoxicité tumorale tumorale.
Interférons	IFN-α, β et γ	Immunorégulation, inhibiteur de réplication virale.
Facteurs stimulateurs de colonies	G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IL-3	Croissance et différenciation des cellules progénitrices de la moelle osseuse, activation des fonctions leucocytaires
Facteurs de croissance	TGF, ECGF,	Croissance cellulaire et différenciation
Neurotrophines	BDNF, NGF, NT3, NT6, GDNF	Croissance et différenciation neuronale
Neuropoïétines	LIF, CNTF, IL6	Effets divers dans le système nerveux

Table 3: récapitulatif des différentes substances inflammatoires et neurotrophiques sécrétées par les neurones et les cellules gliales. D'après Hopkins et Rothwell 1995

7-2 Inflammation et Maladie de Parkinson

7-2-1 Susceptibilité particulière des neurones DA de la SN

Afin de mieux comprendre la suite, il est important de repréciser certaines caractéristiques des neurones DA de la SN. Tout d'abord, la SN est la zone du cerveau la plus riche en microglie, par contre, à l'état physiologique, elle est relativement pauvre en astrocytes. De plus, les neurones DA sont les plus sensibles au stress oxydatif du fait de la mélanine et de leur environnement riche en Fer. Enfin, il a été observé une augmentation de l'expression de récepteur au TNFα chez les patients.

Une augmentation du risque inflammatoire avec l'âge.

Le premier facteur étiologique de la MP est le vieillissement avec une augmentation de la prévalence avec l'âge. Or, des études, chez l'homme et l'animal, ont révélé que la proportion de cellules microgliales activées augmentait avec l'âge même chez des sujets sains (sans traumatisme ni désordre neurodégénératif préalable; Mackenzie et Munoz 1998; Rozovsky et coll. 1998). Ce phénomène pourrait donc être à l'origine de l'augmentation de l'incidence des maladies neurodégénératives avec l'âge.

La SN, une zone particulièrement riche en microglie de manière constitutive.

Chez les patients parkinsoniens ou intoxiqués au MPTP, l'analyse de coupes post-mortem de SN a permis la mise en évidence de la présence de cellules microgliales activées (McGeer et coll. 1988a; Langston et coll. 1999a). D'un autre côté, la SN est aussi reconnue comme la zone du SNC la plus riche en microglie même à l'état quiéscent.

Observation dans les modèles

La lésion spécifique de neurones DA dans la SN est possible via l'utilisation de toxines spécifiques (6-OHDA et MPTP; Liberatore et coll. 1999; Kurkowska-Jastrzebska et coll. 1999; McGeer et coll. 2003; Cicchetti et coll. 2002) ou inhalation de roténone (Gao et coll. 2003; Sherer et coll. 2003). Une fois dans le neurone, elles sont à l'origine de stress oxydatif ou d'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexe I: NADPH oxydase). Il en résulte la mort de la cellule induite par apoptose ou nécrose. Le mode d'action de ces toxines ne semble pas interférer avec la population gliale. Cependant la mort de ces neurones provoque une réaction inflammatoire

impliquant entre autre l'activation de microglies et d'astrocytes. L'inflammation, et en particulier l'activation microgliale, semble donc liée à la dégénérescence DA. Serait-elle à l'origine d'une amplification de la neurodégénérescence? Serait-elle susceptible d'être un phénomène primaire dans l'étiologie de la MP?

7-2-2 Une neurodégénérescence induite par l'inflammation

Actuellement la majorité des observations décrivent un état inflammatoire significatif accompagnant les phénomènes de neurodégénération. Récemment, des études ont montré la possibilité d'induire une neurodégénérescence DA spécifique dans la SN à partir d'initiateur de l'inflammation. Cette perte neuronale semble être engendrée plus particulièrement suite à la microgliose. En effet, la microglie activée produit un certain nombre de substances potentiellement neurotoxiques: cytokines (TNFa, INFg, IL1...) et est à l'origine de la production des radicaux oxygénés actifs (ROS: NO, OH°, H_2O_2). Cette possibilité est d'autant plus intéressante que la SN est la zone la plus riche en microglie du cerveau (Lawson et coll. 1990) et les neurones DA sont particulièrement sensibles au stress oxydatif (mélanine, fer).

Le LPS

Le LPS (lypopolyssacharide) est une substance bactérienne (endotoxine des bactéries GRAM-) immunogène. Le LPS est un activateur très efficace de la réponse inflammatoire primaire (ou innée).

In vitro, la co-culture de neurones et de glie a montré que les neurones DA étaient deux fois plus sensibles que les neurones TH négatifs à l'injection de LPS (Bronstein et coll. 1995), tandis que l'injection de LPS dans des cultures neurales pures engendrait une perte beaucoup plus faible.

Les résultats obtenus *in vitro* ont été confirmés *in vivo*. En effet, l'injection de LPS dans la SN de rat est à l'origine dans un premier temps d'une forte activation microgliale puis d'une dégénérescence progressive des neurones DA (Castaño et coll. 1998; Herrera et coll. 2000; Kim et coll. 2000). Ces résultats semblent spécifiques des corps cellulaires des neurones DA. Contrairement aux neurotoxines comme la 6-OHDA, l'injection dans la FMT ou le striatum, n'induit pas la perte des neurones DA dans la SN. De plus, l'injection nigrale n'entraîne pas de neurodégénéréscence GABAergique. Enfin, l'injection de doses équivalentes de LPS dans d'autres structures cérébrales (noyau du raphé ou cortex) semble épargner aussi les neurones sérotoninergiques ou 5-HTergiques.

Il existe aussi un modèle de sensibilisation des neurones en présence de LPS *in utero*. Ling et coll. (2002; 2004) a montré que l'injection de LPS au stade prénatal entraînait une perte spécifique des neurones DA au niveau de la SN. De plus, les neurones DA des animaux sensibilisés semblent plus vulnérables en présence de toxines comme la roténone ou la 6-OHDA.

Ces résultats montrent la grande sensibilité spécifique des neurones DA face à une réaction inflammatoire et l'interaction étroite entre l'activation microgliale et la neurodégénérescence. Ils suggèrent même un rôle potentiellement primaire de l'inflammation, via l'activation de la microglie comme facteur étiologique de la maladie. Cependant ne peut-on pas y voir un rôle particulier du LPS *in vivo* ou ces résultats peuvent-il être obtenus avec d'autres substances pro-inflammatoires?

Autres substances pro-inflammatoire

D'autres études ont été menées en utilisant d'autres activateurs microgliaux comme l'histamine, la thrombine, le trisialoganlioside ou des IgG de patients.

L'histamine est un neurotransmetteur du CNS capable de perméabiliser la barrière hématoencéphalique (BHE; Abbott 2000), ce qui entraîne une réponse immunitaire primaire. L'infusion d'histamine dans la SN induit la perte spécifique des neurones DA, cette perte est en outre accompagnée d'une diminution du marquage astrocytaire GFAP. Tous ces phénomènes de spécificité ont été décrit lors d'injection de LPS (Vizuete et coll. 2000).

La thrombine est une sérine protéase connue pour son rôle dans la cascade enzymatique impliquée dans la coagulation sanguine. *In vitro*, cette enzyme active la microglie de rongeur en culture (Möller, et coll. 2000). L'injection intranigrale de thrombine induit une forte activation microgliale (et macrophagique?) accompagnée d'une production d'iNOS, Il1 et TNFα (Carreño-Müller et coll. 2003). De même que précédemment, il s'en suit une perte localisée des neurones DA dans la SN, ce qui n'est pas le cas pour d'autres types de neurones ou de régions.

Le trisialoganlioside (GT1b) est un ligand activateur de récepteurs de fragment Fc. *In vitro*, GT1b active la microglie et entraîne la production de facteurs cytotoxique. En co-culture glie/ neurones DA la présence de GT1b provoque la perte des neurones DA (Chung et coll. 2001). *In vivo*, l'injection intranigrale chez le rat de GT1b entraîne une forte activation microgliale avec une importante augmentation de iNOS, il s'ensuit la mort des neurones DA (Ryu et coll. 2002).

Ainsi, dans des conditions expérimentales précises, plusieurs substances présentent physiologiquement dans le SNC peuvent provoquer une inflammation primaire à une neurodégénéréscence DA dans la SN. Ces résultats confirment le lien entre la MP et l'inflammation et suggéreraient même la possibilité d'un rôle inducteur d'une réaction inflammatoire localisée dans l'étiologie de la maladie. Ces résultats paraissent d'autant plus convaincants que l'utilisation

d'inhibiteur de ces molécules implique une importante voir une totale diminution de la cytotoxicité observée à l'encontre des neurones DA. De même l'utilisation d'inhibiteurs moins spécifiques de ces molécules mais de l'inflammation plus largement, a fait preuve de neuroprotection in vivo et in vitro dans ces modèles de neurodégénérescence inflammatoire.

Infection

Un rôle primaire de l'inflammation suggère la possibilité qu'une infection bactérienne ou virale soit à l'origine du déclenchement d'une neurodégénérescence DA spécifique. Dans cette idée des expériences d'infection ont pu mettre en évidence une perte de neurones DA dans la SN et des troubles moteurs suite à l'injection de Nocardia asteroides (une bactérie commune) dans des souris (Kohbata et Beaman 1991). Ce même type de résultats accompagnés de gliose a pu être observé après l'exposition de rat au virus de l'encéphalite japonaise (Ogata et coll. 1997).

Inhibition de l'inflammation

Une autre approche de la neurotoxicité microgliale implique l'utilisation d'inhibiteurs de l'inflammation (plus ou moins larges). Ces inhibiteurs sont utilisés aussi bien dans des modèles d'intoxication neurale que d'activation microgliale *in vivo* ou *in vitro* (tableau 4). Les résultats mettent en évidence une diminution significative de la neurodégénérescence DA.

Molécule	Effet	Modèle
Minocycline	Inhibiteur microgliale	Roténone in vivo
Anticorps LR1	Inhibiteur microgliale (LR)	MPTP in vivo
Dextromethorphan	Inhibiteur microgliale	LPS
SB203580	Inhibiteur p38-MAPK2	Thrombin in vitro
PD98059	Inhibiteur ERK1/23	Thrombin in vitro
Caffeic acid phenethyl ester	Anti-inflammatoire/antioxidant	6-OHDA in vivo
HU-210(agoniste cannabinoide)	Anti-inflammatoire/antioxidant	6-OHDA in vitro/in vivo
Compound Ac	Anti-inflammatoire	LPS in vitro/in vivo
XENP345	Inhibiteur TNFa	6-OHDA in vivo
3-Hydroxymorphinan	Inhibiteur microgliale	LPS
Dexamethasone	Anti-inflammatoire	LPS in vivo (Castano 02)
Thiadiazolidinones	Anti-inflammatoire	LPS in vitro

Table 4. Synthèse des différents inhibiteurs de l'inflammation à l'effet neuroprotecteur dans le cadre de modèles

expérimentaux de MP.

Les résultats neuroprotecteurs obtenus avec la minocycline ont été confirmé à différentes reprise sur des modèles de souris MPTP (Du et coll. 2001; Wu et coll. 2002) et de rats 6-OHDA (He et coll. 2001). Depuis un protocole à base de minocycline participe à une étude clinique chez des patients parkinsoniens (Anon 2006).

D'autres expériences à partir d'anti-inflammatoires non stéroidiens (NSAID; comme l'aspirine ou l'ibuprofene) ont aussi conclu à un rôle neuroprotecteur (in vitro et in vivo) de ce type d'anti-inflammatoires.

a-synucleine: une substance inflammatoire?

L'α-synucleine est une protéine synaptique. Cette protéine est une des composantes principales des corps de Lewy où elle se retrouve agrégée. Les corps de Lewy sont une signature histopathologique de la MP, et de plus, la majorité des formes familiales de la MP détectée ont mis en évidence une forme mutée de l'α-synucleine. Ces mutations seraient à l'origine d'un mauvais fonctionnement de cette protéine mais surtout d'une mauvaise dégradation de celle-ci d'où sa concentration dans une région particulière des neurones. L'α-synucleine est donc étroitement liée avec le développement de la MP.

Dernièrement, il a été démontré qu'en culture, l'α-synucleine avait le pouvoir d'activer la microglie (Zhang et coll. 2005). L'α-synucleine serait phagocytée par la microglie. Ainsi, les corps de Lewy libérés à la mort des neurones pourraient induire un processus inflammatoire et la sécrétion de substances cytotoxiques. De plus, la présence de lymphocytes dans la SN a été confirmée à plusieurs reprises dans le cadre de MP humaine ou de modèles animaux de la maladie (Bas et coll. 2001). Connaissant le rôle potentiel de présentation d'antigène des cellules macrophagiques, pourquoi ne pas imaginer une présentation de la protéine aux lymphocytes? Enfin, il semble aussi que l'α-synucleine soit capable d'activer des astrocytes humains induisant l'augmentation d'Il6 et d'ICAM1 (Klegeris et coll. 2006): molécules pro-inflammatoires pouvant activer la microglie mais pouvant aussi interagir avec les lymphocytes.

7-2-3 Mécanismes probables

La microglie activée synthétise et sécrète un certain nombre de substances pro-inflammatoires et cytotoxiques comme les cytokines TNFα, Il1 ou INFg. Elle est aussi à l'origine de

la production de NO, d'intermédiaires réactifs oxygénés dont H_2O_2, de radicaux libres et d'acide quinolinique (Minghetti et coll. 1999; Członkowska et coll. 2002).

Dans la cadre de la MP humaine, une augmentation de TNFα a été démontrée (Hunot et coll. 1997; Hunot et coll. 1999). Or, des études ont révélé que les neurones dopaminergiques disposent de récepteurs au TNFα: le TNFα-RI (Boka et coll. 1994). Des études sur des souris KO pour le gène TNFα-RI ou TNFα-RII ont conclu sur un rôle neurotoxique de l'activation du TNFα-RI et un rôle neuroprotecteur de l'activation du TNFα-RII (Kassiotis et Kollias 2001; Fontaine et coll. 2002). La fixation du TNFα sur son récepteur neuronal TNFαRI induirait l'apoptose des neurones DA, d'autant plus que l'expression du TNFα-RI semble augmentée dans la SN de patients parkinsoniens (Mogi et coll. 2000). Ainsi, la microglie activée en sécrétant le TNFα pourrait avoir un rôle délétère pour les neurones dopaminergiques.

Cependant, l'injection de TNFα dans la SN ne semble pas induire de dégénérescence DA significative (Castaño et coll. 2002). La microglie pourrait induire la mort des neurones par d'autres phénomènes.

Mis en parallèle avec l'augmentation de iNOS dans la SN de patients parkinsoniens (Hunot et coll. 1996; Knott et coll. 2000a), les principaux facteurs de l'action délétère de la microglie seraient les radicaux (nitr)oxygénés actifs et en particulier le NO et H2O2. En effet, l'enzyme iNOS est reconnue pour participer à la production de NO, or NO est une molécule susceptible d'être neurotoxique (Dawson et coll. 1993). L'ensemble des observations suggérait une augmentation de NO dans l'environnement des neurones DA au sein de la SNpc. NO réagirait avec des radicaux superoxydes pour former du peroxynitrite qui réagirait lui-même avec les résidus tyrosine des protéines cellulaires. Ces modifications chimiques pourraient être à l'origine d'altérations structurelles et fonctionnelles induisant la mort du neurone (Ischiropoulos et coll. 1992). Cette hypothèse s'appuie sur la mis en évidence de 3-nitrotyrosine dans l'agrégation protéique formant les corps de Lewy chez certains patients MP (Good et coll. 1998) et suite à l'intoxication de souris par le MPTP (Schulz et coll. 1995; Pennathur et coll. 1999).

De plus, le NO pourrait être à l'origine d'un relargage de fer à partir de la ferritine, augmentant ainsi la concentration de fer localement (Reif et Simmons 1990). Or nous avons déjà évoqué le rôle que le fer (via la réaction de Fenton) pouvait avoir dans le stress oxydatif.

La microglie activée pourrait aussi avoir un rôle neurotoxique en sécrétant de la prostagladine (PGE2).

Ainsi la production de cytokines et de radicaux libres par la microglie activée pourrait être à l'origine d'une induction directe de l'apoptose (via le TNFα) ou en induisant un fort stress oxydatif (via iNOS).

7-2-4 Chez l'humain

La présence d'élément indiquant la présence d'inflammation chez le patient

Depuis les travaux de McGeers à la fin des année 80, il est évident qu'il existe un lien très fort entre la neurodégénération et l'inflammation dans la MP, à tel point que l'activation microgliale fait quasiment partie de la définition histopathologique de la MP.

Jusqu'à peu, les études n'étaient portées que sur des coupes post-mortem de patients. Aujourd'hui des techniques de marquage de microglie permettent d'étudier l'activation et la position de celle-ci par PET-scan en temps réel. Cette technique a le grand avantage de permettre des études dynamiques chez l'homme. De même, dans un premier temps, seules les personnes intoxiquées au MPTP étaient des sujets où le déclenchement de la MP était certain (seulement il se différencie de la MP traditionnelle par l'absence de corps de Lewy). Aujourd'hui de nombreuses formes familiales de la MP ont été mises en évidence grâce à la détection des formes génétiques de la MP. Il va donc être de plus en plus facile de sélectionner certains patients à suivre, à cause de leur fort risque à déclarer la MP. Ainsi, s'il existe déjà les preuves de la présence de microglie (en particulier son phénotype inflammatoire) dont les études sont résumées dans le tableau 5, on peut s'attendre à avoir de nouvelles révélations très intéressantes d'ici peu.

Etudes	Eléments mis en évidence chez patients MP
Mc Geer et coll. 1988	Augmentation importante du CMH
Mogi et coll. 1994a,b	Augmentation du TNFa dans Str et LCR
Mogi et coll. 1995	Augmentation b2-microtubulin (CMH) dans Str
Blum-Degen et coll. 1995	Augmentation IL1b et IL6 dans LCR
Rowe et coll.,1998	Présence d'anticorps antiproteine « quinonilé »
Langston et coll.,1999	Gliosis et concentration microgliale autour des prolongements neuronaux (patient MPTP)
Mirza et coll. 2000	Abscence d'astrocyte activés
Knott et coll. 2000	Augmentation de iNOS et COX1-2
Knott et coll.,2002	Augmentation BDNF et NT-3 lors de la mort neuronale
McGeer et coll. 2002	Association entre Il1 et MP idiopathique
Imamura et coll. 2003	Nombre important de microglie dans SN, Put, Hip, et Cortex
Ouchi et coll. 2005	Variation parallèle entre activation microgliale et perte DA de la voie nigrostriée (PET/MP jeune)
Ishida et coll. 2006	Augmentation de PAR-1 dans astrocytes de SN

Gerhard et coll. 2006	Présence de microglie activée, mais ne varie pas avec l'avancée de la MP (PET)

Table 5. Récapitulatif des indices de phénomènes inflammatoires dans le SNC observés chez des patients MP. D'après Hald et Lotharius 2005

Ainsi il semble irréfutable d'associer la mort des neurones DA dans la SN à une situation d'inflammation. Malheureusement, à l'heure actuelle, le manque de dynamique des études chez l'humain nous empêche de mieux préciser l'ordre d'action des différents acteurs de la MP.

Malgré tout il est aussi possible de détecter l'apparition de biomarqueurs de l'inflammation dans le LCR de patients parkinsoniens dont un certain nombre de cytokines (IL-1, 2 et 6 et le TNFα) comme indiqué dans quelques-unes des études sus-citées. Ces données pourraient permettre de suivre dynamiquement l'évolution de l'inflammation de la MP, mais seulement de manière globale.

Cependant, face aux présomptions d'actions délétères de l'inflammation, différentes études rétrospectives et prospectives ont été menées concernant les risques de sensibilisation du SNC à l'inflammation (traumatisme ou infection) ou concernant les risques d'apparition de MP et la prise de traitements anti-inflammatoires.

Traumatisme/infection intracérébrale et risque de MP

Les différentes données expérimentales peuvent amener à placer l'inflammation de manière primordiale dans l'étiologie de la MP. Partant de cette hypothèse plusieurs études rétrospectives ont porté sur les liens potentiels entre un élément déclencheur de l'inflammation dans le SNC et les risques de MP.

Chronologiquement, suite aux résultats obtenus lors d'expérience d'injection de LPS *in utero*, des études ont été menées sur les risques d'infection pré et post-natale dans les années 90 (Lieu et saison de naissance, rougeole et autres infections virales infantiles (Logroscino 2005; Veldman et coll. 1998). Cependant, vu l'âge moyen d'apparition des symptômes, ces études font allusion à des événements du début du siècle, ce qui peut paraître lointain pour les patients interrogés et depuis les capacités de diagnostics ont beaucoup évoluées.

D'autres études centrées sur une infection virale plus tardive vont dans le sens d'un lien entre l'infection et le risque de MP. Cependant dans la discussion, l'étiologie multifactorielle de la MP prend le dessus et l'exposition virale ne semble pas en elle même suffisante comme élément déclencheur de la maladie.

Des études épidémiologiques ont mis en avant une augmentation de risque de MP suite à des

traumatismes crâniens importants (susceptibles d'induire une inflammation), seulement il est difficile de faire la part de l'action spécifique d'une gliose dans l'ensemble des éléments suivant un fort traumatisme crânien. En revanche, concernant des traumatismes crâniens moins importants, les conclusions se contredisent entre les différentes études.

Ainsi, ces études n'aboutissant pas à des résultats indiscutables, il est impossible de conclure de manière formelle dans un sens ou dans un autre à propos des liens entre le risque de MP et une situation inflammatoire plus précoce.

Prise de traitement anti-inflammatoire et risque de MP

Les résultats positifs de neuroprotections obtenus avec les NSAID lors d'études préliminaires *in vitro* ou chez l'animal ont encouragé certaines équipes à prospecter chez l'humain. Aujourd'hui, six grandes études associant la prise de NSAID et le risque de MP ont été publiées (Chen et coll. 2003; Chen et coll. 2005; Hernán, et coll. 2006; Bower et coll. 2006; Ton et coll. 2006; Bornebroek et coll. 2007; Etminan et coll. 2008). Les conclusions des études de Chen et coll. étaient plutôt encourageantes: le risque relatif de MP chez les personnes prenant régulièrement des NSAID diminuait d'au moins 35%. L'année suivante, si Bower et coll. confirmaient ces résultats, Hernan et coll étaient plus mitigés: s'il partageaient plus ou moins les conclusions de Chen et coll. concernant les hommes, le risque semblait au contraire accru pour les femmes. Enfin Ton et coll., Bornebroek et coll., et Etminan et coll. (les études les plus récentes) concluent sur un rôle nul de la prise régulière de NSAID par rapport au risque de MP.

Ainsi, certains protocoles ont permis de déterminer un lien entre ces deux facteurs. Cependant, au final, l'ensemble des résultats est trop divergeant pour conclure de manière formelle dans un sens ou dans l'autre. Les résultats expérimentaux, pourtant encourageants, ne semblent pas correspondre aux phénomènes observés chez l'humain.

L'ensemble des ces observations et résultats implique de manière évidente l'inflammation dans l'étiologie de la MP. Mais à quel titre?

L'activation microgliale, élément central des phénomènes inflammatoires dans le SNC, semble avoir un rôle délétère vis à vis des neurones DA en particulier. La neurotoxicité DA est induite par la synthèse et la sécrétion de différentes cytokines pro-inflammatoires impliquant un stress oxydatif local et un auto-entretien de l'inflammation.

Plusieurs résultats expérimentaux spéculent même sur un rôle primordial de l'inflammation. Cependant ces informations n'ont pu être confirmées dans un cadre

pathologique chez l'humain et semblent dépendantes des conditions expérimentales.

Le rôle précis de cette réction, n'est pas encore défini, mais il est certain que la microglie joue un rôle important dans l'étiologie complexe de la MP. Participent-elle à l'amplification de la neurodégénéréscence via son action cytotoxique? A-t-elle un rôle primaire dans le déclenchement de la MP?

A l'heure actuelle, le rôle et le « timing » d'intervention de la microglie restent encore flou mais sont en cours de précision. Aujourd'hui, dans l'intérêt et l'orientation du développement de nouvelles stratégies thérapeutiques il est nécessaire de mieux comprendre le rôle l'inflammation et son rapport avec le processus neurodégénératif dans le cadre de la MP.

Objectifs

L'objectif de cette thèse est:

- ✓ Dans un premier temps 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.
- ✓ Dans un second temps préciser le rôle de l'environnement glial dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques, provoquée par le neurotoxique qu'est la 6-OHDA.

1 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.

2 Cinétique de l'activation microgliale associée au processus neurodégénératif induit par la 6-OHDA

Depuis les travaux de McGeer (1988) qui ont mis en évidence une réaction microgliale active lors de l'étude de SN de patient MP, la microglie est suspectée de jouer un rôle important dans la pathogénie de la MP. Lors de son activation, la microglie peut sécréter un certain nombre de facteurs cytotoxiques auxquels les neurones DA de la SN sont sensibles. La microglie pourrait dans cette situation avoir un rôle délétère vis à vis de ces neurones. Il a d'ailleurs été montré que l'induction d'une inflammation conséquente dans la SN provoque la perte sélective des neurones DA (Herrera et coll. 2005). Ainsi l'activation microgliale pourrait avoir un rôle primaire ou tout du

moins amplificateur dans le processus neurodégénératif de la MP.

Afin de préciser le rôle potentiel de la microglie dans notre modèle, nous avons étudié de manière histologique la cinétique de l'activation microgliale induite par l'injection de 6-OHDA dans le FMT.

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

Suite aux résultats obtenus lors de l'étude histologique, nous avons souhaité caractériser d'un point de vue moléculaire cette réaction microgliale.

S'il a été montré que la réaction inflammatoire (médiée par certaine cytokine) consécutive à la lésion pouvait avoir un rôle délétère, la microglie activée est aussi susceptible de sécréter des facteurs trophiques bénéfiques à la survie cellulaire. Cette étude va nous donner une idée de la cinétique d'expression (sur 28 jours) des facteurs trophiques et inflammatoires entre des rats lésés de manière bilatérale et des rats shams afin de mieux comprendre le rôle potentiel de la microglie préalablement observée.

En outre, la caractérisation dynamique du contexte immunologique et trophique de notre modèle peut nous donner des informations importantes avant d'envisager une approche de thérapie cellulaire.

4 Conséquence de l'inhibition de l'activation microgliale sur le processus dégénératif induit par la 6-OHDA

Suite à cette expérience, nous avons souhaité inhiber l'activation microgliale à l'aide d'un médicament, la minocycline.

L'impact de l'inhibition de l'activation microgliale sur la perte des neurones DA de la SN dans la dynamique du processus dégénératif (Jour 7 après injection de 6-OHDA) devrait nous permettre de préciser le rôle de cette réaction.

Considérations méthodologiques

1 Lésion à la 6-OHDA

Le modèle de rat MP induit par l'injection de 6-OHDA existe depuis les années 70. C'est le modèle le plus classique chez le rat. Le MPTP est plutôt utilisé chez la souris ou le singe où la toxine franchie la BHE. Nous utilisons le rat SPD (Charles River, Rouen), un rat non consanguin bien adapté aux comportements moteurs. Les rats sont maintenus dans une pièce à 22°C avec une alternance lumière/obscurité toutes les 12h et avec un accès libre à la nourriture (ad libitum).

Comme nous l'avons évoqué, il existe plusieurs sites d'injection possible pour la 6-OHDA. Nous avons choisi de cibler le FMT. En effet, les injections dans le striatum semblent moins reproductibles et plus longues à se stabiliser dans le temps. Les injections dans la SN impliquent une forte lésion de la VTA si l'injection est médiale. Si l'injection est latérale, la perte des neurones DA va être préférentiellement latérale, ce qui n'est pas le cas dans la MP. L'injection dans le FMT permet une stabilisation de la perte des neurones DA au bout de trois à quatre semaines, épargne relativement la VTA et provoque une dégénération DA à partir de la partie postéro-médiale de la SN. En outre, nous n'utilisons pas de Pargyline, car si ce produit permet de protéger les autres neurones cathécolaminergiques, nous ne connaissons pas tous ses effets potentiels sur la plasticité cérébrale.

Les rats sont anesthésiés au rampun/kétamine (1/5) en i.m. Puis les injections sont pratiquées de manière stéréotaxique à partir de coordonnées obtenues de l'atlas stéréotaxique de Paxinos et Watson (1982). La 6-OHDA est dissoute dans du liquide physiologique et de l'acide ascorbique pour son rôle anti-oxydant. La toxine est injectée à vitesse constante grâce à un pousse-seringue. Puis la seringue est remontée de 0.5 unité pendant 2 minutes avant d'être extraite afin d'éviter les phénomènes d'aspiration. Les rats sont recousus et placés sous lampe chauffante pendant 1/2h, le temps de leur réveil.

Suite à la lésion, les rats perdent du poids pendant les 2 premières semaines, ils sont donc surveillés quotidiennement. Pour lutter contre une perte de poids létale, les rats sont nourris avec des croquettes humidifiées, du lait en poudre et des barres de céréales. Les rats ayant survécu à la fin de la deuxième semaine continuent ensuite à reprendre du poids tout seul.

2 Traitements

2-1 L-DOPA

En fonction des études, les rats sont traités à la L-DOPA (200 mg/kg) par voie orale pendant 1 semaine. La L-DOPA sous forme de comprimés est pilonnée puis dissoute dans de l'eau avant d'être injectée via une seringue et une canule intra-oesophagienne. Ce traitement permet une récupération fonctionnelle motrice et induit l'apparition de dyskinésies.

2-2 Minocycline

En fonction des études, les rats sont traités à la minocycline (50mg/kg) par voie orale. La minocycline est sous forme de gélules, celles-ci sont ouvertes et la poudre est dissoute dans de l'eau à 10mg/1ml avant d'être injectée deux fois par jour (8h30 et 19h30) via une seringue et une canule intra-oesophagienne. Ce traitement a pour but de provoquer l'inhibition de l'activité microgliale via un effet anti-inflammatoire.

3 Comportement

3-1 Stepping test

Dans les différentes études, nous utilisons une forme modifiée du stepping test (figure 14). Ce test est pratiqué afin de quantifier l'akinésie des membres antérieurs.

Figure 14. Stepping test

Les rats sont saisis, pattes postérieures maintenues, tandis que les pattes antérieures touchent la surface de la paillasse, recouverte d'une surface non glissante (moquette). 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). 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).

Le stepping test a une très bonne corrélation avec la perte TH striatal et nigrale

controlatérale. Ce test peut être aussi bien utilisé avec des animaux lésés de manière bilatérale et unilatérale.

3-2 Rotarod

Le rotarod permet de mettre en évidence les difficultés de coordination motrice des rats. Afin de mettre en évidence les problèmes moteurs des animaux, l'expérimentateur les fait courir sur un cylindre en rotation (rotarod ; Bioseb, Chaleville, Fr) à vitesse constante (6 t/min ; figure 15). 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.

Figure 15. rotarod

Les performances réalisées au rotarod, utilisé à vitesse constante, ont une très bonne corrélation avec la perte DA globale. Par contre, le rotarod n'est utilisable efficacement qu'avec les animaux lésés de manière bilatérale. En effet, les animaux lésés de manière unilatérale compensent le déficit moteur controlatéral grâce à leur côté valide. Ainsi, visuellement on détecte un trouble moteur, mais la quantification est faussée.

3-3 Ball test

Le test de la balle a été mis au point au laboratoire. Quand nous remettons les rats dans leur cage, il est fréquent qu'ils s'agrippent à nos mains le temps de les poser au fond. Lors de cette procédure routinière, nous avons remarqué que les rats lésés avaient des difficultés à nous lâcher la main. Nous avons donc cherché un moyen de quantifier cette difficulté. A l'origine, nous utilisions le dessous d'une chaussure de tennis, puis la forme et le la taille d'une balle de tennis nous a paru plus adapté pour que le rat s'agrippe.

Le test de la balle permet l'appréciation de la capacité de l'animal à initier ses mouvements. Le rat est maintenu à 15 cm de la paillasse, dos vers le sol. Une balle de tennis accrochée par un fil est présentée sur le ventre du rat qui l'agrippe par réflexe. Le rat est

Figure 16. Ball test

lâché et la balle tenue par le fil est lentement descendue dans une cage vide transparente, jusqu'à ce que le dos de l'animal soit au contact de la sciure (figure 16). De manière générale, les rats se retournent spontanément sur leurs pattes. Lorsque les rats ont un déficit de l'initiation du mouvement, ils restent agrippés à la balle dos contre le sol avec des mouvements de détachement. Le temps que le rat lâche la balle pour se remettre sur ses pattes est chronométré 3 fois avec un maximum de 2 min par essai. Le score attribué au rat correspond au cumul du temps des 3 essais.

Le Ball test à une bonne corrélation avec le déficit DA global. Cependant ce test n'est utilisable qu'avec des animaux lésés de manière bilatérale. En effet, un rat ayant un côté valide se dégage immédiatement de la balle, comme les rats témoins.

Tous ces tests moteurs sont parfaitement corrélés entre eux et permettent un diagnostic clinique du déficit DA des rats. Ils permettent une sélection des animaux et un sous-classement par groupe en fonction de la gravité des symptômes.

3-4 Dyskinésie

Pour évaluer les mouvements anormaux provoqués par le traitement à la L-DOPA, les rats sont observés individuellement 1 h après la prise de L-DOPA et sont notés. Pour qu'un mouvement soit classé comme anormal, il faut qu'il soit répétitif et 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) :

- "Comportement tourneur", correspondant à une rotation involontaire de l'animal sur lui-même.
- Dystonie axiale, correspondant à l'inclinaison tonique du cou du côté de la rotation.
- Dyskinésie orolinguale, correspondant à un mouvement des mâchoires stéréotypé et une protusion controlatérale de la langue.
- Mouvements anormaux stéréotypés (dyskinésies) de la patte avant.

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 à 16.

4 Sacrifice

Les animaux sont sacrifiés à la fin des études. Ils le sont de manières différentes en fonction des analyses suivantes :

- En vue d'immunohistochimie, les rats sont sacrifiés par perfusion intracardiaque de PFA. Après avoir été anesthésiés par une dose sublétale de rampun/kétamine, les rats sont perfusés par 250ml d'une solution froide (4 C°) de paraformaldéhyde 4% (PFA ; Merck and Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA) dilué dans du PB(S). Les perfusions sont réalisées à l'aide d'une pompe (Fischer Bioblock Scientific ; Pittsburgh, PA, USA) dont le débit est réglé à 25ml/min. A l'origine l'ensemble du système sanguin était d'abord nettoyé par une première perfusion de NaCl, mais certaines protéines avaient le temps de changer d'état (par ex: phosphorilation) et étaient moins bien reconnues par les anticorps. Les cerveaux sont ensuite rapidement prélevés et post-fixés dans une solution de PFA 4% pendant une heure, puis cryoprotégés dans une solution de sucrose 25% (Sigma-Aldrich) diluée dans du PB(S) à 4°C. Ils sont enfin congelés dans de l'isopentane (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France) refroidi à –40°C puis conservés à –80°C.
- En vue de biologie moléculaire, les rats sont sacrifiés au CO2. Les zones d'intérêt du cerveau sont rapidement prélevées suite à la dissection dans un moule à cerveau (brain matrice) et plongées dans l'azote liquide puis conservés à –80°C.

5 Immunohistochimie

Des sections coronales sériées 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 contenants du PB(S) à 4°C en attendant leur traitement par histochimie.

A partir des coupes, différents marquages immunohistochimiques sont pratiqués en deux étapes (méthode indirecte), dont la première étape est commune à nos deux méthodes de révélation.

Dans un premier temps, les coupes flottantes de cerveaux sont incubées la nuit à +4°C sous agitation, en présence de(s) l'anticorps I (AcI) dans du tampon PB(S) / Triton 0,3%. Cette incubation est précédée de la saturation des peroxydases endogènes pendant 30 min à température ambiante par de l'H_2O_2 0,3% dans du PB pH 7,4.

5-1 Colorimétrie

Pour les marquages en colorimétrie: dans un deuxième temps, les coupes de cerveau sont incubées en présence de l'anticorps secondaire (AcII) fabriqué chez l'âne et dirigé contre les immunoglobulines de l'animal chez qui est produit l'AcI et couplé à la biotine, dilué au 1/500 pour les coupes au niveau de la substance noire et du striatum dans du tampon PB(S) pH 7,4 / Triton 0,3%. Le signal du complexe AcI/AcII ainsi formé est ensuite amplifié. Pour cela les coupes sont incubées avec le kit ABC (Vector) dilué au ½ dans du PB pendant une heure à température ambiante. Ce réactif (ABC) permet la formation d'un complexe biotine-avidine-peroxydase. Ce complexe est révélé à l'aide du kit DAB de Vector utilisant la diaminobenzidine qui assure la formation d'un précipité marron (figure 17). Puis les coupes sont étalées sur des lames gélatinées et séchées 24h à température ambiante. Ensuite, les coupes sont déshydratées dans des bains successifs d'éthanol (75°, 95°, 100°) pendant 10 min chacun, puis sont plongées pendant 10 min dans du xylène avant la pose d'une lamelle sur lame à l'aide d'un baume (Eukitt).

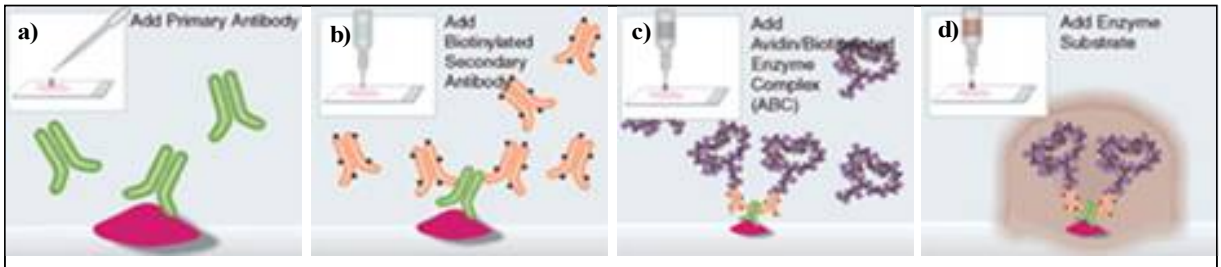


Figure 17. Les 4 grandes étapes de l'immunohistochimie:
a) Bain d'AcI dirigé vers la protéine d'intérêt.
b) Bain d'AcII (couplé à la biotine) dirigé vers l'AcI, formation d'un complex AcI/AcII
c) Bain d'Avidine/ Biotin/ péroxidase
d) Révélation des complexes préformés

5-2 Fluorescence

Pour les marquages Fluorescent: Dans un deuxième temps, les coupes de cerveaux sont incubées en présence de l' AcII fabriqué chez l'âne et dirigé contre les immunoglobulines de l'animal chez qui est produit l'AcI et couplé à un fluorochrome, dilué au 1/500 pour les coupes au niveau de la substance noire et du striatum dans du tampon PB(S) pH 7,4 / Triton 0,3%. Le complexe AcI/ AcII ainsi formé est visualisé à l'aide d'un marqueur fixé sur l'AcII sous certaines longueurs d'onde. Les coupes sont ensuite étalées sur des lames polylisine et séchées 24 h à température ambiante. Ensuite on pose une lamelle sur lame à l'aide d'un baume (Gel/Mount).

L'intérêt majeur des marquages immunofluorescents est de pouvoir réaliser plusieurs marquages différents sur une même coupe. Ceci est facilement réalisable en utilisant 2 AcI fabriqués chez des animaux différents, puis en les associant à des AcII couplés à des fluorochromes différents. La liste des AcI utilisés sont résumé tableau 5

Anticorps I	Production	Dirigé contre	Anticorps II
TH	Peel freez	Neurones DA	Anti rabbit/ Anti sheep
OX42	Labo (surnageant)	Microglies	Anti mouse
ED1	Labo (surnageant)	Microglies (phagocytose)	Anti mouse
GFAP	Dakopatts	Astrocytes	Anti rabbit

Tableau 5: liste des AcI utilisés.

5-3 Fluoro-jade B

Le protocole de marquage Fluoro-jade B est plus particulier. Les coupes sont étalées sur des lames gélatinées puis séchées 1h à température ambiante. Ensuite les coupes sont réhydratées en passant par des bains d'alcool décroissants (100, 95 et 75°) et H2O avant d'être plongées ¼ h dans du KMNO4. Ensuite, elles sont incubées ½ h dans un bain fluoro-jade/ acide acétique (0,001%/0,6M). Enfin, les lames sont séchées ¼ h à l'étuve, puis sont plongées pendant 10 min dans du xylène avant la pose d'une lamelle sur lame à l'aide d'un baume (Eukitt).

5-4 Stéréologie

Pour chaque rat, les cellules immunomarquées positivement sont observées à l'aide d'un microscope Eclipse E400 (Nikon Corporation, Tokyo, Japon) à platine motorisée, et relié à un ordinateur par une caméra numérique. Puis elles sont comptées sur au moins 5 niveaux sériés différents de la SNc en utilisant le logiciel de stéréologie Mercator (ExploraNova, La Rochelle, France). Brièvement, un périmètre est tracé autour de

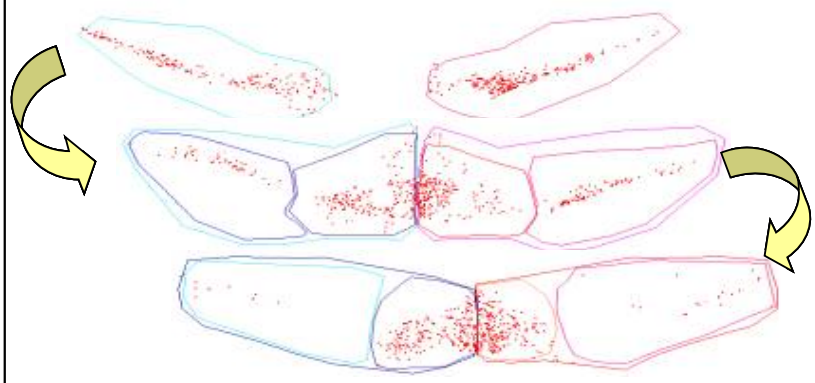


Figure 18. Schéma représentant 3 maquettes de comptage, à 3 niveaux rostro-caudaux de SNpc (réalisé avec le logiciel Merkator). Chaque point rouge représente le comptage d'une cellule TH-positive. Cette analyse permet d'évaluer la topographie lésionnelle de chaque animal.

la SN et de l'ATV pour chaque coupe en se référant à l'atlas de Paxinos et Watson (1982). On place alors (numériquement) une grille de « dissectors » (50x50µm espacés chacun de 250µm) sur nos zones d'intérêt. Les dissectors sont des carrés bicolores comprenant un zone d'inclusion et une d'exclusion. A un grossissement X40, seulement les cellules avec un noyau clairement visible dans les dissectors et ne touchant pas les bords d'exclusions, sont comptées. Les coupes sont séparées entre elles par 5 ou 11 coupes en fonction des études, soit 200 ou 440 µm. Le nombre de cellules ainsi comptées est exprimé en densité cellulaire (figure 18).

6 Analyse moléculaire

6-1 Extraction 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 même 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).

Dans un premier temps, les fragments de cerveaux étaient 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 étaient alors précipités à température ambiante pendant 15 minutes. Après séparation, la phase aqueuse contenant les ARN totaux était récupérée. Les ARNm étaient précipités dans l'isopropanol, récupérés par centrifugation, puis le culot lavé à l'éthanol. Maintenant nous utilisons des kits d'extraction d'ARN (Rneasy mini kit; quiagen) pour les mêmes étapes.

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 donnent 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 l7 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 µl d'enzyme reverse transcriptase (Mouse Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase, 200U/ml) sont ajoutés aux échantillons dans un volume final de 25µl de 50 mM Tris, pH 8.3, 3 mM $MgCI_2$, 125 mM KCl. Après 1 heure d'incubation à 42°C (synthèse des acides désoxyribonucléiques), on ajoute de 75µl d'eau pour préparations injectables, puis l'ADN complémentaire (ADNc) est conservé à -80°C.

6-2 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 19) : 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

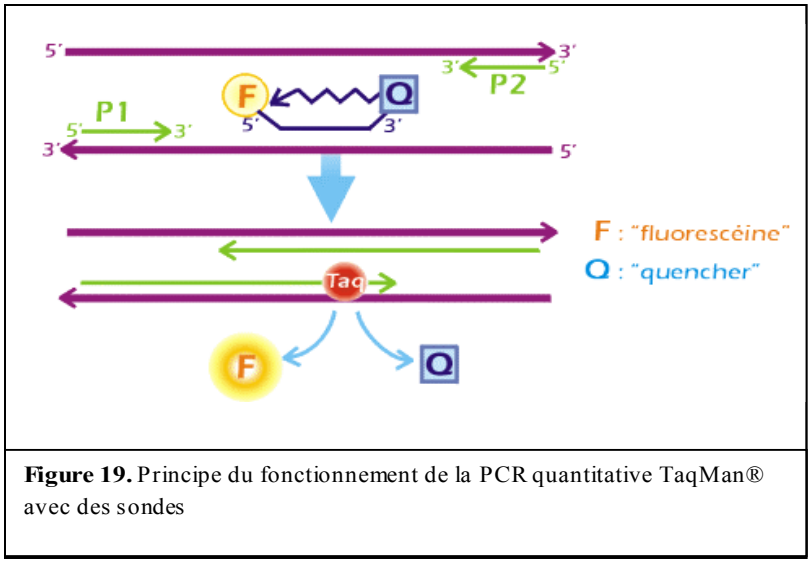


Figure 19. Principe du fonctionnement de la PCR quantitative TaqMan® avec des sondes

en temps réel au cours de la réaction d'amplification. Les détails de la méthode sont présentés dans l'article 3**.**

7 Préparation cellulaire pour les greffes

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 fœtal) 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.

Résultats

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

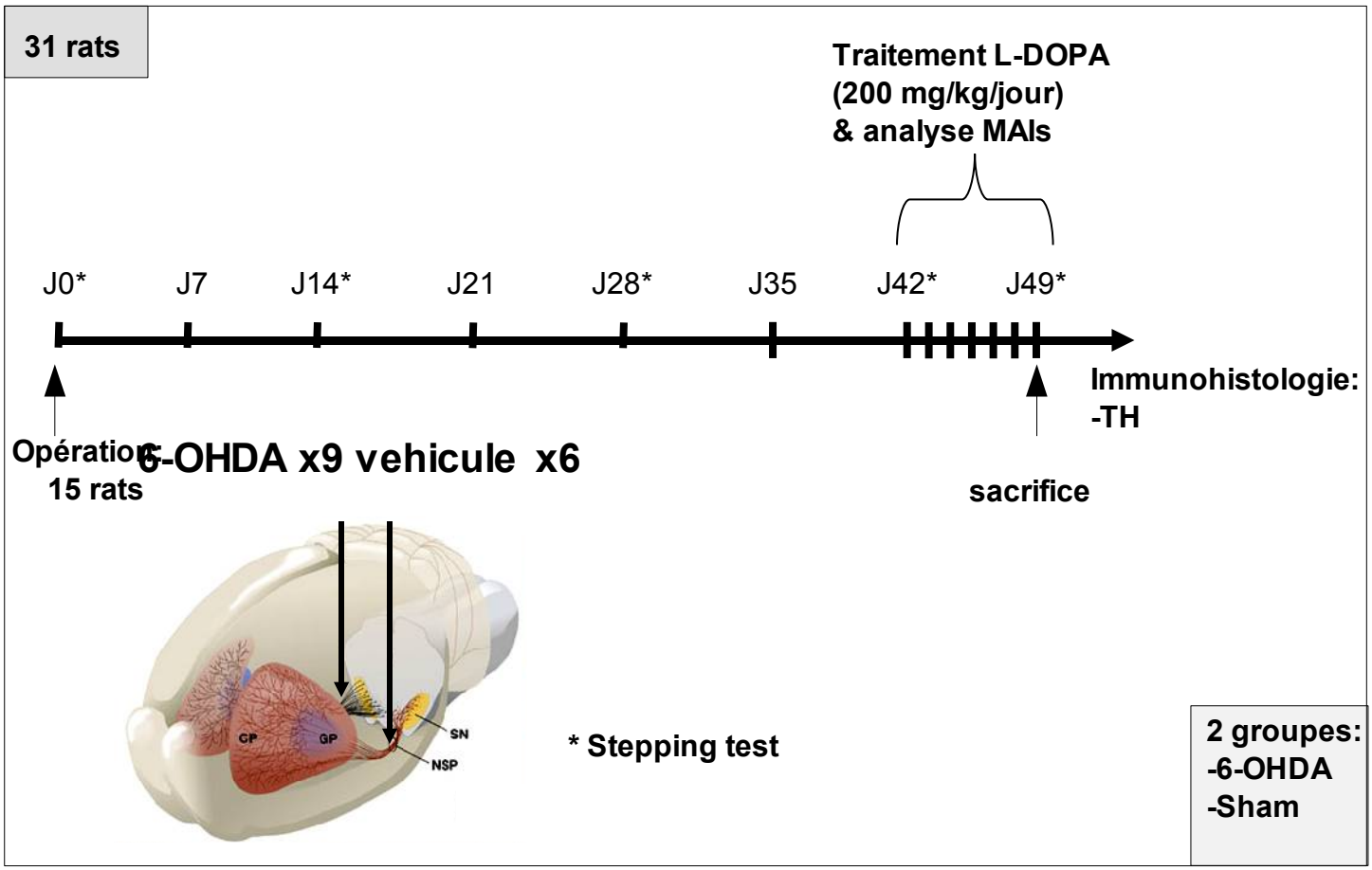
1-1 Présentation

Jusqu'à présent, la plus part des modèles MP de rats utilisés sont des rats « hémi-parkinsoniens ». Ils sont obtenus à partir d'une injection unilatérale de 6-OHDA et les observations comportementales motrices se limitent souvent à l'utilisation d'apomorphine ou amphétamine induisant un comportement rotatoire extrême. Or, la perte de neurones DA dans la MP concerne les deux hémisphères, bien que généralement asymétrique. Nous avons donc souhaité produire un modèle ayant un maximum de caractéristiques communes avec celles observées dans la MP humaine autant au niveau clinique qu'au niveau anatomopathologique.

Le but de ce modèle est d'être reproductible, d'avoir un tableau symptomatique fiable et correspondant à une réalité anatomopathologique. Les symptômes moteurs doivent être réversibles sous traitement reconnu (L-DOPA) et ce traitement doit aussi être à l'origine de troubles secondaires comme observés chez l'humain.

Après différents essais, nous avons décidé d'injecter la 6-OHDA au niveau du FMT. Puis, suite aux injections bilatérales de 6-OHDA dans les FMT, nous avons quantifié: l'akinésie des animaux, leur comportement moteur avant et pendant un traitement à la L-DOPA, l'apparition de dyskinésie et la perte des neurones DA dans la SN. La méthode et les résultats obtenus sont discutés dans la publication suivante.

1-2 Synopsis de l'étude



1-3 Principaux résultats

Ce modèle possède donc de nombreuses caractéristiques communes avec celles de la MP humaine:

- ✓ Neurodégénérescence DA dans la SNpc et perte d'afférence DA au niveau du striatum (quantifiables).
- ✓ La perte des neurones DA est partielle et les zones médio-postérieures sont les plus touchées.
- ✓ Symptôme akinétique (quantifiable) corrélé avec la perte DA.
- ✓ Disparition des symptômes par traitement oral à la L-DOPA.
- ✓ Apparition de troubles moteurs incontrôlés (quantifiables) suite au traitement symptomatique.

Par ailleurs, nous avons pu mettre en évidence que ce modèle était réalisable dans d'autres souches de rats (Lewis 1A et Lewis 1W) avec une susceptibilité à la 6-OHDA différente.

Nous avons aussi observé une corrélation entre différents tests moteurs (rotarod, ball-test, le stepping test) chacun étant prédictifs de la perte DA. Ce qui nous permet de dresser un tableau

clinique élargie à la coordination motrice et la rigidité des membres, prédictif de la gravité de la neurodégénérescence et du risque d'apparition de dyskinésies.

Enfin, bien que soudaine par rapport à la MP humaine, nous avons pu établir que la dégénérescence induite par la 6-OHDA se déroulait progressivement sur 3 semaines avant de se stabiliser au niveau de la SN.

1-4 Perspectives

Un tel modèle ouvre un certain nombre de perspectives pour l'étude de traitements plus ou moins complexes. Bien caractérisé, il permet de tester aussi bien l'effet de nouveaux médicaments ou de thérapies plus lourdes comme la transplantation de nouveaux neurones. Il est possible de suivre cliniquement une éventuelle neuroprotection, des phénomènes de récupérations comportementales et l'apparition d'effets secondaires sans contrainte de compensation par le côté valide.

2 Cinétique de l'activation microgliale associée au processus neurodégénératif induit par la 6-OHDA

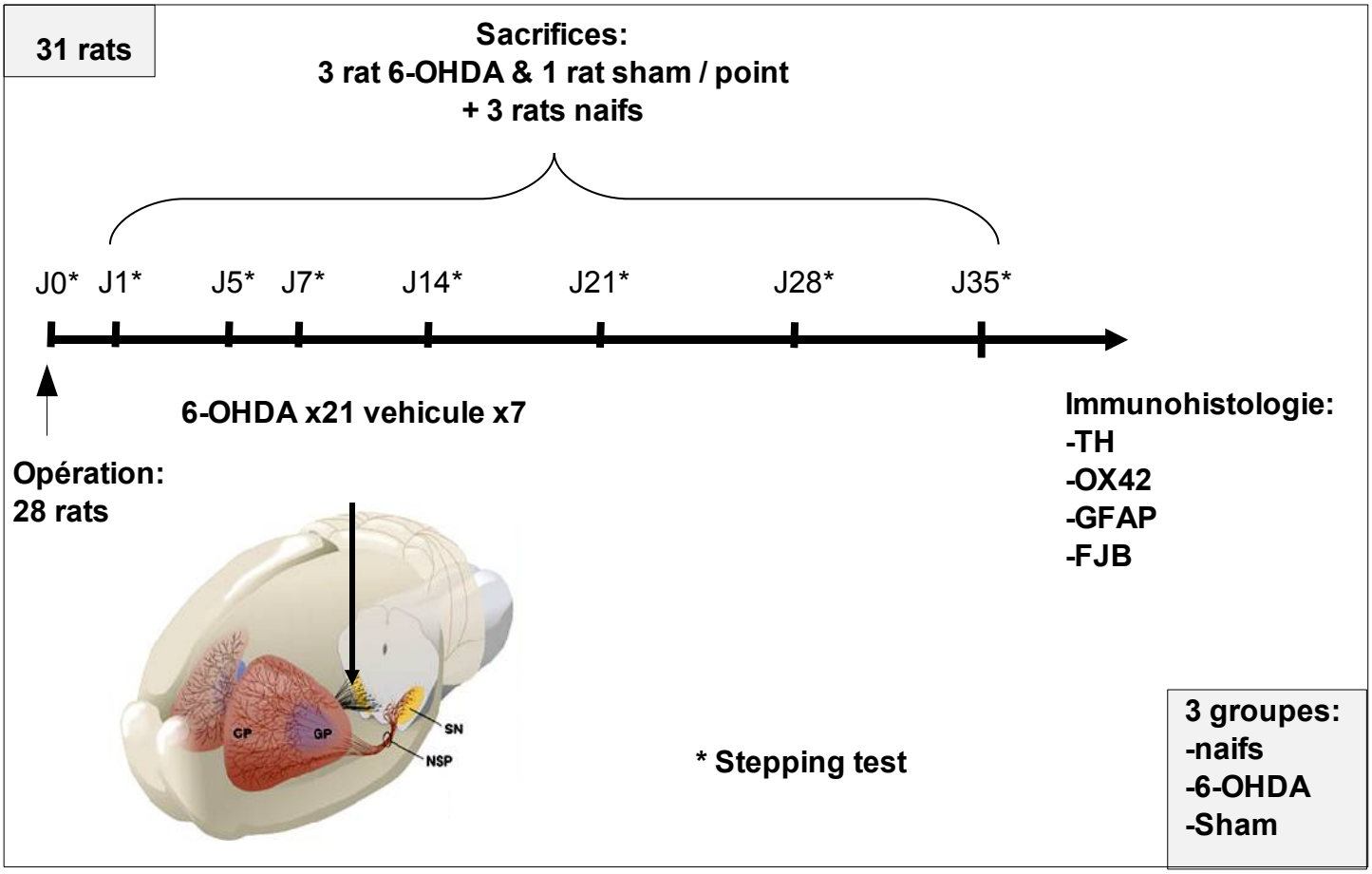
2-1 Présentation

Le temps de terminer la caractérisation du modèle MP de rat bilatéral, nous avons souhaité définir l'environnement inflammatoire accompagnant la neurodégénérescence. En effet, comme nous l'évoquions dans l'introduction générale, il reste de nombreuses questions concernant le rôle de l'inflammation dans la MP. De plus il n'existe pas à l'heure actuelle de cinétique précise de glioses accompagnant le processus dégénératif neuronal dans la SN.

Pour ce faire, nous avons utilisé le modèle de lésion unilatérale à la 6-OHDA déjà bien caractérisé. Nous avons établi une cinétique sur 35 jours en appuyant nos observations sur les jours précoces (1, 2, 3, 5 et 7), puis sur chaque semaine (J14, 21, 28 et 35). Dans la présentation suivante sous format publiable nous ne parlons pas des points J2 et J3 qui apportent juste un lissage des différents graphiques entre J1 et J5.

Dans l'étude suivante nous avons quantifié l'akinésie, la perte DA au niveau de la SN et du striatum, la mort neuronale dans la SN et le phénotype microglial OX42 dans la SN. La méthode et les résultats obtenus sont discutés dans la préparation de l'article suivant.

2-2 Synopsis de l'étude



2-3 Principaux résultats

Cette étude a permis de mettre en évidence une activation microgliale strictement concomitante au processus neurodégénératif.

De plus, l'activation microgliale observée est exclue des zones encore saines de la SN qui vont pourtant diminuer dans le temps.

Enfin, l'inflammation observée dans la SN des rats shams n'induit pas de perte des neurones DA.

L'ensemble de ces résultats suggère que dans notre modèle, l'activation microgliale n'est pas primaire à la mort des neurones, mais serait plutôt induite par cette dernière.

2-4 Perspectives

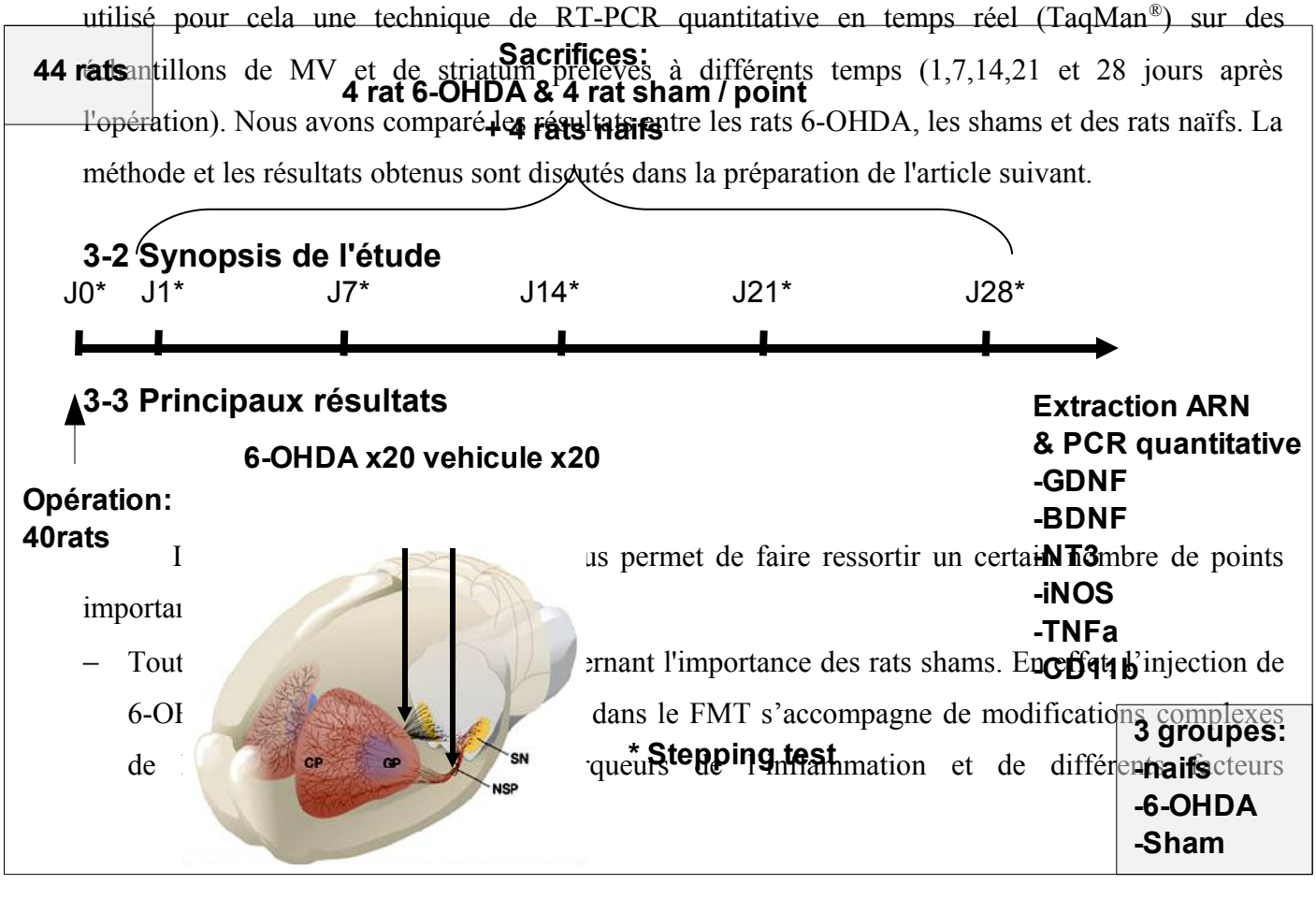
Nous avons ainsi pu définir la cinétique de l'activation microgliale en fonction du processus neurodégénératif, celle-ci étant concomitante. Afin de préciser dans notre modèle, le rôle positif ou non de cette activation microgliale sur la survie des neurones, nous avons voulu caractériser l'environnement inflammatoire et neurotrophique induit par l'injection de 6-OHDA dans le temps. Nous avons aussi voulu inhiber l'activation microgliale avec un outil pharmacologique: la minocycline.

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

3-1 Présentation

Après avoir caractérisé le modèle bilatéral sur le plan comportemental et histologique (quantification de la perte neuronale par comptage) et avoir établi une cinétique précise de l'activation des différents acteurs accompagnant le processus dégénératif (dans un modèle unilatéral), nous avons étudié sur le plan moléculaire l'effet de la lésion bilatérale sur l'expression de marqueurs inflammatoires et neurotrophiques, dans le striatum et le mésencéphale ventral (MV). En effet, la mort des neurones DA dans le modèle de rat 6-OHDA est provoquée par un stress oxydatif et semble accompagnée par une activation microgliale concomitante.

Dans le but de mieux caractériser l'environnement immunologique de notre modèle bilatéral et d'essayer de définir le rôle de la microglie observée, nous avons établi une nouvelle cinétique sur 28 jours avec l'analyse chaque semaine des variations de l'ARNm de certains facteurs pro-inflammatoires (CD11b, TNFα et iNOS) et neurotrophiques (GDNF, BDNF et NT3). Nous avons utilisé pour cela une technique de RT-PCR quantitative en temps réel (TaqMan®) sur des échantillons de MV et de striatum prélevés à différents temps (1,7,14,21 et 28 jours après l'opération). Nous avons comparé les résultats entre les rats 6-OHDA, les shams et des rats naïfs. La méthode et les résultats obtenus sont discutés dans la préparation de l'article suivant.



I us permet de faire ressortir un certain nombre de points importa

– Tout ernant l'importance des rats shams. En effet, l'injection de 6-OH dans le FMT s'accompagne de modifications complexes de queurs 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.

- De plus, l'absence d'ARNm de GDNF dans le striatum et l'augmentation transitoire de TNFα chez les rats shams et injectés à la 6-OHDA (donc due au traumatisme opératoire) dès le premier jour suivant l'opération, sont en accord avec la littérature et valident la précision de notre méthode de prélèvement et d'analyse.
- Ensuite, concernant la compréhension de l'environnement inflammatoire induit par la 6-OHDA on note que:
    - 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 cytotoxique 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 (direct ou indirect) 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.

3-4 Perspectives

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.

4 Effet délétère d'un traitement à la minocycline

4-1 Présentation

Après avoir précisé la cinétique d'activation de la microglie accompagnant la neurodégénérescence DA dans la SN induite par une injection unilatérale de 6-OHDA dans le FMT, nous avons voulu préciser le rôle de cette réaction gliale. Dans ce but, nous avons procédé à une approche pharmaceutique en utilisant un traitement à la minocycline.

La minocycline est un antibiotique de seconde génération dérivé de la tétracycline (Good et Hussey 2003). Outre son action anti microbienne, elle exerce des effets anti-inflammatoires. Elle est très bien absorbée par le système gastro-intestinal après une administration orale, la concentration plasmatique maximum est atteinte 1 à 4 h après l'administration et la demi-vie est d'environ 15 h (Berger et coll. 1989). Chez les rongeurs, la minocycline passe rapidement la BHE.

Il a été montré en culture cellulaire mixte neurones-microglie que la minocycline avait des effets neuroprotecteurs. Récemment, ces phénomènes ont été confirmés dans différents modèles animaux comme dans des modèles d'ischémie globale et focale (Tikka et coll. 2001), de la maladie d'Huntington (Chen et coll. 2000), de la sclérose latérale amyotrophique (Zhu et coll. 2002) et de l'encéphalomyélite auto-immune (Popovic et coll. 2002). Concernant la MP, plusieurs études sur différents modèles dont le MPTP (Du et coll. 2001; Wu et coll. 2002) et la 6 OHDA (He et coll. 2001) ont montré que la minocycline possédait un réel potentiel pour atténuer l'inflammation et les processus neurodégénératifs qui se produisent dans le cerveau.

La plupart des études de l'effet d'un inhibiteur de l'inflammation ont conclu à un rôle neuroprotecteur de ces traitements *in vivo* ou *in vitro*. Ces résultats suggèrent un rôle actif de la microglie dans la dégénérescence neuronale dans ces modèles de MP. Alors qu'un protocole clinique à base de minocycline a été mis en place chez l'humain, des travaux récents ont montré un possible rôle délétère de ce traitement chez des singes intoxiqués au MPTP et dans un modèle de la maladie d'Huntington suite à l'intoxication au 3NP de souris.

Le but de notre expérience était de mettre en évidence le rôle de l'activation microgliale en s'affranchissant de son action. L'augmentation ou la diminution de la neurodégénérescence suite à l'inhibition de l'activation microgliale devait nous informer sur son rôle, respectivement, plutôt délétère ou bénéfique. Dans un premier temps, nous avons choisi de concentrer nos observations au 7ème jour suivant l'injection pour plusieurs raisons. Ce temps correspond au maximum de

dégénérescence et d'activation microgliale dans notre modèle. De plus, la perte des neurones se stabilisant entre la 3ème et la 4ème semaine suivant l'opération, l'analyse au 7ème jour, nous permet d'être dans une partie dynamique. Enfin, le traitement à la minocycline pouvant induire une perte de poids, il nous parait plus raisonnable de se contenter d'un temps assez court.

Dans la littérature, les protocoles de traitement à la minocycline sont très variables. L'assimilation par voie orale ayant déjà démontré son efficacité au sein du laboratoire, nous avons choisi ce mode d'administration. Afin d'avoir une quantité régulière de minocycline dans le parenchyme cérébral, nous avons opté pour commencer le traitement 3 jours avant l'opération avec l'administration biquotidienne d'une dose assez forte jusqu'à la fin de l'expérience.

L'analyse de l'effet de la minocycline sur la perte neuronale a été 1) évaluée de façon comportementale grâce au stepping test permettant d'apprécier la perte des neurones à dopamine chez ces rats et 2) de façon immunohistochimique par la mesure de la perte des neurones dopaminergiques (TH et fluoro-jade B) et de la réaction microgliale (OX42 et ED1).

4-2 Méthode simplifiée

4-2-1 Animaux

Les études sont réalisées sur 16 rats mâles adultes Sprague Dawley (SPD) âgés d'environ 7 semaines et pesant 250 à 300g au début de l'expérience. Ils sont maintenus à l'animalerie dans une pièce à 22°C, sous cycle nycthéméral de 12h, avec un libre accès à l'eau et à la nourriture (*ad libitum)*. Dès le premier contact, les rats sont marqués sur la queue pour permettre un suivi jusqu'à la fin de l'expérimentation. Les rats sont divisés en 4 groupes (n=4) :

- ✓ Groupe 1 : véhicule + gavage à l'eau
- ✓ Groupe2 : véhicule+ gavage à la minocycline
- ✓ Groupe 3 : 6 OHDA+ gavage à l'eau
- ✓ Groupe 4 : 6 OHDA+ gavage à la minocycline

4-2-2 Administration de la minocycline

L'administration de minocycline (Zacnan, Merck) est effectuée chez les groupes 2 et 4 par voie orale à la dose de 50 mg/Kg. Les animaux sont gavés 2 fois par jour (8h30 et 19h30) via une

seringue et une canule intra-œsophagienne. Le traitement dure 10 jours : 3 jours avant la lésion jusqu'au sacrifice. La minocycline est dissoute dans de l'eau, la préparation à la concentration de 50 mg/ml étant effectuée juste avant l'injection, ainsi les animaux reçoivent 0.1 ml de solution pour 100 g de poids.

Les animaux des groupes 1 et 3 reçoivent de l'eau suivant le même protocole que les deux autres groupes (0.1 ml d'eau pour 100 g deux fois par jour à 10 h d'intervalle) afin d'induire un stress équivalent.

4-2-3 Réalisation des lésions dopaminergiques

Avant l'intervention chirurgicale, les rats SPD sont anesthésiés par injection intramusculaire (im) d'une solution de Rampun (Bayer, Leverkusen, Allemagne) et de Kétalar (Panpharma, Fougères, France; 1/4) à raison de 1 ml/kg. Les rats sont placés sur un cadre stéréotaxique (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA).

Afin d'obtenir une lésion unilatérale de la voie dopaminergique nigro-striatale, une injection stéréotaxique de 6-OHDA (Sigma-Aldrich) est réalisée dans le FMT de l'hémisphère gauche. La 6-OHDA est dissoute à la concentration de $3g.l^{-1}$ dans une solution de 0,9% NaCl 0,02% L-ascorbate (Sigma-Aldrich). D'après l'atlas stéréotaxique de Paxinos et Watson (1982), un volume de 2,75 µl de 6 OHDA est injecté par rapport au Bregma selon les coordonnées suivantes: -4,4 selon l'axe antéro-postérieur, +1,2 selon l'axe latéral et à -7,8 selon l'axe ventral (par apport à la dure-mère). La barre des dents étant positionnée à -2,3.

L'injection a lieu à vitesse constante (0,4 $\mu l.min^{-1)}$ à l'aide d'un pousse-seringue (KdScientific ; New Hope, PA, USA), en utilisant une microseringue de 10µl (Hamilton, Reno, NV, USA).

Les groupes d'animaux 1 et 2 sont soumis aux mêmes descentes de canule et volumes d'injection que les rats recevant la toxine. Uniquement le véhicule (0,9% NaCl 0,02% L-ascorbate) est injecté.

4-2-4 Test comportemental: Le stepping test

Le « Stepping Test » est pratiqué afin de quantifier l'akinésie des membres antérieurs des rats traités lors de cette étude. Le test est pratiqué selon les mêmes modalités que dans les expériences précédentes.

4-2-5 Marquages immunohistochimiques

Après la perfusion intracardiaque au PFA 4% des animaux, les cerveaux sont prélevés. Des analyses histologiques sont pratiquées sur des coupes sériées de 35 µm au niveau du striatum et de la SN de chaque rat. Les marquages immunohistologiques (TH, GFAP, OX42 et ED1) sont réalisés comme précédemment décrit et révélés au DAB (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA94010). De même, le marquage Fluoro-jabe-B est réalisé comme décrit précédemment.

4-2-6 Analyse et quantification histologiques

Pour calculer de façon non biaisée le nombre de cellules marquées positivement, la méthode d'analyse stéréologique décrite dans l'étude de la cinétique d'activation microgliale est utilisée

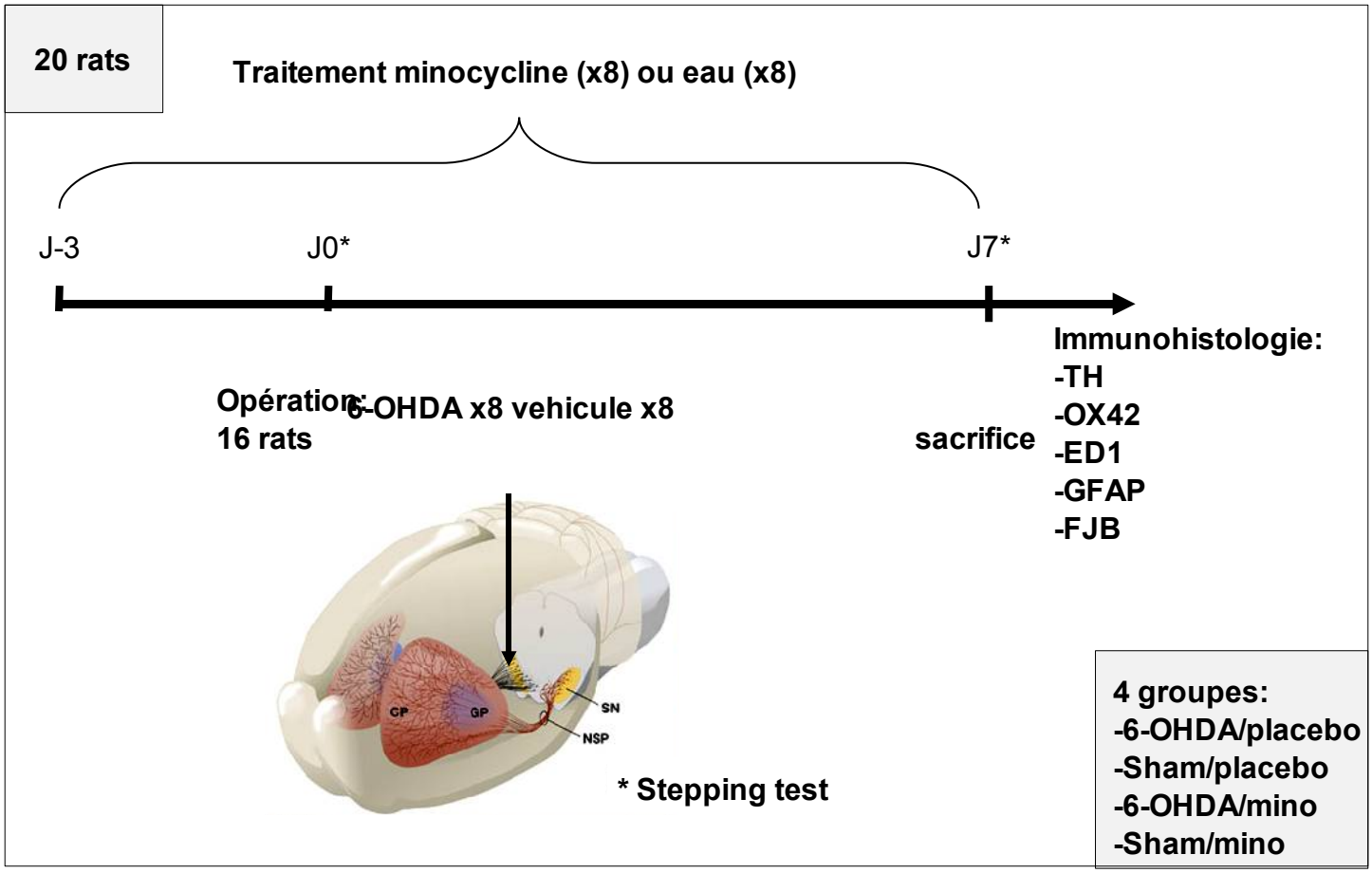
Il en est de même pour calculer la densité optique dans le striatum.

4-2-7 Analyse statistique

Les résultats des tests comportementaux ainsi que les comptages sont exprimés en fonction de leurs moyennes +/- la SEM pour chaque groupe. Les comparaisons entre les différents groupes sont effectuées en faisant un test ANOVA à deux facteurs suivi d'un test de Bonferonni.

Le test de Pearson est utilisé pour étudier les corrélations. Les statistiques de cette étude sont effectuées par le logiciel GraphPad Prism.

4-3 Synopsis de l'étude



4-4 Résultats

4-4-1 Suivis des animaux

Les animaux sont pesés quotidiennement, les rats appartenant aux groupes 4 et 5 perdent du poids successivement à la lésion. C'est pourquoi ils disposent, d'en plus de leur régime habituel, des croquettes trempées dans du lait afin de leur faciliter l'accès à la nourriture. Malgré cela un rat du groupe 5 est décédé.

4-4-2 Test comportemental

Les rats ayant reçu la 6-OHDA ont une performance significativement inférieure à celle des rats sham. Chez les animaux lésés, il n'y a pas de différence significative entre le groupe ayant reçu le traitement à la minocycline et celui ayant reçu de l'eau, cependant les performances des rats traités tendent à être plus faible ($p=0.071$; planche 1A).

4-4-3 Études histologiques

Marqueurs neuronaux

Au niveau de la Substance Noire

Les rats lésés à la 6-OHDA présentent un pourcentage de perte en neurones dopaminergiques (TH-positifs) significativement plus élevé dans la SN du côté lésé par rapport aux shams et aux naïfs ($p<0.001$). Chez les rats injectés à la 6-OHDA, on constate une perte significativement plus forte ($p<0.05$) chez ceux traités avec de la minocycline (80% de perte) par rapport à ceux ayant reçu de l'eau (50% de perte; planche 1D).

Au niveau du striatum

Les rats lésés à la 6-OHDA présentent dans le striatum du côté lésé un pourcentage de perte en fibres dopaminergiques (TH-positives) significativement plus élevé par rapport aux shams et aux naïfs ($p<0.001$). Chez les rats injectés à la 6-OHDA, il existe une perte significativement plus forte ($p<0.05$) chez ceux traités avec de la minocycline (70% de perte) par rapport à ceux ayant reçu de l'eau (50% de perte; planche 1B).

Marquage avec le Fluoro-Jade B

Aucune cellule marquée n'est observée dans les 2 premiers groupes (Groupe 1 : véhicule + gavage à l'eau, groupe 2 : véhicule+ gavage à la minocycline). De nombreux neurones marqués sont observés dans les deux derniers groupes (Groupe 3 : 6-OHDA+ gavage à l'eau, groupe 4 : 6-OHDA+ gavage à la minocycline).

Après un comptage systématique sur les substances noires aux mêmes niveaux que précédemment (TH), chez les animaux lésés ceux ayant reçus de la minocycline ont un nombre

significativement plus important de neurones Fluoro-Jade-positifs que ceux ayant reçu de l'eau (planche 1C).

Marqueurs de l'inflammation

Après avoir caractérisé la perte du phénotype TH au niveau du striatum et de la SN ainsi que la dégénérescence neuronale de la SN, le marquage de la microglie a été effectué afin de montrer la possible action de la minocycline sur celle-ci.

Marquage avec l'anticorps OX42.

L'anticorps anti-OX 42 est dirigé contre le CD11b et le CD11c, marqueurs présents à l'état quiescent sur les cellules microgliales. On sait que ces marqueurs augmentent en nombre et en intensité avec l'activation de la microglie. Grâce aux différences morphologiques évoquées précédemment entre la microglie activée et la quiescente, il a été possible de distinguer les deux formes et ainsi de les comptabiliser séparément (comme décrit dans l'article 2).

Aucune différence n'a été montrée pour la forme quiescente entre les différents groupes. Par contre, les rats lésés à la 6-OHDA présentent une densité de cellules microgliales activées significativement plus importante dans la SN par rapport aux shams et aux naïfs ($p<0.001$). Chez les rats injectés à la 6-OHDA ceux traités avec de la minocycline avait une densité significativement ($p<0.05$) plus forte que ceux ayant reçu de l'eau (planche 1E).

Marquage avec l'anticorps ED1

En s'activant la microglie acquière une fonction lysosomiale. L'anticorps ED1 en marquant le CD68 va permettre de visualiser la microglie activée. Les rats lésés à la 6-OHDA présentent une densité de cellules microgliales ED1 positives significativement plus importante dans la substance noire par rapport aux shams et aux naïfs ($p<0.001$). Chez les rats injecté à la 6-OHDA, la densité est significativement plus élevée ($p<0.05$) chez ceux traités avec de la minocycline que chez ceux ayant reçu de l'eau (planche 1F).

Corrélation entre la mort cellulaire et l'activation microgliale

Afin de faire le lien entre la mort neuronale et la réaction microgliale, nous avons testé la

corrélation entre la dégénérescence neuronale et l'activation pour chaque rat des deux groupes ayant reçu la 6 OHDA (groupe 3et 4).

Il existe une corrélation positive entre la mort des neurones dopaminergiques dans la SN et l'activation des cellules microgliales à ce même niveau. On obtient le même résultat en remplaçant ED1 par les cellules OX42 positives activées.

Étude astrocytaire

Les astrocytes tout comme la microglie font partie des cellules gliales. Ce sont les cellules les plus représentées dans le cerveau. Elles occupent différents rôles en s'impliquant notamment dans diverses actions neuroprotectrices à travers la synthèse de facteurs neurotrophiques ou en détoxificant des radicaux libres. Elles jouent de plus un rôle dans l'inflammation appelée l'astrogliose. Pour toutes ces raisons il a semblé intéressant de regarder le niveau astrocytaire dans la substance noire pour chacun des groupes.

Il n'existe pas de différences significatives en densité de cellules astrocytaires entre les différents groupes.

4-5 Discussion

De manière surprenante, nos résultats n'ont pas mis en évidence une inhibition de l'activation microgliale, mais à l'opposé une dégénérescence neuronale plus forte chez les animaux traités par minocycline par rapport à ceux traités à l'eau. Dans les 2 groupes d'animaux lésés à la 6-OHDA, nous observons une activation microgliale proportionnelle à la neurodégénérescence.

La minocycline étant rapidement et complètement absorbée, passant la BHE et ayant une demi-vie de 15h (Blum et coll. 2004), le traitement administré par voix orale deux fois par jour aurait dû permettre l'effet inhibiteur attendu. Cependant, si la minocycline n'a pas eu l'effet escompté, le traitement a tout de même induit des différences significatives entre les rats gavés de ce médicament et ceux gavés à l'eau. L'état général des animaux ayant reçu de la minocycline après avoir été lésés avec la 6-OHDA semblait moins bon que celui des animaux non traités. Ils semblaient en effet plus « apathiques » et avaient une perte de poids conséquente. Un des rats traités est mort en phase de traitement. Les doses utilisées dans notre étude (50 mg/Kg) peuvent pleinement expliquer cet effet ; il a été démontré que des doses supérieures à 25 mg/Kg peuvent produire une perte de poids substantielle, une irritation de la peau, une augmentation des enzymes

hépatiques et des triglycérides ainsi qu'une diminution de l'excrétion de potassium (Blum et coll. 2004). Cependant, aucun vomissement ou phénomène diarrhéique pouvant expliquer une éventuelle expulsion de la minocycline n'a été observé.

Bien que contraire à notre hypothèse de travail, l'ensemble des résultats est cohérent. D'abord, l'observation des troubles moteurs au stepping test et une perte en neurone dopaminergique dans la SN confirment la validité du modèle de rat MP utilisé dans cette étude (Paillé et coll. 2007b). Si les rats ayant reçu le traitement par minocycline ont de moins bonnes performances au stepping test que ceux ayant reçu de l'eau, ces résultats sont en accord avec une perte en neurones dopaminergiques et de l'innervation dopaminergique striatale plus forte chez les premiers que chez les seconds. En l'absence d'effet inhibiteur de l'activation microgliale, nos résultats sont aussi cohérents avec l'analyse de la microglie activée par rapport à nos études précédentes sur ce même modèle . En effet, avec deux marqueurs de surface différents (OX42 et ED1), une réaction microgliale plus forte a été observée chez les rats ayant la perte neuronale la plus sévère correspondant à une neurodégénérescence active.

La minocycline est classiquement décrite comme ayant des propriétés inhibitrices de la réaction microgliale bien que les mécanismes mis en jeux ne soient pas encore explicités. Les mécanismes de neuroprotection apportés par la minocycline semblent aussi résider en partie dans ses propriétés anti-apoptotiques, à savoir l'inhibition de la libération du cytochrome c de la mitochondrie et l'inhibition de la capase 3 et 1 (Zhu et coll. 2002). Des effets additionnels ont été attribués à la minocycline incluant l'inhibition de l'upregulation transcriptionnelle et de l'activation d'iNOS et la downregulation de cytokines pro-inflammatoires (Mishra et Basu 2008). Cependant nous n'avons pas exploré ces voies dans cette étude, ne pouvant conclure sur un échec total ou non de l'effet de la minocycline.

L'utilisation des mêmes doses de toxine (6-OHDA injectée dans le FMT) et des doses similaires de minocycline (45 mg/Kg vs. 50 mg/Kg) administrées comme ici 3 jours avant la lésion a conduit à des conclusions opposées dans une autre étude. Contrairement à notre étude où les animaux sont sacrifiés à J7, les animaux étaient sacrifiés 4 semaines après la lésion. Cette différence de date de sacrifice pourrait être l'explication à cette contradiction. En effet, dans notre étude la perte en neurones dopaminergiques est d'environ 50% dans la SN à J7, tandis que pour une même dose de 6-OHDA, elle est d'environ 90% à J 30 quand la lésion est stabilisée (Hudson et coll. 1993; Quintero et coll. 2006). L'effet neuroprotecteur de la minocycline pourrait donc se manifester plus tardivement. Il faut souligner aussi qu'il n'y avait pas dans cette étude d'analyse de la microglie, le mécanisme d'action de la minocycline n'a pu donc être précisé avec certitude. Il n'est pas non plus exclu que l'effet de la minocycline varie en fonction de l'intensité ou de la nature du processus dégénératif (apoptose versus nécrose par exemple).

Du fait qu'à J7 la perte neuronale n'est toujours pas stabilisée, nos résultats suggèrent un effet accélérateur de la minocycline si on estime une perte de 90% à terme pour les rats traités à l'eau (Hudson et coll. 1993; Quintero et coll. 2006). En effet, il est possible que la minocycline puisse avoir un effet pro-toxique vis-à-vis de la 6-OHDA. Il faut souligner que les mécanismes d'action précis de la minocycline restent discutés, son action inhibitrice sur la microglie n'ayant pas toujours été montrée *in vivo* (Fendrick et coll. 2005). De façon intéressante, le rôle délétère de la minocycline a été observé dans d'autres modèles de MP. Chez le singe, après exposition au MPTP, un autre neurotoxique spécifique des neurones dopaminergiques, une exacerbation des dommages provoqués par ce toxique a été retrouvée chez les animaux traités par minocycline dans deux études différentes (Yang et coll. 2003; Diguet et coll. 2004). Une des hypothèses avancées était une augmentation de la toxicité du MPTP par la minocycline suite à une interférence entre la recapture du MPP+, la forme réellement toxique du MPTP, dans les vésicules terminales striatales à travers le système de recapture vésiculaire dopaminergique (VMAT2). La confirmation d'un rôle pro-toxique de la minocycline sur la 6-OHDA pourrait constituer une explication à nos résultats. L'étude de façon plus précise des effets de la minocycline sur la voie d'action toxique de la 6-OHDA est nécessaire pour préciser ce point.

Dans cette hypothèse, la plus forte activation microgliale observée serait par conséquent simplement secondaire au processus neurodégénératif plus fort provoqué par la 6-OHDA chez les animaux traités par minocycline. On retrouve d'ailleurs la même corrélation entre la dégénérescence et l'activation microgliale que celle observée dans l'étude précédente effectuée au laboratoire (article 2). Du fait de l'effet a priori inhibiteur de la minocycline, cette étude associée à ces résultats irait dans le sens d'une activation microgliale neurones-dépendante et non d'une neurodégénerescencemicrogliale-dépendante.

Enfin, on ne peut pas exclure l'hypothèse d'un effet inhibiteur plus précoce de l'activation microgliale. En admettant ce phénomène comme délétère vis-à-vis de la survie des neurones, une neurodégénérescence exacerbée ferait basculer la balance inhibition/activation de l'inhibition vers l'activation microgliale qui serait observée à J7. Une cinétique plus fine des temps précoces (entre J1 et J7) nous permettrait de préciser ce point.

Par ailleurs, en accord avec la littérature (Kriz et coll. 2002; Yrjänheikki et coll. 1999), dans notre étude la minocycline n'exerce pas d'activité inhibitrice sur l'astrogliose, bien que les cellules astrocytaires peuvent être importantes pour l'activité de la minocycline (Du et coll. 2001). Ce résultat démontre que dans notre modèle les astrocytes ne jouent pas un rôle primordiale dans la microgliose 7 jours après l'injection, comme nous le suggérions déjà dans notre cinétique en montrant une augmentation transitoire de la densité astrocytaire au sein de la substance noire seulement 1 et 5 jours après l'injection de 6-OHDA (article 2).

4-6 Conclusion et Perspectives

N'ayant pas observé d'inhibition de l'activité microgliale, nous ne pouvons conclure sur notre hypothèse initiale. Nos résultats sont en apparente contradiction avec la littérature. Contrairement à ce qui a souvent été relevé, le traitement à la minocycline augmente la neurodégénérescence DA suite à l'injection de 6-OHDA. Nos observations pourrait être expliquées par un rôle protoxique de la minocycline sur la 6-OHDA. Afin de préciser ce point, il serait intéressant de tester différentes doses de 6-OHDA avec le même traitement à la minocycline.

Une cinétique plus fine pourrait aussi nous permettre de mettre en évidence une inhibition plus précoce.

Après nos travaux précédents, l'augmentation de l'activation microgliale proportionnelle à la neurodégénérescence suggérerait une activation microgliale induite par la mort des neurones plutôt que l'inverse. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour préciser ce point et donc le rôle de l'environnement microgliale dans la dégénérescence dopaminergique.

Enfin, suite aux travaux ayant déjà montré un rôle délétère de la microglie (Yang et coll. 2003; Diguet et coll. 2004) dans des modèles expérimentaux de MP, il semble important de reconsidérer les essais cliniques actuellement en court chez l'humain qui n'ont pas encore montré de rôle positif de ce traitement (NINDS PET-PD Investigators, 2008).

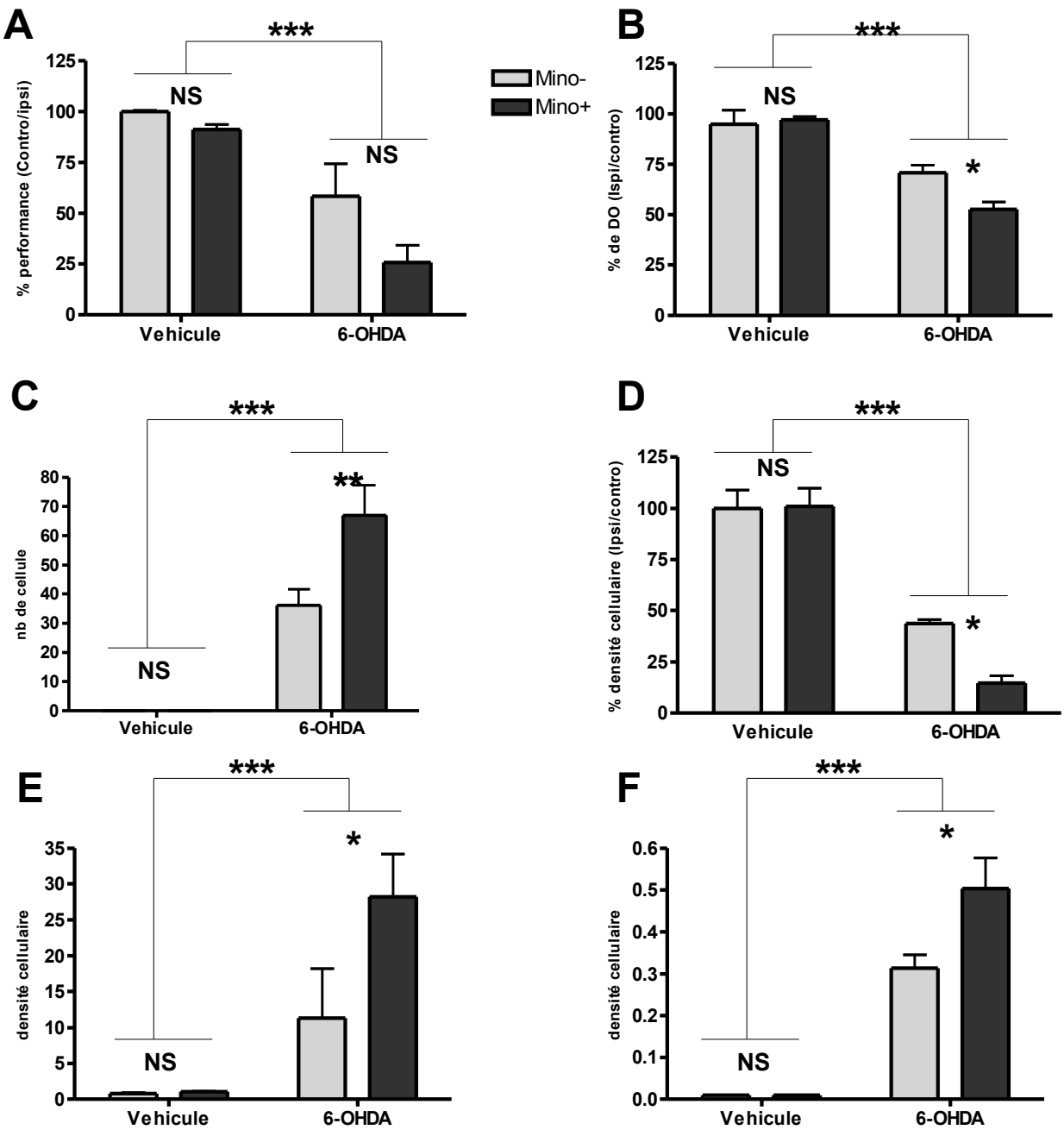


Planche 1: Evaluation, **A** : da l'akinésie des membres antérieurs (stepping test), **B**: de l'innervation DA dans le striatum (TH), **C**: de la neurodégénérescence dans la SN (FJB), **D**: du nombre de neurones DA dans la SN (TH), **E & F**: de l'activation microgliale dans la SN (respectivement, OX42amiboïde et ED1). Comparaison entre les rats shams et lésés, traité ou non à la minocycline. **p<0,05;****p<0,01; ***p<0,001; NS: non significatif.

Discussion générale

1 Questions techniques

1-1 Intoxication la 6-OHDA

Actuellement, aucun animal ne déclare de syndrome parkinsonien de manière naturelle. Ainsi, l'étude de la MP à partir de modèles animaux implique de déclencher artificiellement la maladie. La manière la plus simple est d'utiliser un toxique spécifique de neurones DA. Ceci est déjà arrivé de manière accidentelle chez l'humain avec le MPTP (Langston 1996). Cette toxine traverse la BHE et provoque une lésion bilatérale et spécifique de la voie nigro-striatale suite à une injection systémique. L'utilisation de ce type de modèle évite un acte chirurgical lourd et épargne la BHE. Cependant, le MPTP est dangereux pour l'expérimentateur et surtout il ne traverse pas efficacement la BHE chez le rat, d'où l'obligation d'une injection intracérébrale comme lors de l'utilisation de la 6-OHDA. Or, désirant travailler chez les rats pour les avantages décrits dans l'introduction (quantité et utilisations de tests comportementaux moteurs), nous avons décidé d'utiliser la 6-OHDA pour induire la perte des neurones DA dans la SNpc. Nous avons choisi des coordonnées stéréotaxiques (Paxinos et Watson, 1982) correspondant au FMT afin de nous affranchir d'un risque de lésion mécanique de la SN et parce qu'une injection de 6-OHDA dans le FMT est plus stable et plus reproductible qu'une injection dans le striatum.

La 6-OHDA induit un stress oxydatif chez les neurones DA et/ou une inhibition de la mitochondrie qui vont être à l'origine de la dégénérescence des premiers. Si actuellement les causes de la MP humaine ne sont pas encore bien connues, le stress oxydatif et un dysfonctionnement mitochondrial pourraient être des éléments déclancheurs dans un certain nombre de cas. De plus, il existe une production endogène de 6-OHDA au niveau des neurones DA de la SNpc, même si celle-ci est marginale et très éloignée des quantités injectées lors de la production de notre modèle. Ainsi, l'utilisation de la 6-OHDA peut se rapprocher d'une certaine réalité sur certains points. Cependant, ce déclenchement artificiel est brusque et correspond mal à la mise en place lente de la MP chez l'humain dont la prévalence augmente avec l'âge. Les 4 semaines de neurodégénération observées dans notre modèle sont sans doute insuffisantes pour la mise en place de la plasticité cérébrale accompagnant la perte des neurones chez l'humain.

Actuellement, notre laboratoire développe un modèle transgénique de MP chez le rat. Celui-ci aurait les avantages dus à l'utilisation du rat couplés à un développement de la maladie dont la pathogénie se rapprocherait davantage de celle de la MP humaine (temps, préservation de la

BHE...).

1-2 Viabilité

L'injection de 6-OHDA dans le FMT est à l'origine de la destruction de la voie dopaminergique nigro-striatale. En plus des troubles moteurs quantifiables, cette lésion induit aussi un état cataleptique accompagné par une aphagie et une adipsie (respectivement une difficulté à manger et à boire). En plus de l'effet physiologique direct, les rats doivent s'habituer à leur nouvel « handicap » pour se nourrir.

Lors de lésions unilatérales, les rats perdent du poids, mais le côté valide permet une plus grande résistance des animaux. En revanche, la version bilatérale de ce modèle a longtemps été considéré comme non viable (Ungerstedt 1968). Lors de la mise au point de notre modèle, nous avons été confrontés à une perte de poids létale pour les animaux. Cependant, l'utilisation de doses modérées de 6-OHDA en 2 points d'injections dans le FMT permet de ne léser que partiellement la SNpc et d'épargner l'ATV dans une certaine mesure, tout en induisant une perte DA suffisante pour l'apparition de symptômes moteurs. Le choix des coordonnées d'injection et la dose de 6-OHDA utilisée semblent moins délétères que celles utilisées pour les modèle unilatéraux.

De plus, il semble qu'en injection bilatérale, la 6-OHDA a plus d'effet qu'en injection unilatérale, ainsi pour un même niveau lésionnel, la dose injectée dans le FMT a pu être réduite d'un facteur 4 dans notre modèle. Ceci peut être expliqué par l'absence de phénomènes de compensation transhémisphérique qui peuvent exister à partir de l'hémisphère intact. Ceci a déjà été décrit par (Roedter et coll. 2001) qui a montré que pour la même quantité de 6-OHDA injectée par striatum, une lésion bilatérale entraînait des déficits moteurs plus importants qu'une lésion unilatérale.

Dans le cadre de notre modèle, la survie des animaux est aussi assurée par une attention particulière à leur nutrition lors des 2 premières semaines suivant l'injection. En effet, les rats ayant survécu au début de la 3ème semaine survivent jusqu'à la fin des études sans problème. Le moment critique de survie se situe entre la 1ère et la 2ème semaine, où les rats perdent le plus de poids. Une fois leur poids inférieur à 200g, les rats sont souvent condamnés. Pour évité cela, nous nourrissons deux fois par jour les animaux avec du lait en poudre 1er âge, des croquettes mouillées et des barres céréalières dissociées. Au bout de 2 semaines 85 à 90% des rats survivent. Ils réussissent progressivement à ce nourrir par eux-même et reprennent du poids.

1-3 Compensation motrice

Une fois l'effet létal de la lésion bilatérale maîtrisé, celle-ci apporte de nombreux avantages par rapport aux modèles de lésions unilatérales. Premièrement, la MP touchant les 2 hémisphères chez l'humain, nous pouvons espérer en être plus proche physiologiquement. En effet, comme nous l'évoquions précédemment, il existe des mécanismes de compensation transhémisphérique. Ces mécanismes ont été mis en évidence en particulier au niveau du striatum. Il a en effet été démontré qu'une lésion unilatérale de la SN pouvait induire un bourgeonnement des fibres dopaminergiques dans la partie ventro-latérale du striatum (Blanchard et coll. 1996). Ainsi, en plus d'un bourgeonnement des neurones DA restant du côté lésé, il pourrait s'ajouter un apport de DA dû à un bourgeonnement des fibres DA du côté non lésé. Cette compensation transhémisphérique pourrait être à l'origine d'une modification du rapport entre la dénérvation ipsylatérale à l'injection et le comportement moteur controlatéral.

En plus de ces compensations physiologiques, il existe des compensations physiques lors des tests moteurs cliniques. Ainsi, de nombreux tests efficaces avec des rats lésés de manière bilatérale ne sont plus discriminants lorsqu'ils sont utilisés sur des rats « hémi-parkinsoniens ». Par exemple, le côté valide permet de contrecarrer les déficits moteurs du rat lors du test du rotarod ou du test de la balle. De ce fait, l'évaluation clinique des modèles de rat unilatéraux repose classiquement sur l'évaluation des mouvements rotatoires provoqués par l'administration d'agent pharmacologiques dopaminergiques (apomorphine, amphétamine,...). Ces mouvements rotatoires sont assez éloignés de ce qui est observé chez l'humain où les anomalies motrices sont présentes en dehors de tout traitement pharmacologique.

En outre, on ne connaît pas encore précisément l'impact de l'utilisation de tels traitements sur la plasticité cérébrale, ni les interactions que pourraient avoir ceux-ci avec un autre traitement d'intérêt (L-DOPA, minocycline,...). Par exemple, il semble que l'effet de l'apomorphine se fasse ressentir encore 3 semaines après une injection. Sa demi-vie empêche donc une estimation clinique régulière.

Enfin, les modifications de comportement obtenues par une action thérapeutique ne sont pas systématiquement synonymes de restauration DA. Par exemple, dans des études de greffes striatales sur des rats lésés de manière unilatérale, le test du rotomètre est le plus utilisé pour évaluer la récupération motrice (Björklund et Stenevi 1979; Herman et Abrous 1994). La récupération fonctionnelle évaluée au rotomètre est complète 2 à 3 semaines 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 (Dunnett et coll.

1981a; Dunnett et coll. 1981b; Dunnett et coll. 1983; Herman et coll. 1985; Herman et coll. 1993). D'ailleurs, des études de microdialyse *in vivo* ont montré que le niveau de DA libérée après une injection d'amphétamines était moins élevé dans le striatum greffé que dans le striatum controlatéral (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 moteur mis en évidence par le stepping test, alors qu'ils diminuent les rotations induites par les drogues. Ainsi, il est difficile de distinguer l'effet d'une stratégie thérapeutique visant à diminuer les symptômes moteurs de l'effet propre des substances utilisées pour les évaluer (Barker et Dunnett), il peut en découler une mauvaise interprétation entre l'observation du comportement et les dommages neuronaux lorsqu'on utilise le rotomètre.

Nous préconisons donc plutôt l'utilisation de tests non-invasifs et basés sur les réflexes moteurs comme le stepping test (Chang et coll. 1999; Olsson et coll. 1995). Ce test est directement lié au degré de sévérité des lésions dopaminergique et a l'avantage d'être discriminant sur des animaux lésés de manière unilatérale et de différentier chaque membre antérieur sur des animaux lésés de manière bilatérale. En outre, il met en évidence la récupération motrice sous traitement DA reconnu comme efficace chez l'humain.

Enfin, au vu de nos différentes études, il semblerait aussi que le décours de la mise en place des phénomènes inflammatoires et en particulier de l'activation microgliale soit différent en fonction du modèle utilisé. Bien qu'il puisse exister un décalage important entre l'étape de traduction et de synthèse protéique, ceci n'est pas la règle générale, ainsi, nos résultats suggèrent que la réaction microgliale induite par une lésion bilatérale est plus tardive que celle induite par une lésion unilatérale. Ceci peut-être dû à un recrutement plus lent sur 2 foyers inflammatoires que sur un seul ou peut-être à une variation de l'environnement inflammatoire plus rapide si un hémisphère reste intact. En tout cas, il existe une différence en fonction du nombre de sites lésionnels. Reste à savoir si dans le domaine de l'inflammation, les résultats obtenus dans le modèle bilatéral, par conséquent plus proche de la MP humaine sont plus proches des évènements de la maladie.

1-4 Dyskinésies

Des dyskinésies ont été obtenues sous traitement dopaminergique dans notre modèle avec une sémiologie qui est plus proche 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 remise en question (Langston et coll. 2000; Nutt 1990; Brotchie et Fox 1999; Chase 1998). Il 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). Aujourd'hui, l'échelle de quantification des dyskinésies chez le rat mise en place par Cenci (Cenci et coll. 1998) est reconnue.

Il faut cependant souligner que dans notre modèle, les dyskinésies observées apparaissent dès le premier jour de traitement alors que chez l'humain elles mettent plusieurs années à se manifester. La même observation qui à déjà été faite avec une lésion unilatérale dans notre laboratoire (Paillé et coll. 2004) est retrouvée ici dans notre étude avec une lésion bilatérale. Les dyskinésies apparaissent en fait à partir d'un certain seuil de dénervation. 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'humain, les dyskinésies obtenues chez nos animaux étaient asymétriques, avec une prédominance controlatérale au côté le plus lésé.

1-5 Importance des shams

Certaines études réalisées lors de cette thèse ont montré l'importance des shams. Les shams sont des animaux opérés comme les animaux injectés à la 6-OHDA, à la différence qu'on injecte uniquement le véhicule. Ainsi, contrairement aux rats naïfs, les rats shams subissent le même traumatisme chirurgical que les animaux lésés. Il est donc plus facile de faire la part de l'action de la

6-OHDA et celle du traumatique opératoire. L'hypothèse d'un impact des traumatismes crâniens sur la dégénérescence DA ayant été étudié chez l'humain, il semble important de dissocier l'effet potentiel du traumatisme de l'action de la toxine. Dans toutes nos études, les shams ont des performances motrices équivalentes aux rats naïfs et ne présentent pas de perte des neurones DA au niveau de la SN. Nous en déduisons que nos analyses portent sur l'effet spécifique de la 6-OHDA.

Lors de la caractérisation de notre modèle, la comparaison des rats léses avec les shams nous a permis de montrer une variation d'ARNm de certains facteurs pro-inflammatoires et neurotoxiques commune aux 2 groupes. Celles-ci semble être induite par le traumatisme opératoire. Ensuite, l'effet spécifique de la 6-OHDA sur ces facteurs apparaît trois semaines après l'opération alors que le processus neurodégénératif est presque terminé.

1-6 Validation du prélèvement pour l'analyse moléculaire

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 rendement 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. 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. Cependant, lors de l'analyse cytologique sur le modèle unilatéral, nous avons montré que les cellules microgliales activées après dénervation dopaminergique sont principalement localisées dans la SNpc. De plus 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 évènements 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 Synthèse des résultats

2-1 Intérêt de notre modèle dans l'étude de nouvelles stratégies thérapeutiques

Le modèle de rat MP bilatéral que nous avons mis au point peut nous permettre de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques en les comparant aux effets bénéfiques et indésirables de la L-DOPA (traitement de référence chez l'humain). En effet, nous avons montré que les troubles moteurs bilatéraux induits par la 6-OHDA étaient quantifiables et réversibles sous traitement à L-DOPA. De plus, ce traitement induit l'apparition de dyskinésies. Nous avons donc voulu tester le rétablissement dopaminergique en greffant des neurones dopaminergiques à la fois dans le striatum et dans la SN de ces animaux.

En effet, si des résultats positifs indiscutables ont été obtenus chez les patients (Kordower et coll. 1995; Peschanski et coll. 1994) et si la survie des greffons semble actuellement satisfaisante, un grand nombre d'inconnues demeurent (site optimal, quantité de cellules à greffer). En outre, 2 études américaines (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. Enfin, 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 (Winkler et coll. 2005). Ainsi, dans notre modèle, nous cherchions à comparer de potentielles récupérations motrices et l'apparition de dyskinésies ou non suite à la transplantation de neurones embryonnaires (E15) dans le striatum et dans la SN.

La caractérisation de l'environnement inflammatoire et neurotrophique par RT-PCR nous ayant indiqué une augmentation de l'ARNm de GDNF 28 jours après l'injection de 6-OHDA, cela nous a encouragé à choisir cette date pour la transplantation. En effet, 28 jours après l'injection de 6-OHDA, la lésion est stabilisée et on peut donc espérer un environnement favorable au développement des neurones greffés. De plus, pour s'affranchir au maximum des risques de rejet (et limiter les variables) nous avons greffé du SPD sur du SPD suite à une présélection comportementale.

Comme attendu, nous n'avons pas observé d'infiltration lymphocytaire ou macrophagique dans nos greffons ni mis en évidence d'indice de rejet 9 semaines après la transplantation. De même, l'étude histologique des greffons a mis en évidence une différentiation en neurones TH-

positifs en périphérie et une activité métabolique de ces cellules. En revanche, nous n'avons pu mettre en évidence de récupération fonctionnelle ou de dyskinésies chez les animaux greffés. Au contraire, nos animaux contrôles présélectionnés de la même manière répondaient au traitement à la L-DOPA par une récupération motrice significative et l'apparition de dyskinésies pour 80% d'entre eux. C'est résultats laissent penser que l'intégration du greffon a eu lieu au niveau du striatum mais que cette dernière reste encore insuffisamment efficace pour permettre une récupération motrice effective.

A défaut de répondre à la problématique initiale, cette expérience a validé: 1) la comparaison possible d'une stratégie thérapeutique au traitement à la L-DOPA dans notre modèle. 2) la pertinence et la possibilité de présélection via notre batterie de tests comportementaux moteurs (Stepping test, rotarod et ball test). Cette expérience souligne de plus les difficultés de la thérapie cellulaire au niveau cérébral.

2-2 Etude moléculaire et histologique de l'activation microgliale

Les modèles ayant montré un potentiel effet neurotoxique de la microglie spécifique des neurones dopaminergiques indépendament de substances neurotoxiques sont développés à partir d'activateurs de l'inflammation, en particulier le LPS. Il semble donc logique que le premier phénomène observé soit une forte inflammation. La spécificité de la localisation (SN) et de la population des neurones (DA) est un argument en faveur d' une hyper-sensibilité de ces neurones.

Bien que l'étiologie de la MP ne soit pas encore bien connue, les gènes impliqués dans le cadre de MP familiale impliquent un dysfonctionnement neuronal plus qu'une perte de contrôle du phénomène inflammatoire. Les phénomènes neurodélétères décrit précédemment pourraient plutôt jouer un rôle dans l'amplification de la perte neuronale qu'un rôle totalement primaire. Nous avons donc choisi de nous placer dans un modèle qui implique une neurodégénérescence primaire aux phénomènes inflammatoires. De plus, l'injection au niveau du FMT (même proche de la SN) préserve nos analyses d'une inflammation induite par le passage de l'aiguille directement au sein de la SN.

Suite à l'injection de 6-OHDA, il est évident que c'est la toxine qui va déclencher le processus de mort neuronale. Nous nous plaçons donc dans l'hypothèse d'un dysfonctionnement neuronal primaire à tout autres phénomènes, même si cela n'est pas tout à fait vrai dans le sens ou le rat subit l'opération avec une rupture de la BHE et un traumatisme mécanique dû à la descente de l'aiguille. L'effet spécifique de la 6-OHDA provoque une dénervation rapide au niveau du striatum. Celle-ci n'est pas accompagnée par une activation microgliale significative (analyse histologique), cependant, cette perte de l'afférence DA est suivie par une diminution transitoire de la présence

d'ARNm codant pour le GDNF et le NT3 au moment ou le pourcentage de dégénérescence des corps cellulaire est significatif (J14). De manière surprenante, cette variation d'ARNm existe aussi pour les animaux shams qui ne présentent pourtant pas de dénervation striatale. Ces résultats suggéreraient une utilisation de l'ARNm pour la synthèse de protéines suite au traumatisme opératoire dans la FMT avant la reformation d'un pool de cette ARN.

Au niveau de la SN, l'effet spécifique de la 6-OHDA provoque une perte des corps cellulaires des neurones DA. La neurodégénérescence induite n'est pas immédiate. Elle est accompagnée par une activation microgliale concomitante. Celle-ci semble plutôt induite par la mort des neurones et due à la très forte réactivité des cellules microgliales face à une variation de leur environnement direct. Ainsi la microglie pourrait avoir un rôle très contrôlé de nettoyage. Il est d'ailleurs reconnu qu'en dehors du SNC, les macrophages phagocytent les cellules en apoptose sans pour autant déclencher de phénomènes inflammatoires. Or, même si cela n'est pas formellement prouvé, l'apoptose semble être le mécanisme de mort principal des neurones DA par intoxication à la 6-OHDA et dans la MP humaine. Ceci est un argument allant dans le sens d'un rôle actif mais contrôlé de l'activité phagocytaire de la microglie.

En effet, dans notre modèle, la réaction microgliale semble très spécifique. Comme généralement observé, le traumatisme opératoire est immédiatement suivi par une réaction médiée par le TNFα. Ainsi nous observons dans le mésencéphale ventral une augmentation transitoire de l'ARNm codant pour le TNFα le premier jour suivant l'opération chez les rats intoxiqués comme chez les shams. Chez les rats shams, nous avons mis en évidence une activation microgliale au niveau du passage de l'aiguille pouvant atteindre la SN, cependant, nous n'observons pas de neurodégénérescence DA. Ceci suggère une réaction microgliale modérée provoquée par l'opération. Par ailleurs, il a été observé qu'une injection de TNFα dans la SN n'était pas suffisante pour déclencher une perte des neurones DA. Il est aussi possible que cette variation de TNFα soit due à une activation des astrocytes. En effet, nous observons une astrogliose autour du passage de l'aiguille et une augmentation significative et transitoire (les 5 premiers jours après l'opération) du nombre d'astrocytes dans la SN de nos rats intoxiqués. Les astrocytes sont aussi des cellules très réactives et en relation étroite avec la BHE que nous brisons lors de l'opération. Ces cellules peut jouer une rôle important dans les processus cicatriciels. De même elles sont susceptible de contrôler l'activitée microgliale grâce à la sécrétion de substance inflammatoire (comme le TNFα).

L'activation microgliale serait finement contrôlée par les cellules environnantes et par elle-même, impliquant une activation adaptée à la situation. Il a d'ailleurs été mis en évidence différents stades de l'activation microgliale et une activité significative de la microglie dite quiescente. Ainsi, en fonction des variations de l'environnement, l'activation microgliale ferait preuve d'une grande

plasticité phénotypique et d'action, bien que les messagers soient limités. Ainsi, la présence d'une cytokine pro- ou anti-inflammatoire ne serait pas à l'origine d'un message particulier, mais il faudrait plutôt se baser sur le cocktail de substances présentes et sur leur concentration pour mieux comprendre ce message, comme le montre une même variation d'ARNm chez les animaux intoxiqués et shams.

De la même manière, il est possible que l'activation microgliale étudiée ici ne corresponde pas à celle observée chez l'humain. En effet, la mort des neurones provoquées par la 6-OHDA ne se déroule pas de la même manière, ni avec la même vitesse, ni avec la même ampleur que dans la cadre de la MP. Ainsi, il est probable que les échanges moléculaires neurones/microglie soient différent entre les deux processus neurodégénératifs impliquant une réaction microgliale distincte.

Dans nos expériences, ce contrôle de l'activation microgliale semble aussi observé à des temps plus tardifs, en effet, à aucun moment l'activation microgliale ne semble dépasser le processus dégénératif. De même, localement, l'activation microgliale se cantonne aux zones ou le processus dégénératif est déjà en place sans se propager dans les zones encore saines de la SN. Ce parallèle a aussi été observé dans notre expérience d'inhibition où l'activation microgliale était toujours proportionnelle au processus dégénératif pour différentes intensités.

Ces hypothèses et observations renforcent l'idée d'une activation microgliale plutôt induite par la mort des neurones (dont le processus de mort est un signal pour la microglie) et modérée. Dans le cadre des expériences d'injection de substances inflammatoires, il est probable que l'activation microgliale soit incontrôlée et que cette réaction induise la mise en place de tout l'arsenal neurotoxique de la microglie, ayant alors un effet délétère sur les neurones les plus sensibles.

Une activation microgliale induite par la mort des neurones est tout à fait cohérente avec celle observée dans la SN de patient MP lors d'étude *post-mortem*.

Afin de préciser le rôle de la microglie, nous avons décidé d'utiliser un traitement pharmaceutique visant à inhiber son activation: la minocycline.

2-3 Traitement minocycline

L’objectif de notre étude était d'inhiber l'activation microgliale pour en déduire son rôle dans la dynamique de la dégénérescence. De manière surprenante la minocycline n'a pas eu l'effet

inhibiteur attendu. Nous ne pouvons donc conclure quand au rôle de la microglie qui accompagnait la neurodégénérescencs DA dans notre étude histologique.

En revanche, nous avons observé une augmentation de la dégénérescence induite par la 6-OHDA chez les rats traités par rapport aux rats non traités. Cette variation du processus neurodégénératif est corrélée avec l'activation microgliale pour chaque groupe de rats (traité ou non, intoxiqué ou non). Bien que l'effet inhibiteur de l'activation microgliale n'ait pas fonctionné, personne n'a encore montré un effet activateur de la microglie par la minocycline. Ainsi, ces résultats renforcent l'hypothèse d'une activation microgliale induite par la mort des neurones.

Conclusion et perspectives

1 Conclusion générale

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. 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).

Par ailleurs, la caractérisation du contexte inflammatoire (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 d'ARNm sont sans doute entraînées par l'activation microgliale et/ou astrocytaire. Celle-ci pouvant être identique dans les premiers jours suivant l'opération, puis l'effet spécifique de la toxine se fait ressentir indépendamment du phénomène inflammatoire induit.

L'étude histologique de l'activation microgliale a montré une réaction microgliale strictement concomitante et colocalisée au processus neurodégénératif au sein de la SN suite à l'injection de 6-OHDA.

Ainsi, la microglie agirait plutôt de manière secondaire (mais extrêmement rapidement) au processus neurodégénératif induit par l'injection de 6-OHDA. La présence concomitante d'ARNm du GDNF et de CD11b uniquement chez les rats lésés à la 6-OHDA suggèrerait même un rôle potentiellement protecteur des quelques cellules microgliales encore activées 4 semaines après l'injection de 6-OHDA, comme pour protéger les neurones restant à la fin de l'effet de la toxine. Concernant le rôle de cette microglie à des stades plus précoces où la dégénérescence est maximale, nous n'avons pu conclure.

Cependant, démontrer en particulier que le rôle de la réaction microgliale est secondaire, est un point important, car cela rend inutile le développement de stratégies neuroprotectrices basées sur une action anti-inflammatoire dans cette maladie. Il faut d'ailleurs souligner que tous les essais thérapeutiques utilisant des médicaments susceptibles de réduire la réaction inflammatoire ont à ce jour échoués en clinique humaine.

2 Perspectives

Bien qu'ayant permis d'éclaircir certains points, ce travail de thèse peut être complété par des études plus mécanistiques.

Dans un premier temps, dès que le modèle de rat transgénique MP sera mis au point et caractérisé, il serait intéressant d'observer l'environnement inflammatoire accompagnant la dégénérescence au niveau de la SN. Cette étude aurait l'avantage de s'affranchir de l'intoxication à la 6-OHDA et des inconvénients du traumatisme chirurgical (BHE, passage de l'aiguille, pression due à la présence d'un liquide,...). Nous pourrions alors analyser les phénomènes inflammatoires accompagnant une dégénérescence auto-induite, beaucoup plus progressive et sans doute plus proche de la réalité de la MP (du moins pour les formes génétiques).

En attendant la validation du modèle transgénique, notre modèle bilatéral actuel peut nous apporter de nombreuses informations. Tout d'abord sur l'activation microgliale, l'analyse histologique sur 35 jours déjà réalisée sur le modèle unilatéral pourrait l'être de nouveau sur le modèle bilatéral afin de comprendre le décalage observé avec l'analyse moléculaire. Il serait aussi intéressant de coupler les techniques histologiques avec des techniques d'hybridation *in situ* afin de préciser le rôle des différentes cellules actrices (neurones, microglie, macrophage), ou de séparer les cellules du mésencéphale ventral et d'analyser leur phénotype plus complètement par la technique du FACS.

De même, afin de mieux définir l'action de la microglie accompagnant la neurodégénérescence, il serait intéressant d'utiliser d'autres inhibiteurs de l'activation microgliale, voire du système macrophagique périphérique. Une telle étude nous permettrait sans doute de préciser le rôle de l'activation microgliale concomitante à la mort des neurones (J7) et son impact à terme (J35). De plus, l'inhibition du système macrophagique total nous permettrait de nous affranchir d'une éventuelle pénétration des macrophages du système immunitaire périphérique. Sachant que celle-ci peut être aussi bien due à l'acte chirurgical, lors de l'injection qu'à une perméabilisation de la BHE induite par l'inflammation. En outre, l'interaction avec l'ensemble du système macrophagique peut permettre une analyse régulière de l'effet de l'inhibition grâce à des prélèvements sanguins.

Afin d'épargner au maximum la BHE et de contrôler l'activation microgliale, l'utilisation d'une souris transgénique KO-inductible pour un gène de l'activation microgliale**,** intoxiquée par le MPTP peut être une solution alternative. Cela nécessite cependant la mise au point du modèle MPTP chez

la souris dans notre laboratoire et impliquerait une étude comportementale motrice moins fine. Ceci ne serait pas si important dans un premier temps, mais pourrait être handicapant à terme dans la perspective de l'élaboration de stratégies thérapeutiques basées sur les phénomènes inflammatoires.

Enfin, notre modèle bilatéral, peut nous permettre d'optimiser les méthodes de transplantation de neurones embryonnaires ou autres cellules souches dans le but d'obtenir un rétablissement du comportement moteur significatif. Une fois un tel protocole développé, il pourrait être utilisé sur les rats transgéniques MP où la dégénérescence continuerait au-delà de 4 semaines, ce qui pourrait être à l'origine de l'apparition des dyskinésies.

Bibliographie

A

Abbott, N.J., 2000. Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 20(2), 131-47.

Agid, Y., 1991. Parkinson's disease: pathophysiology. *Lancet*, 337(8753), 1321-4.

Agid, Y. et coll., 1990. The efficacy of levodopa treatment declines in the course of Parkinson's disease: do nondopaminergic lesions play a role? *Advances in Neurology*, 53, 83-100.

Agid, Y. et coll., 1993. Are dopaminergic neurons selectively vulnerable to Parkinson's disease? *Advances in Neurology*, 60, 148-64.

Amaducci, L., Forno, K.I. & Eng, L.F., 1981. Glial fibrillary acidic protein in cryogenic lesions of the rat brain. *Neuroscience Letters*, 21(1), 27-32.

Amalric, M. et coll., 1995. Complex deficits on reaction time performance following bilateral intrastriatal 6-OHDA infusion in the rat. *The European Journal of Neuroscience*, 7(5), 972-80.

Andersson, M., Hilbertson, A. & Cenci, M.A., 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. *Neurobiology of Disease*, 6(6), 461-74.

Anglade, P. et coll., 1997. Apoptosis in dopaminergic neurons of the human substantia nigra during normal aging. *Histology and Histopathology*, 12(3), 603-10.

Anthony, D.C. et coll., 1997. Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 23(5), 406-15.

Aquino, D.A. et coll., 1988. Glial fibrillary acidic protein increases in the spinal cord of Lewis rats with acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neurochemistry*, 51(4), 1085-96.

Arendt, T. et coll., 1983. Loss of neurons in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease, paralysis agitans and Korsakoff's Disease. *Acta Neuropathologica*, 61(2), 101-8.

Austin, S.A. et coll., 2006. Alpha-synuclein expression modulates microglial activation phenotype. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(41), 10558-63.

B

Ballard, P.A., Tetrud, J.W. & Langston, J.W., 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., Daniel, S.E. & Blunt, S.B., 1998. Glial pathology but absence of apoptotic nigral

neurons in long-standing Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 13(2), 221-7.

Barker, C.F. & Billingham, R.E., 1977. Immunologically privileged sites. *Advances in Immunology*, 25, 1-54.

Barnéoud, P. et coll., 1996. Neuroprotective effects of riluzole on a model of Parkinson's disease in the rat. *Neuroscience*, 74(4), 971-83.

Barnéoud, P. et coll., 1995. Effects of complete and partial lesions of the dopaminergic mesotelencephalic system on skilled forelimb use in the rat. *Neuroscience*, 67(4), 837-48.

Bas, J. et coll., 2001. Lymphocyte populations in Parkinson's disease and in rat models of parkinsonism. *Journal of Neuroimmunology*, 113(1), 146-52.

Batchelor, P.E. et coll., 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. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(5), 1708-16.

Bechmann, I. et coll., 1999. FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia*, 27(1), 62-74.

Beck, K.D. et coll., 1995. Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. *Nature*, 373(6512), 339-41.

Bejjani, B.P. et coll., 1999. Transient acute depression induced by high-frequency deep-brain stimulation. *The New England Journal of Medicine*, 340(19), 1476-80.

Belin, A.C. & Westerlund, M., 2008. Parkinson's disease: a genetic perspective. *The FEBS Journal*, 275(7), 1377-83.

Bellissimo, M.I. et coll., 2004. Is the unilateral lesion of the left substantia nigra pars compacta sufficient to induce working memory impairment in rats? *Neurobiology of Learning and Memory*, 82(2), 150-8.

Benabid, A.L. et coll., 1987. Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. *Applied Neurophysiology*, 50(1-6), 344-6.

Benazzouz, A. et coll., 1995. Riluzole prevents MPTP-induced parkinsonism in the rhesus monkey: a pilot study. *European Journal of Pharmacology*, 284(3), 299-307.

Ben-Shachar, D. et coll., 1991. The iron chelator desferrioxamine (Desferal) retards 6-hydroxydopamine-induced degeneration of nigrostriatal dopamine neurons. *Journal of Neurochemistry*, 56(4), 1441-4.

Ben-Shachar, D. & Youdim, M.B., 1990. Selectivity of melaninized nigra-striatal dopamine neurons to degeneration in Parkinson's disease may depend on iron-melanin interaction. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, 29, 251-8.

Bergman, H. et coll., 1998. Physiology of MPTP tremor. *Movement Disorders: Official Journal of*

the Movement Disorder Society, 13 Suppl 3, 29-34.

Bergman, H., Wichmann, T. & DeLong, M.R., 1990. Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4975), 1436-8.

Bernheimer, H. et coll., 1973. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *Journal of the Neurological Sciences*, 20(4), 415-55.

Bezard, E., Brotchie, J.M. & Gross, C.E., 2001. Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2(8), 577-88.

Bezard, E. et coll., 2003. Enriched environment confers resistance to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and cocaine: involvement of dopamine transporter and trophic factors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(35), 10999-1007.

Björklund, A. et coll., 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 Research*, 886(1-2), 82-98.

Björklund, A. & Stenevi, U., 1979. Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Research*, 177(3), 555-60.

Blanchard, V. et coll., 1996. Dopaminergic sprouting in the rat striatum after partial lesion of the substantia nigra. *Brain Research*, 709(2), 319-25.

Blandini, F. & Greenamyre, J.T., 1998. Prospects of glutamate antagonists in the therapy of Parkinson's disease. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 12(1), 4-12.

Bloem, B.R. et coll., 1990. The MPTP model: versatile contributions to the treatment of idiopathic Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 97(2-3), 273-93.

Blond, S. et coll., 1992. Control of tremor and involuntary movement disorders by chronic stereotactic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus. *Journal of Neurosurgery*, 77(1), 62-8.

Blum, D. et coll., 2001. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 65(2), 135-72.

Blum, D. et coll., 2004. Clinical potential of minocycline for neurodegenerative disorders. *Neurobiology of Disease*, 17(3), 359-66.

Blum-Degen, D. et coll., 1995. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neuroscience Letters*, 202(1-2), 17-20.

Boka, G. et coll., 1994. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 172(1-2), 151-4.

Bondy, S.C. & Lee, D.K., 1993. Oxidative stress induced by glutamate receptor agonists. *Brain*

Research, 610(2), 229-33.

Bornebroek, M. et coll., 2007. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Neuroepidemiology*, 28(4), 193-6.

Bower, J.H. et coll., 2006. Immunologic diseases, anti-inflammatory drugs, and Parkinson disease: a case-control study. *Neurology*, 67(3), 494-6.

Boyce, S. et coll., 1990. Nigrostriatal damage is required for induction of dyskinesias by L-DOPA in squirrel monkeys. *Clinical Neuropharmacology*, 13(5), 448-58.

Braga, R. et coll., 2005. Lesion of the substantia nigra, pars compacta impairs delayed alternation in a Y-maze in rats. *Experimental Neurology*, 192(1), 134-41.

Breidert, T. et coll., 2002. Protective action of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone in a mouse model of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 82(3), 615-24.

Brice, J. & McLellan, L., 1980. Suppression of intention tremor by contingent deep-brain stimulation. *Lancet*, 1(8180), 1221-2.

Bronstein, D.M. et coll., 1995. Glia-dependent neurotoxicity and neuroprotection in mesencephalic cultures. *Brain Research*, 704(1), 112-6.

Brooks, D.J., 2003. PET studies on the function of dopamine in health and Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 991, 22-35.

Brotchie, J.M. & Fox, S.H., 1999. Quantitative assessment of dyskinesias in subhuman primates. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 14 Suppl 1, 40-7.

Brundin, P. et coll., 1986. Behavioural effects of human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Experimental Brain Research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation Cérébrale*, 65(1), 235-40.

Burns, R.S. et coll., 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(14), 4546-50.

C

Calvo, C.F. et coll., 1996. Production of monocyte chemotactic protein-1 by rat brain macrophages. *The European Journal of Neuroscience*, 8(8), 1725-34.

Carman, L.S., Gage, F.H. & Shults, C.W., 1991. Partial lesion of the substantia nigra: relation between extent of lesion and rotational behavior. *Brain Research*, 553(2), 275-83.

Carreño-Müller, E. et coll., 2003. Thrombin induces in vivo degeneration of nigral dopaminergic neurones along with the activation of microglia. *Journal of Neurochemistry*, 84(5), 1201-14.

Carvey, P.M. et coll., 1991. The potential use of a dopamine neuron antibody and a striatal-derived neurotrophic factor as diagnostic markers in Parkinson's disease. *Neurology*, 41(5 Suppl 2),

53-8; discussion 59-60.

Castaño, A. et coll., 1998. Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system. *Journal of Neurochemistry*, 70(4), 1584-92.

Castaño, A. et coll., 2002. The degenerative effect of a single intranigral injection of LPS on the dopaminergic system is prevented by dexamethasone, and not mimicked by rh-TNF-alpha, IL-1beta and IFN-gamma. *Journal of Neurochemistry*, 81(1), 150-7.

Cenci, M.A., Lee, C.S. & Björklund, A., 1998. L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. *The European Journal of Neuroscience*, 10(8), 2694-706.

Chan, P. et coll., 1997. (+)MK-801 does not prevent MPTP-induced loss of nigral neurons in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280(1), 439-46.

Chang, J.W. et coll., 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.

Chen, H. et coll., 2005. Nonsteroidal antiinflammatory drug use and the risk for Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 58(6), 963-7.

Chen, H. et coll., 2003. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Archives of Neurology*, 60(8), 1059-64.

Chen, L., Yung, K. & Chan, Y., 2005. Reactive astrocytes as potential manipulation targets in novel cell replacement therapy of Parkinson's disease. *Current Drug Targets*, 6(7), 821-33.

Chen, M. et coll., 2000. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nature Medicine*, 6(7), 797-801.

Chen, S. et coll., 1998. Experimental destruction of substantia nigra initiated by Parkinson disease immunoglobulins. *Archives of Neurology*, 55(8), 1075-80.

Chesselet, M.F. & Delfs, J.M., 1996. Basal ganglia and movement disorders: an update. *Trends in Neurosciences*, 19(10), 417-22.

Chung, E.S. et coll., 2001. GT1b ganglioside induces death of dopaminergic neurons in rat mesencephalic cultures. *Neuroreport*, 12(3), 611-4.

Cotzias, G.C., Papavasiliou, P.S. & Gellene, R., 1969. L-dopa in parkinson's syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 281(5), 272.

Cross, A.K. & Woodroofe, M.N., 1999. Chemokine modulation of matrix metalloproteinase and TIMP production in adult rat brain microglia and a human microglial cell line in vitro. *Glia*, 28(3), 183-9.

Cserr, H.F. & Knopf, P.M., 1992. Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunology Today*, 13(12), 507-12.

Członkowska, A. et coll., 2002. Immune processes in the pathogenesis of Parkinson's disease - a potential role for microglia and nitric oxide. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 8(8), RA165-77.

D

Da Cunha, C. et coll., 2001. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. *Behavioural Brain Research*, 124(1), 9-18.

Da Cunha, C. et coll., 2003. Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of a memory system independent of the hippocampal memory system. *Neurobiology of Learning and Memory*, 79(3), 236-42.

Damier, P. et coll., 1999a. The substantia nigra of the human brain. I. Nigrosomes and the nigral matrix, a compartmental organization based on calbindin D(28K) immunohistochemistry. *Brain: A Journal of Neurology*, 122 (Pt 8), 1421-36.

Damier, P. et coll., 1999b. The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, 122 (Pt 8), 1437-48.

Damier, P. et coll., 1993. Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience*, 52(1), 1-6.

Damier, P. et coll., 2000. [Development of dyskinesias induced by treatment for Parkinson's disease: potential role of first exposure to L-DOPA (or phenomenon of priming)]. *Revue Neurologique*, 156(3), 224-35.

Damier, P., 2002. [Parkinson's disease]. *La Revue Du Praticien*, 52(11), 1255-60.

Davis, G.C. et coll., 1979. Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Research*, 1(3), 249-54.

Dawson, V.L. et coll., 1993. Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 13(6), 2651-61.

Defazio, G. et coll., 1994. Parkinsonian serum carries complement-dependent toxicity for rat mesencephalic dopaminergic neurons in culture. *Brain Research*, 633(1-2), 206-12.

Depino, A.M. et coll., 2003. Microglial activation with atypical proinflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. *The European Journal of Neuroscience*, 18(10), 2731-42.

Deumens, R., Blokland, A. & Prickaerts, J., 2002. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Experimental Neurology*, 175(2), 303-17.

Dexter, D.T. et coll., 1994. Nigrostriatal function in vitamin E deficiency: clinical, experimental, and positron emission tomographic studies. *Annals of Neurology*, 35(3), 298-303.

Dexter, D.T. et coll., 1989. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 52(2), 381-9.

Dexter, D.T. et coll., 1994. Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: an HPLC and ESR study. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 9(1), 92-7.

Dexter, D.T. et coll., 1989. Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 52(6), 1830-6.

Diguet, E. et coll., 2004. Deleterious effects of minocycline in animal models of Parkinson's disease and Huntington's disease. *The European Journal of Neuroscience*, 19(12), 3266-76.

Dodel, R.C. et coll., 1998. Peptide inhibitors of caspase-3-like proteases attenuate 1-methyl-4-phenylpyridinum-induced toxicity of cultured fetal rat mesencephalic dopamine neurons. *Neuroscience*, 86(3), 701-7.

Doucet, G. et coll., 1989. Host afferents into intrastriatal transplants of fetal ventral mesencephalon. *Experimental Neurology*, 106(1), 1-19.

Dragunow, M. et coll., 1995. In situ evidence for DNA fragmentation in Huntington's disease striatum and Alzheimer's disease temporal lobes. *Neuroreport*, 6(7), 1053-7.

Drouot, X. et coll., 2004. Functional recovery in a primate model of Parkinson's disease following motor cortex stimulation. *Neuron*, 44(5), 769-78.

Du, Y. et coll., 2001. Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(25), 14669-74.

Dunnett, S.B. et coll., 1983. Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. V. Behavioural recovery in rats with bilateral 6-OHDA lesions following implantation of nigral cell suspensions. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, 522, 39-47.

Dunnett, S.B. et coll., 1981a. Behavioural recovery following transplantation of substantia nigra in rats subjected to 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. I. Unilateral lesions. *Brain Research*, 215(1-2), 147-61.

Dunnett, S.B. et coll., 1981b. Behavioural recovery following transplantation of substantia nigra in rats subjected to 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. II. Bilateral lesions. *Brain Research*, 229(2), 457-70.

E

Ernfors, P., Lee, K.F. & Jaenisch, R., 1994. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature*, 368(6467), 147-50.

Etminan, M., Carleton, B.C. & Samii, A., 2008. Non-steroidal anti-inflammatory drug use and the risk of Parkinson disease: a retrospective cohort study. *Journal of Clinical Neuroscience:*

Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia, 15(5), 576-7.

Evans, J.R. & Barker, R.A., 2008. Neurotrophic factors as a therapeutic target for Parkinson's disease. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 12(4), 437-47.

F

Feany, M.B. & Bender, W.W., 2000. A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature*, 404(6776), 394-8.

Fearnley, J.M. & Lees, A.J., 1991. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain: A Journal of Neurology*, 114 (Pt 5), 2283-301.

Fendrick, S.E., Miller, K.R. & Streit, W.J., 2005. Minocycline does not inhibit microglia proliferation or neuronal regeneration in the facial nucleus following crush injury. *Neuroscience Letters*, 385(3), 220-3.

Fénelon, G., 1997. [Diagnosis and course (under treatment) of Parkinson disease]. *La Revue Du Praticien*, 47(10), 1062-7.

Fontaine, V. et coll., 2002. Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor Necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(7), RC216.

Forno, L.S. et coll., 1986. Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. *Annals of Neurology*, 20(4), 449-55.

François, C. et coll., 1999. Dopaminergic cell group A8 in the monkey: anatomical organization and projections to the striatum. *The Journal of Comparative Neurology*, 414(3), 334-47.

Freed, C.R. et coll., 2001. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *The New England Journal of Medicine*, 344(10), 710-9.

Freeman, T.B. et coll., 1995. Bilateral fetal nigral transplantation into the postcommissural putamen in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 38(3), 379-88.

G

Gaillard, A. et coll., 2007. Reestablishment of damaged adult motor pathways by grafted embryonic cortical neurons. *Nature Neuroscience*, 10(10), 1294-9.

Gao, H. et coll., 2003. Synergistic dopaminergic neurotoxicity of the pesticide rotenone and inflammogen lipopolysaccharide: relevance to the etiology of Parkinson's disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(4), 1228-36.

Gash, D.M. et coll., 1996. Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature*, 380(6571), 252-5.

Gerhard, A. et coll., 2006. In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in

idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 21(2), 404-12.

German, D.C. et coll., 1989. Midbrain dopaminergic cell loss in Parkinson's disease: computer visualization. *Annals of Neurology*, 26(4), 507-14.

German, D.C. & Manaye, K.F., 1993. Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, and A10): three-dimensional reconstruction in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 331(3), 297-309.

Giasson, B.I. et coll., 2002. Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron*, 34(4), 521-33.

Gibb, W.R., Scott, T. & Lees, A.J., 1991. Neuronal inclusions of Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 6(1), 2-11.

Gill, S.S. et coll., 2003. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nature Medicine*, 9(5), 589-95.

Goedert, M., Spillantini, M.G. & Davies, S.W., 1998. Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases. *Current Opinion in Neurobiology*, 8(5), 619-32.

Goldman, J.E. et coll., 1983. Lewy bodies of Parkinson's disease contain neurofilament antigens. *Science (New York, N.Y.)*, 221(4615), 1082-4.

Gomez-Mancilla, B. & Bédard, P.J., 1993. Effect of nondopaminergic drugs on L-dopa-induced dyskinesias in MPTP-treated monkeys. *Clinical Neuropharmacology*, 16(5), 418-27.

Good, P.F. et coll., 1998. Protein nitration in Parkinson's disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 57(4), 338-42.

Goto, S., Hirano, A. & Matsumoto, S., 1989. Subdivisional involvement of nigrostriatal loop in idiopathic Parkinson's disease and striatonigral degeneration. *Annals of Neurology*, 26(6), 766-70.

Graham, D.G. et coll., 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. *Molecular Pharmacology*, 14(4), 644-53.

Graham, D.G., Tiffany, S.M. & Vogel, F.S., 1978. The toxicity of melanin precursors. *The Journal of Investigative Dermatology*, 70(2), 113-6.

Granholm, A.C. et coll., 1997. Glial cell line-derived neurotrophic factor improves survival of ventral mesencephalic grafts to the 6-hydroxydopamine lesioned striatum. *Experimental Brain Research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation Cérébrale*, 116(1), 29-38.

Graybiel, A.M., Hirsch, E.C. & Agid, Y., 1990. The nigrostriatal system in Parkinson's disease. *Advances in Neurology*, 53, 17-29.

Greenamyre, J.T. et coll., 1994. Antiparkinsonian effects of remacemide hydrochloride, a glutamate antagonist, in rodent and primate models of Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 35(6), 655-61.

H

Haber, S.N. & Fudge, J.L., 1997. The primate substantia nigra and VTA: integrative circuitry and function. *Critical Reviews in Neurobiology*, 11(4), 323-42.

Hagell, P. & Widner, H., 1999. Clinical rating of dyskinesias in Parkinson's disease: use and reliability of a new rating scale. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 14(3), 448-55.

Hald, A. & Lotharius, J., 2005. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Experimental Neurology*, 193(2), 279-90.

Halliday, G.M. et coll., 1990. Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 27(4), 373-85.

Hassouna, I. et coll., 1996. Increase in bax expression in substantia nigra following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) treatment of mice. *Neuroscience Letters*, 204(1-2), 85-8.

He, Y., Appel, S. & Le, W., 2001. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain Research*, 909(1-2), 187-93.

He, Y., Lee, T. & Leong, S.K., 2000. 6-Hydroxydopamine induced apoptosis of dopaminergic cells in the rat substantia nigra. *Brain Research*, 858(1), 163-6.

He, Y., Le, W. & Appel, S.H., 2002. Role of Fcgamma receptors in nigral cell injury induced by Parkinson disease immunoglobulin injection into mouse substantia nigra. *Experimental Neurology*, 176(2), 322-7.

Heikkila, R.E. et coll., 1989. Some features of the nigrostriatal dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse. *Molecular and Chemical Neuropathology / Sponsored by the International Society for Neurochemistry and the World Federation of Neurology and Research Groups on Neurochemistry and Cerebrospinal Fluid*, 10(3), 171-83.

Herman, J.P. & Abrous, N.D., 1994. Dopaminergic neural grafts after fifteen years: results and perspectives. *Progress in Neurobiology*, 44(1), 1-35.

Herman, J.P., Choulli, K. & Le Moal, M., 1985. Activation of striatal dopaminergic grafts by haloperidol. *Brain Research Bulletin*, 15(6), 543-6.

Herman, J.P. et coll., 1993. Mechanisms of amphetamine-induced rotation in rats with unilateral intrastriatal grafts of embryonic dopaminergic neurons: a pharmacological and biochemical analysis. *Neuroscience*, 53(4), 1083-95.

Hernán, M.A., Logroscino, G. & García Rodríguez, L.A., 2006. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the incidence of Parkinson disease. *Neurology*, 66(7), 1097-9.

Herrera, A.J. et coll., 2000. The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system. *Neurobiology of Disease*, 7(4), 429-47.

Herrera, A.J. et coll., 2005. Inflammatory process as a determinant factor for the degeneration of substantia nigra dopaminergic neurons. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 112(1), 111-9.

Hirsch, E., Graybiel, A.M. & Agid, Y.A., 1988. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature*, 334(6180), 345-8.

Hirsch, E.C. et coll., 2003. The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 991, 214-28.

Hirsch, E.C. et coll., 1987. Neuronal loss in the pedunculopontine tegmental nucleus in Parkinson disease and in progressive supranuclear palsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(16), 5976-80.

Hirsch, E.C. et coll., 1999. Glial cell participation in the degeneration of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Advances in Neurology*, 80, 9-18.

Hisanaga, K. et coll., 2001. Increase in peripheral CD4 bright+ CD8 dull+ T cells in Parkinson disease. *Archives of Neurology*, 58(10), 1580-3.

Hoffer, B.J. et coll., 1994. Glial cell line-derived neurotrophic factor reverses toxin-induced injury to midbrain dopaminergic neurons in vivo. *Neuroscience Letters*, 182(1), 107-11.

Hornykiewicz, O., 1966. Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacological Reviews*, 18(2), 925-64.

Hudson, J.L. et coll., 1993. Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Research*, 626(1-2), 167-74.

Hunot, S., Bernard, V. et coll., 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. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 103(8-9), 1043-52.

Hunot, S., Boissière, F. et coll., 1996. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 72(2), 355-63.

Hunot, S. et coll., 1997. Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(14), 7531-6.

Hunot, S. et coll., 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. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(9), 3440-7.

Hunot, S. et coll., 2004. JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(2), 665-70.

Hyman, C. et coll., 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. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 14(1), 335-47.

I

Iacono, R.P. et coll., 1995. Chronic anterior pallidal stimulation for Parkinson's disease. *Acta Neurochirurgica*, 137(1-2), 106-12.

Imamura, K. et coll., 2003. Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathologica*, 106(6), 518-26.

Inzelberg, R. et coll., 1996. Double-blind comparison of cabergoline and bromocriptine in Parkinson's disease patients with motor fluctuations. *Neurology*, 47(3), 785-8.

Isacson, O. & Deacon, T., 1997. Neural transplantation studies reveal the brain's capacity for continuous reconstruction. *Trends in Neurosciences*, 20(10), 477-82.

Ischiropoulos, H. et coll., 1992. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 298(2), 431-7.

Ishida, Y. et coll., 2006. Upregulation of protease-activated receptor-1 in astrocytes in Parkinson disease: astrocyte-mediated neuroprotection through increased levels of glutathione peroxidase. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 65(1), 66-77.

J

Jellinger, K., 1988. The pedunculopontine nucleus in Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 51(4), 540-3.

Jellinger, K. et coll., 1992. Iron-melanin complex in substantia nigra of parkinsonian brains: an x-ray microanalysis. *Journal of Neurochemistry*, 59(3), 1168-71.

Jellinger, K. et coll., 1993. Neuromelanin and nigrostriatal dopamine neuron degeneration. *Journal of Neurochemistry*, 60(5), 1976-7.

Jellinger, K. et coll., 1995. Chemical evidence for 6-hydroxydopamine to be an endogenous toxic factor in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, 46, 297-314.

Jellinger, K.A., 2000. Cell death mechanisms in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 107(1), 1-29.

Jellinger, K.A., 1991. Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Molecular and Chemical Neuropathology / Sponsored by the International Society for Neurochemistry and the World Federation of Neurology and Research Groups on Neurochemistry and Cerebrospinal Fluid*, 14(3), 153-97.

Jenner, P., 2004. Avoidance of dyskinesia: preclinical evidence for continuous dopaminergic

stimulation. *Neurology*, 62(1 Suppl 1), S47-55.

Joel, D. & Weiner, I., 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

Kanda, T. et coll., 1998. Adenosine A2A antagonist: a novel antiparkinsonian agent that does not provoke dyskinesia in parkinsonian monkeys. *Annals of Neurology*, 43(4), 507-13.

Kassiotis, G. & Kollias, G., 2001. Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination. *The Journal of Experimental Medicine*, 193(4), 427-34.

Kim, W.G. et coll., 2000. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(16), 6309-16.

Kim, Y.S. & Joh, T.H., 2006. Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Experimental & Molecular Medicine*, 38(4), 333-47.

Kingsbury, A.E., Mardsen, C.D. & Foster, O.J., 1998. DNA fragmentation in human substantia nigra: apoptosis or perimortem effect? *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 13(6), 877-84.

Kirik, D., Rosenblad, C. & Björklund, A., 1998. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Experimental Neurology*, 152(2), 259-77.

Kirik, D., Georgievska, B. & Björklund, A., 2004. Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease. *Nature Neuroscience*, 7(2), 105-10.

Kish, S.J., Shannak, K. & Hornykiewicz, O., 1988. Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *The New England Journal of Medicine*, 318(14), 876-80.

Kita, H. & Kitai, S.T., 1987. Efferent projections of the subthalamic nucleus in the rat: light and electron microscopic analysis with the PHA-L method. *The Journal of Comparative Neurology*, 260(3), 435-52.

Kitada, T. et coll., 1998. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392(6676), 605-8.

Klegeris, A. et coll., 2006. Alpha-synuclein and its disease-causing mutants induce ICAM-1 and IL-6 in human astrocytes and astrocytoma cells. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(12), 2000-8.

Klegeris, A. et coll., 2008. Alpha-synuclein activates stress signaling protein kinases in THP-1 cells and microglia. *Neurobiology of Aging*, 29(5), 739-52.

Klockgether, T. & Turski, L., 1990. NMDA antagonists potentiate antiparkinsonian actions of L-dopa in monoamine-depleted rats. *Annals of Neurology*, 28(4), 539-46.

Klockgether, T. et coll., 1991. The AMPA receptor antagonist NBQX has antiparkinsonian effects in monoamine-depleted rats and MPTP-treated monkeys. *Annals of Neurology*, 30(5), 717-23.

Knoll, J., 1998. (-)Deprenyl (selegiline), a catecholaminergic activity enhancer (CAE) substance acting in the brain. *Pharmacology & Toxicology*, 82(2), 57-66.

Knott, C. et coll., 2002. Elevated glial brain-derived neurotrophic factor in Parkinson's diseased nigra. *Parkinsonism & Related Disorders*, 8(5), 329-41.

Knott, C., Stern, G. & Wilkin, G.P., 2000. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 16(6), 724-39.

Kohbata, S. & Beaman, B.L., 1991. L-dopa-responsive movement disorder caused by Nocardia asteroides localized in the brains of mice. *Infection and Immunity*, 59(1), 181-91.

Kolata, G., 1983. Monkey model of Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)*, 220(4598), 705.

Koller, W., Biary, N. & Cone, S., 1986. Disability in essential tremor: effect of treatment. *Neurology*, 36(7), 1001-4.

Koller, W.C. & Tolosa, E., 1998. Current and emerging drug therapies in the management of Parkinson's disease. *Neurology*, 50(6 Suppl 6), S1.

Kordower, J.H. et coll., 2000. Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5492), 767-73.

Kordower, J.H. et coll., 1995. Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease. *The New England Journal of Medicine*, 332(17), 1118-24.

Kordower, J.H. et coll., 1999. Clinicopathological findings following intraventricular glial-derived neurotrophic factor treatment in a patient with Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 46(3), 419-24.

Kordower, J.H. et coll., 2008. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nature Medicine*, 14(5), 504-6.

Kornhuber, J. et coll., 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. *European Journal of Pharmacology*, 206(4), 297-300.

Kösel, S. et coll., 1997. On the question of apoptosis in the parkinsonian substantia nigra. *Acta Neuropathologica*, 93(2), 105-8.

Krack, P. et coll., 1997. Stimulation of subthalamic nucleus alleviates tremor in Parkinson's disease. *Lancet*, 350(9092), 1675.

Kranick, S.M. & Duda, J.E., 2008. Olfactory dysfunction in Parkinson's disease. *Neuro-Signals*, 16(1), 35-40.

Kriz, J., Nguyen, M.D. & Julien, J., 2002. Minocycline slows disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, 10(3), 268-78.

Künzle, 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 Research*, 88(2), 195-209.

Kurkowska-Jastrzebska, I. et coll., 1999. MHC class II positive microglia and lymphocytic infiltration are present in the substantia nigra and striatum in mouse model of Parkinson's disease. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 59(1), 1-8.

Kurosaki, R. et coll., 2002. Role of nitric oxide synthase against MPTP neurotoxicity in mice. *Neurological Research*, 24(7), 655-62.

L

Lang, A.E. & Lozano, A.M., 1998. Parkinson's disease. First of two parts. *The New England Journal of Medicine*, 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. et coll., 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science (New York, N.Y.)*, 219(4587), 979-80.

Langston, J.W. & Ballard, P.A., 1983. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *The New England Journal of Medicine*, 309(5), 310.

Langston, J.W. et coll., 1984. Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyrine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Research*, 292(2), 390-4.

Langston, J.W. et coll., 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. *Annals of Neurology*, 46(4), 598-605.

Langston, J.W. et coll., 2000. Investigating levodopa-induced dyskinesias in the parkinsonian primate. *Annals of Neurology*, 47(4 Suppl 1), S79-89.

Laurie, C. et coll., 2007. CD4+ T cells from Copolymer-1 immunized mice protect dopaminergic neurons in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroimmunology*, 183(1-2), 60-8.

Laviola, G. et coll., 2008. Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Neurobiology of Disease*.

Lavoie, B. & Parent, A., 1994. Pedunculopontine nucleus in the squirrel monkey: cholinergic and glutamatergic projections to the substantia nigra. *The Journal of Comparative Neurology*,

344(2), 232-41.

Lawson, L.J. et coll., 1990. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 39(1), 151-70.

Le Couteur, D.G. et coll., 1999. Pesticides and Parkinson's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomédecine & Pharmacothérapie*, 53(3), 122-30.

Le, W. et coll., 2001. Microglial activation and dopaminergic cell injury: an in vitro model relevant to Parkinson's disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(21), 8447-55.

Lee, C.S. et coll., 2000. Embryonic ventral mesencephalic grafts improve levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, 123 (Pt 7), 1365-79.

Lee, D.Y., Oh, Y.J. & Jin, B.K., 2005. Thrombin-activated microglia contribute to death of dopaminergic neurons in rat mesencephalic cultures: Dual roles of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Glia*, 51(2), 98-110.

Lee, M.K. et coll., 2002. Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 --> Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(13), 8968-73.

Lee, S.J. et coll., 2000. Differential regulation and function of Fas expression on glial cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 164(3), 1277-85.

Lees, A.J. et coll., 1977. Deprenyl in Parkinson's disease. *Lancet*, 2(8042), 791-5.

Li, J. et coll., 2008. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nature Medicine*, 14(5), 501-3.

Liberatore, G.T. et coll., 1999. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nature Medicine*, 5(12), 1403-9.

Limousin, P. et coll., 1997. Changes in cerebral activity pattern due to subthalamic nucleus or internal pallidum stimulation in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 42(3), 283-91.

Limousin, P. et coll., 1995. Bilateral subthalamic nucleus stimulation for severe Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 10(5), 672-4.

Lindner, M.D. et coll., 1999. Incomplete nigrostriatal dopaminergic cell loss and partial reductions in striatal dopamine produce akinesia, rigidity, tremor and cognitive deficits in middle-aged rats. *Behavioural Brain Research*, 102(1-2), 1-16.

Lindvall, O. et coll., 1990. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)*, 247(4942), 574-7.

Lindvall, O. et coll., 1994. Evidence for long-term survival and function of dopaminergic grafts in progressive Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 35(2), 172-80.

Lindvall, O. et coll., 1992. Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: one-year clinical and neurophysiological observations in two patients with putaminal implants. *Annals of Neurology*, 31(2), 155-65.

Ling, Z.D. et coll., 2004. Combined toxicity of prenatal bacterial endotoxin exposure and postnatal 6-hydroxydopamine in the adult rat midbrain. *Neuroscience*, 124(3), 619-28.

Ling, Z. et coll., 2002. In utero bacterial endotoxin exposure causes loss of tyrosine hydroxylase neurons in the postnatal rat midbrain. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 17(1), 116-24.

Logroscino, G., 2005. The role of early life environmental risk factors in Parkinson disease: what is the evidence? *Environmental Health Perspectives*, 113(9), 1234-8.

Lundblad, M. et coll., 2002. Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *The European Journal of Neuroscience*, 15(1), 120-32.

M

Mackenzie, I.R. & Munoz, D.G., 1998. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and Alzheimer-type pathology in aging. *Neurology*, 50(4), 986-90.

Mann, D.M., Yates, P.O. & Hawkes, J., 1983. The pathology of the human locus ceruleus. *Clinical Neuropathology*, 2(1), 1-7.

Marras, C. & Lang, A., 2008. Invited article: changing concepts in Parkinson disease: moving beyond the decade of the brain. *Neurology*, 70(21), 1996-2003.

Matsuo, A., Nakamura, S. & Akiguchi, I., 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 Research*, 859(1), 57-71.

Matsuoka, Y. et coll., 2001. Lack of nigral pathology in transgenic mice expressing human alpha-synuclein driven by the tyrosine hydroxylase promoter. *Neurobiology of Disease*, 8(3), 535-9.

Matzuk, M.M. & Saper, C.B., 1985. Preservation of hypothalamic dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 18(5), 552-5.

McGeer, P.L., Itagaki, S., Akiyama, H. et coll., 1988. Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. *Annals of Neurology*, 24(4), 574-6.

McGeer, P.L., Itagaki, S., Boyes, B.E. et coll., 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.

McGeer, P.L. & McGeer, E.G., 2008. Glial reactions in Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 23(4), 474-83.

McGeer, P.L. et coll., 2003. Presence of reactive microglia in monkey substantia nigra years after 1-

methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration. *Annals of Neurology*, 54(5), 599-604.

McGeer, P.L., Yasojima, K. & McGeer, E.G., 2002. Association of interleukin-1 beta polymorphisms with idiopathic Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 326(1), 67-9.

McNaught, K.S.P. et coll., 2004. Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 56(1), 149-62.

Melchior, B. et coll., 2003. Ectopic expression of the TrkA receptor in adult dopaminergic mesencephalic neurons promotes retrograde axonal NGF transport and NGF-dependent neuroprotection. *Experimental Neurology*, 183(2), 367-78.

Mendez, J.S. & Finn, B.W., 1975. Use of 6-hydroxydopamine to create lesions in catecholamine neurons in rats. *Journal of Neurosurgery*, 42(2), 166-73.

Metz, G.A. & Whishaw, I.Q., 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.

Minghetti, L., Polazzi, E. et coll., 1999. Possible role of microglial prostanoids and free radicals in neuroprotection and neurodegeneration. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 468, 109-19.

Minghetti, L., Walsh, D.T. et coll., 1999. In vivo expression of cyclooxygenase-2 in rat brain following intraparenchymal injection of bacterial endotoxin and inflammatory cytokines. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 58(11), 1184-91.

Mirza, B. et coll., 2000. The absence of reactive astrocytosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 95(2), 425-32.

Mishra, M.K. & Basu, A., 2008. Minocycline neuroprotects, reduces microglial activation, inhibits caspase 3 induction, and viral replication following Japanese encephalitis. *Journal of Neurochemistry*, 105(5), 1582-95.

Mizuno, Y. et coll., 2006. Progress in familial Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, (70), 191-204.

Mochizuki, H. et coll., 1996. Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 137(2), 120-3.

Mogi, M. et coll., 1995. Transforming growth factor-beta 1 levels are elevated in the striatum and in ventricular cerebrospinal fluid in Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 193(2), 129-32.

Mogi, M. et coll., 1994. Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neuroscience Letters*, 180(2), 147-50.

Mogi, M. et coll., 1995. Brain beta 2-microglobulin levels are elevated in the striatum in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission. Parkinson's Disease and Dementia Section*, 9(1), 87-92.

Mogi, M. et coll., 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. *Neuroscience Letters*, 211(1), 13-6.

Mogi, M. et coll., 1994. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neuroscience Letters*, 165(1-2), 208-10.

Mogi, M. et coll., 2000. Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 107(3), 335-41.

Möller, T., Hanisch, U.K. & Ransom, B.R., 2000. Thrombin-induced activation of cultured rodent microglia. *Journal of Neurochemistry*, 75(4), 1539-47.

Mouatt-Prigent, A. et coll., 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.

Murer, M.G., Yan, Q. & Raisman-Vozari, R., 2001. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 63(1), 71-124.

N

Nakanishi, H., 2003. Microglial functions and proteases. *Molecular Neurobiology*, 27(2), 163-76.

Neunlist, M. et coll., 2008. Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease. *Journal of Internal Medicine*, 263(6), 577-83.

Nutt, J.G., 1990. Levodopa-induced dyskinesia: review, observations, and speculations. *Neurology*, 40(2), 340-5.

Nutt, J.G. et coll., 2003. Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology*, 60(1), 69-73.

O

Offen, D. et coll., 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(10), 5789-94.

Ogata, A. et coll., 1997. A rat model of Parkinson's disease induced by Japanese encephalitis virus. *Journal of Neurovirology*, 3(2), 141-7.

Olanow, C.W., Mytilineou, C. & Tatton, W., 1998. Current status of selegiline as a neuroprotective agent in Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 13 Suppl 1, 55-8.

Olanow, C.W. et coll., 2003. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation

in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 54(3), 403-14.

Olsson, M. et coll., 1995. Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 15(5 Pt 2), 3863-75.

Ouchi, Y. et coll., 2005. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 57(2), 168-75.

P

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

Paillé, V. et coll., 2007. Rat model of Parkinson's disease with bilateral motor abnormalities, reversible with levodopa, and dyskinesias. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 22(4), 533-9.

Parent, A. & Lavoie, B., 1993. The heterogeneity of the mesostriatal dopaminergic system as revealed in normal and parkinsonian monkeys. *Advances in Neurology*, 60, 25-33.

Parkes, J.D. et coll., 1974. Comparative trial of benzhexol, amantadine, and levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 37(4), 422-6.

Pearce, R.K. et coll., 1998. De novo administration of ropinirole and bromocriptine induces less dyskinesia than L-dopa in the MPTP-treated marmoset. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 13(2), 234-41.

Pennathur, S. et coll., 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(49), 34621-8.

Perier, C. et coll., 2007. Two molecular pathways initiate mitochondria-dependent dopaminergic neurodegeneration in experimental Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(19), 8161-6.

Perier, C. et coll., 2005. Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), 19126-31.

Perier, C. et coll., 2003. The rotenone model of Parkinson's disease. *Trends in Neurosciences*, 26(7), 345-6.

Perry, V.H., Hume, D.A. & Gordon, S., 1985. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience*, 15(2), 313-26.

Peschanski, M. et coll., 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: A Journal of Neurology*, 117 (Pt 3), 487-99.

Peterson, A.L. & Nutt, J.G., 2008. Treatment of Parkinson's disease with trophic factors. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 5(2), 270-80.

Petito, C.K. et coll., 1990. The two patterns of reactive astrocytosis in postischemic rat brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 10(6), 850-9.

Piccini, P. et coll., 1999. Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nature Neuroscience*, 2(12), 1137-40.

Pileblad, E. et coll., 1988. Studies on the autoxidation of dopamine: interaction with ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 263(2), 447-52.

Pollak, P., Benabid, A.L., Gervason, C.L. et coll., 1993. Long-term effects of chronic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus in different types of tremor. *Advances in Neurology*, 60, 408-13.

Pollak, P., Benabid, A.L., Gross, C. et coll., 1993. [Effects of the stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson disease]. *Revue Neurologique*, 149(3), 175-6.

Pollak, P. et coll., 1996. Subthalamic nucleus stimulation alleviates akinesia and rigidity in parkinsonian patients. *Advances in Neurology*, 69, 591-4.

Polymeropoulos, M.H. et coll., 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5321), 2045-7.

Popovic, N. et coll., 2002. Inhibition of autoimmune encephalomyelitis by a tetracycline. *Annals of Neurology*, 51(2), 215-23.

Przedborski, S. et coll., 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. *Journal of Neurochemistry*, 76(2), 637-40.

Przedborski, S. et coll., 2004. MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 36(4), 375-9.

Q

Qu, D. et coll., 2007. Role of Cdk5-mediated phosphorylation of Prx2 in MPTP toxicity and Parkinson's disease. *Neuron*, 55(1), 37-52.

Quintero, E.M. et coll., 2006. Behavioral and morphological effects of minocycline in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Brain Research*, 1093(1), 198-207.

R

Rascol, O., 1999. [Arguments in favor of early treatment of Parkinson's disease with dopaminergic agonists]. *Revue Neurologique*, 155(1), 35-42.

Rascol, O. et coll., 2002. [Management of levodopa-induced dyskinesia]. *Revue Neurologique*, 158(122), 117-124.

Ray, C.D. & Burton, C.V., 1980. Deep brain stimulation for severe, chronic pain. *Acta Neurochirurgica. Supplementum*, 30, 289-93.

Recchia, A. et coll., 2008. Generation of a alpha-synuclein-based rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 30(1), 8-18.

Remy, P. et coll., 1995. Clinical correlates of [18F]fluorodopa uptake in five grafted parkinsonian patients. *Annals of Neurology*, 38(4), 580-8.

Reynolds, A.D. et coll., 2007. Neuroprotective activities of CD4+CD25+ regulatory T cells in an animal model of Parkinson's disease. *Journal of Leukocyte Biology*, 82(5), 1083-94.

Riederer, P. & Youdim, M.B., 1986. Monoamine oxidase activity and monoamine metabolism in brains of parkinsonian patients treated with l-deprenyl. *Journal of Neurochemistry*, 46(5), 1359-65.

Rite, I. et coll., 2007. Blood-brain barrier disruption induces in vivo degeneration of nigral dopaminergic neurons. *Journal of Neurochemistry*, 101(6), 1567-82.

Rodriguez, M.C., Obeso, J.A. & Olanow, C.W., 1998. Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. *Annals of Neurology*, 44(3 Suppl 1), S175-88.

Rödter, A. et coll., Complex sensorimotor behavioral changes after terminal striatal 6-OHDA lesion and transplantation of dopaminergic embryonic micrografts. *Cell Transplantation*, 9(2), 197-214.

Roedter, A. et coll., 2001. Comparison of unilateral and bilateral intrastriatal 6-hydroxydopamine-induced axon terminal lesions: evidence for interhemispheric functional coupling of the two nigrostriatal pathways. *The Journal of Comparative Neurology*, 432(2), 217-29.

Rosenblad, C. et coll., 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. *The European Journal of Neuroscience*, 11(5), 1554-66.

Rothman, S.M., Thurston, J.H. & Hauhart, R.E., 1987. Delayed neurotoxicity of excitatory amino acids in vitro. *Neuroscience*, 22(2), 471-80.

Rousselet, E. et coll., 2002a. Role of TNF-alpha receptors in mice intoxicated with the parkinsonian toxin MPTP. *Experimental Neurology*, 177(1), 183-92.

Rowe, D.B. et coll., 1998. Antibodies from patients with Parkinson's disease react with protein modified by dopamine oxidation. *Journal of Neuroscience Research*, 53(5), 551-8.

Rozovsky, I., Finch, C.E. & Morgan, T.E., Age-related activation of microglia and astrocytes: in vitro studies show persistent phenotypes of aging, increased proliferation, and resistance to down-regulation. *Neurobiology of Aging*, 19(1), 97-103.

Ryan, M.E. & Ashley, R.A., 1998. How do tetracyclines work? *Advances in Dental Research*,

12(2), 149-51.

Ryu, J.K. et coll., 2002. Trisialoganglioside GT1b induces in vivo degeneration of nigral dopaminergic neurons: role of microglia. *Glia*, 38(1), 15-23.

S

Sahgal, A. et coll., 1984. N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) affects locomotor activity without producing a nigrostriatal lesion in the rat. *Neuroscience Letters*, 48(2), 179-84.

Sakakibara, R. et coll., 2008. Bladder and bowel dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 115(3), 443-60.

Scherman, D. et coll., 1989. Striatal dopamine deficiency in Parkinson's disease: role of aging. *Annals of Neurology*, 26(4), 551-7.

Schiffer, D. et coll., 1986. Glial fibrillary acidic protein and vimentin in the experimental glial reaction of the rat brain. *Brain Research*, 374(1), 110-8.

Schneider, J.S., 1989. Levodopa-induced dyskinesias in parkinsonian monkeys: relationship to extent of nigrostriatal damage. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 34(1), 193-6.

Schulz, J.B. et coll., 1995. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *Journal of Neurochemistry*, 64(2), 936-9.

Schwarting, R.K. & Huston, J.P., 1996. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Progress in Neurobiology*, 50(2-3), 275-331.

Schwarz, J., 2003. Rationale for dopamine agonist use as monotherapy in Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurology*, 16 Suppl 1, S27-33.

Sedelis, M., Schwarting, R.K. & Huston, J.P., 2001. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*, 125(1-2), 109-25.

Seibert, K. et coll., 1995. Mediation of inflammation by cyclooxygenase-2. *Agents and Actions. Supplements*, 46, 41-50.

Semchuk, K.M., Love, E.J. & Lee, R.G., 1992. Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. *Neurology*, 42(7), 1328-35.

Sheng, J.G., Mrak, R.E. & Griffin, W.S., 1998. Enlarged and phagocytic, but not primed, interleukin-1 alpha-immunoreactive microglia increase with age in normal human brain. *Acta Neuropathologica*, 95(3), 229-34.

Sherer, T.B. et coll., 2003. Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 341(2), 87-90.

Shimojo, M. et coll., 1991. Production of basic fibroblast growth factor in cultured rat brain microglia. *Neuroscience Letters*, 123(2), 229-31.

Shoulson, I., 1998. DATATOP: a decade of neuroprotective inquiry. Parkinson Study Group. Deprenyl And Tocopherol Antioxidative Therapy Of Parkinsonism. *Annals of Neurology*, 44(3 Suppl 1), S160-6.

Siegfried, J. & Lippitz, B., 1994. Chronic electrical stimulation of the VL-VPL complex and of the pallidum in the treatment of movement disorders: personal experience since 1982. *Stereotactic and Functional Neurosurgery*, 62(1-4), 71-5.

Sies, H. & Cadenas, E., 1985. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 311(1152), 617-31.

Smith, Y. & Kieval, J.Z., 2000. Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *Trends in Neurosciences*, 23(10 Suppl), S28-33.

Snyder, S.H. & D'Amato, R.J., 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. et coll., 1991. Selective increase of iron in substantia nigra zona compacta of parkinsonian brains. *Journal of Neurochemistry*, 56(3), 978-82.

Sonsalla, P.K., Giovanni, A. et coll., 1992. Characteristics of dopaminergic neurotoxicity produced by MPTP and methamphetamine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 648, 229-38.

Sonsalla, P.K., Zeevalk, G.D. et coll., 1992. 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. *Journal of Neurochemistry*, 58(5), 1979-982.

Spina, M.B. & Cohen, G., 1989. Dopamine turnover and glutathione oxidation: implications for Parkinson disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(4), 1398-400.

Steece-Collier, K. et coll., 2003. Embryonic mesencephalic grafts increase levodopa-induced forelimb hyperkinesia in parkinsonian rats. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 18(12), 1442-54.

Steece-Collier, K., Maries, E. & Kordower, J.H., 2002. Etiology of Parkinson's disease: Genetics and environment revisited. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(22), 13972-4.

Swartz, H.M., Sarna, T. & Zecca, L., 1992. Modulation by neuromelanin of the availability and reactivity of metal ions. *Annals of Neurology*, 32 Suppl, S69-75.

T

Tasker, R.R. et coll., 1997. Deep brain stimulation and thalamotomy for tremor compared. *Acta Neurochirurgica. Supplement*, 68, 49-53.

Tatton, N.A. et coll., 1998. A fluorescent double-labeling method to detect and confirm apoptotic nuclei in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 44(3 Suppl 1), S142-8.

Tatton, W.G. & Greenwood, C.E., 1991. Rescue of dying neurons: a new action for deprenyl in MPTP parkinsonism. *Journal of Neuroscience Research*, 30(4), 666-72.

Taylor, A.W. & Streilein, J.W., Inhibition of antigen-stimulated effector T cells by human cerebrospinal fluid. *Neuroimmunomodulation*, 3(2-3), 112-8.

Teismann, P. & Ferger, B., 2001. Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *Synapse (New York, N.Y.)*, 39(2), 167-74.

Teismann, P. et coll., 2003. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), 5473-8.

Terzioglu, M. & Galter, D., 2008. Parkinson's disease: genetic versus toxin-induced rodent models. *The FEBS Journal*, 275(7), 1384-91.

Thoenen, H. & Edgar, D., 1985. Neurotrophic factors. *Science (New York, N.Y.)*, 229(4710), 238-42.

Thoenen, H. & Tranzer, J.P., 1968. Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-Hydroxydopamine. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv Für Experimentelle Pathologie Und Pharmakologie*, 261(3), 271-88.

Tikka, T. et coll., 2001. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(8), 2580-8.

Tomac, A. et coll., 1995. Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature*, 373(6512), 335-9.

Tomás-Camardiel, M. et coll., 2004. Minocycline reduces the lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction, peroxynitrite-mediated nitration of proteins, disruption of the blood-brain barrier, and damage in the nigral dopaminergic system. *Neurobiology of Disease*, 16(1), 190-201.

Tompkins, M.M. et coll., 1997. Apoptotic-like changes in Lewy-body-associated disorders and normal aging in substantia nigral neurons. *The American Journal of Pathology*, 150(1), 119-31.

Ton, T.G. et coll., 2006. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 21(7), 964-9.

Town, T., Nikolic, V. & Tan, J., 2005. The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses. *Journal of Neuroinflammation*, 2, 24.

Trimmer, P.A. et coll., 1996. Dopamine neurons from transgenic mice with a knockout of the p53 gene resist MPTP neurotoxicity. *Neurodegeneration: A Journal for Neurodegenerative Disorders, Neuroprotection, and Neuroregeneration*, 5(3), 233-9.

Turski, L. et coll., 1991. Protection of substantia nigra from MPP+ neurotoxicity by N-methyl-D-

aspartate antagonists. *Nature*, 349(6308), 414-8.

U

Ungerstedt, U., 1968. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *European Journal of Pharmacology*, 5(1), 107-10.

Ungerstedt, U., 1971. Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behaviour. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, 367, 49-68.

Ungerstedt, U. & Arbuthnott, G.W., 1970. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Research*, 24(3), 485-93.

V

van Oosten, R.V., Verheij, M.M.M. & Cools, A.R., 2005. Bilateral nigral 6-hydroxydopamine lesions increase the amount of extracellular dopamine in the nucleus accumbens. *Experimental Neurology*, 191(1), 24-32.

van der Putten, H. et coll., 2000. Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(16), 6021-9.

Veldman, B.A. et coll., 1998. Genetic and environmental risk factors in Parkinson's disease. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 100(1), 15-26.

Viallet, F., 2000. [Diagnostic criteria for idiopathic Parkinson's disease]. *Revue Neurologique*, 156 Suppl 2 Pt 2, 30-5.

Vidailhet, M., 2000. [Diagnostic criteria for Parkinson syndromes, expecting Parkinson's disease]. *Revue Neurologique*, 156 Suppl 2 Pt 2, 43-50.

Vila, M. et coll., 2001. Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl- 4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5), 2837-42.

Vila, M. & Przedborski, S., 2004. Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nature Medicine*, 10 Suppl, S58-62.

Vizuete, M.L. et coll., 2000. Histamine infusion induces a selective dopaminergic neuronal death along with an inflammatory reaction in rat substantia nigra. *Journal of Neurochemistry*, 75(2), 540-52.

W

Weinreb, O. et coll., 2007. Induction of neurotrophic factors GDNF and BDNF associated with the mechanism of neurorescue action of rasagiline and ladostigil: new insights and implications for therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1122, 155-68.

Weller, R.O., Engelhardt, B. & Phillips, M.J., 1996. Lymphocyte targeting of the central nervous system: a review of afferent and efferent CNS-immune pathways. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 6(3), 275-88.

Wenning, G.K. et coll., 1997a. Short- and long-term survival and function of unilateral intrastriatal dopaminergic grafts in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 42(1), 95-107.

Wenning, G.K. et coll., 1997b. Short- and long-term survival and function of unilateral intrastriatal dopaminergic grafts in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 42(1), 95-107.

Widner, H., Möller, G. & Johansson, B.B., 1988. Immune response in deep cervical lymph nodes and spleen in the mouse after antigen deposition in different intracerebral sites. *Scandinavian Journal of Immunology*, 28(5), 563-71.

Widner, H. et coll., 1992. Bilateral fetal mesencephalic grafting in two patients with parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *The New England Journal of Medicine*, 327(22), 1556-63.

Winkler, C., Kirik, D. & Björklund, A., 2005. Cell transplantation in Parkinson's disease: how can we make it work? *Trends in Neurosciences*, 28(2), 86-92.

Winkler, C. et coll., 2002. L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiology of Disease*, 10(2), 165-86.

Wu, D.C. et coll., 2002. Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(5), 1763-71.

Wüllner, U. et coll., 1999. Cell death and apoptosis regulating proteins in Parkinson's disease--a cautionary note. *Acta Neuropathologica*, 97(4), 408-12.

Y

Yamada, T. et coll., 1990. Relative sparing in Parkinson's disease of substantia nigra dopamine neurons containing calbindin-D28K. *Brain Research*, 526(2), 303-7.

Yan, Q., Matheson, C. & Lopez, O.T., 1995. In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons. *Nature*, 373(6512), 341-4.

Yang, L. et coll., 1998. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyride neurotoxicity is attenuated in mice overexpressing Bcl-2. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(20), 8145-52.

Yang, L. et coll., 2003. Minocycline enhances MPTP toxicity to dopaminergic neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 74(2), 278-85.

Yrjänheikki, J. et coll., 1999. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(23), 13496-500.

Yurek, D.M., 1998. Glial cell line-derived neurotrophic factor improves survival of dopaminergic

neurons in transplants of fetal ventral mesencephalic tissue. *Experimental Neurology*, 153(2), 195-202.

Z

Zecca, L. et coll., 2004. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nature Reviews. Neuroscience*, 5(11), 863-73.

Zhang, W. et coll., 2005. Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(6), 533-42.

Zheng, T.S. et coll., 2000. Deficiency in caspase-9 or caspase-3 induces compensatory caspase activation. *Nature Medicine*, 6(11), 1241-7.

Zhou, Y. et coll., 2005. Microglial activation induced by neurodegeneration: a proteomic analysis. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 4(10), 1471-9.

Zhu, S. et coll., 2002. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature*, 417(6884), 74-8.

–

A pilot clinical trial of creatine and minocycline in early Parkinson disease: 18-month results. *Clinical Neuropharmacology*, 31(3), 141-50.

2006. A randomized, double-blind, futility clinical trial of creatine and minocycline in early Parkinson disease. *Neurology*, 66(5), 664-71.

1993. Effects of tocopherol and deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease. The Parkinson Study Group. *The New England Journal of Medicine*, 328(3), 176-83.

Place de l'activation microgliale associée à la dégénérescence des neurones dopaminergiques provoquée par la 6-OHDA chez le rat. Implication dans la compréhension de la pathogénie de la maladie de Parkinson.

Ce travail a conduit au développement d'un nouveau modèle de maladie de Parkinson (MP) chez le rat. Suite à l'injection bilatérale de 6-OHDA, un toxique des neurones dopaminergiques (DAic), les animaux présentaient des troubles moteurs spécifiques, quantifiables et corrélés à la perte en neurones DAic dans la substance noire (SN), et réversibles sous traitement par L-DOPA. Le traitement par L-DOPA entraînait le développement de dyskinésies chez les animaux les plus dénervés. Les phénomènes inflammatoires associés à la dégénérescence DAic provoquée par la 6-OHDA ont été ensuite étudiés. La cinétique de l'activation microgliale a été analysée sur 35 jours suivant l'injection du toxique. Elle révélait la stricte concomitance de l'activation microgliale et de la dégénérescence des neurones DAic au niveau de la même zone de la SN. Chez les rats sham, l'activation microgliale due au traumatisme de l'injection du véhicule n'entraînait pas de perte des neurones DAic. Le traitement des animaux par la minocycline, considérée comme un inhibiteur de l'activation microgliale, a plutôt conduit à une accentuation de la perte en neurones DAic accompagnée en parallèle d'une plus forte activation microgliale, suggérant un rôle protoxique de ce traitement avec la 6-OHDA. Une analyse moléculaire par RT-PCR quantitative dans ce même modèle rat a montré une augmentation des ARN messagers de GDNF, TNFα et iNOS possiblement produits par la microglie une fois la dégénérescence neuronale initiée. L'ensemble des résultats obtenus dans ce modèle de MP suggère que l'activation microgliale n'est pas un phénomène primaire à la dégénérescence des neurones DAic provoquée par la 6-OHDA dans la SN.

MOTS CLES : **Maladie de Parkinson, troubles moteurs, 6-OHDA, neurodégénérescence, inflammation, microglie.**

Analyses of microglia activation associated to degenerative dopamine containing neurons induced by 6-OHDA on rats. Implication on pathogenesis comprehension of Parkinson's disease.

The objective of this work was to develop a new rat model of Parkinson's disease (PD). A bilateral injection of 6-OHDA induced specific and quantifiable motor behavioral trouble. These were correlated with dopamine (DA) containing neurons loss in the *substantia nigra* (SN). L-DOPA treatment reversed behavioral deficiency and induced dyskinesia on most denerved rats. Then, we studied inflammatory phenomenon associated with DA neurons degeneration induced by 6-OHDA. Microglia activation kinetic was analyzed for 35 days after injection. It was strictly concomitant with the DA neuronal loss within the SN. On rat sham, microglial activation caused by the vehicle injection trauma did not induce neurodegenerescence. Minocycline treatment, considered as a microglial activation inhibitor, caused an increased of neuronal death associated with a proportional increase of microglial activation within the SN. This data suggested a 6-OHDA protoxic effect of this treatment. In the bilateral rat model of PD, a quantitative RT-PCR analyses showed an increase of GDNF, TNFa and iNOS mRNA possibly produced by microglia after the initiation of the DA neuron degeneration. Taken together, all this data suggest that microglial activation is not a primary phenomenon, but induced by the neuronal death in our model.

KEY WORDS: Parkinson's disease, motor behavior, 6-OHDA, neurodegenerescence, inflammation, microglia.