

ÉCOLE DOCTORALE SST

UMRS INSERM 930, CNRS ERL 3106

« Imagerie et cerveau »

THÈSE présentée par
Emmanuelle LAGRUE

soutenue en mai 2009

pour obtenir le grade de **Docteur de l'université François - Rabelais**
Spécialité : Neurosciences

VULNERABILITE ENERGETIQUE
ET NEUROPROTECTION
DES NOYAUX GRIS CENTRAUX

THESE dirigée par :

Monsieur Pierre Castelnau

PU-PH, Université François Rabelais, Tours

RAPPORTEURS :

Madame Rita Raisman-Vozari

DR INSERM, UMR S679, Paris

Monsieur Philippe Evrard

PU-PH, Université Paris 7 Denis Diderot, Paris

JURY :

Madame Sylvie Chalon

DR INSERM, UMRS INSERM 930, CNRS ERL 3106, Tours

Madame Rita Raisman-Vozari

DR INSERM, UMR S679, Paris

Monsieur Philippe Evrard

PU-PH, Université Paris 7 Denis Diderot, Paris

Monsieur Pierre Gressens

DR INSERM, UMR U676 INSERM – Université Paris 7, Paris

Monsieur Elie Saliba

PU-PH, Université François Rabelais, Tours

Monsieur Pierre Castelnau

PU-PH, Université François Rabelais, Tours

A François-Xavier, meilleur papa, meilleur mari, meilleur
ami, j'en oublie surement, bref le meilleur tout court

A Arthur, Eléonore et Eliott, mes trois mousquetaires

A mes parents et mes beaux-parents, nous avons de la chance de vous avoir

Remerciements

A Mesdames et Messieurs les membres du jury, merci d'avoir accepté de juger ce travail.

A Sylvie Chalon, merci beaucoup de m'avoir laissé continuer à travailler au sein de l'unité après mon master 2. Merci également d'avoir compris à quel point la clinique peut être prenante et de m'avoir soutenu tout au long de cette thèse.

A Pierre Castelnau, tu m'as offert la possibilité très rare de faire un réel clinicat hospitalo-universitaire. J'espère que la deuxième année à venir sera aussi bien que la première.

A Sylvie Bodard, tellement irremplaçable bien que certains aient tendance à oublier cet état de fait.

A tous les membres du labo pour le soutien psychologique lors des phases dépressives : Lucette, Jackie, Nathalie, Patrick, Sylvie, Emilie, Gaëlle, Diane, Cathie, Nicolas, vous êtes meilleurs que du Prozac lorsque les manips ne marchent pas.

A tous ceux qui m'ont tenu la main lors de mes manipulations: Mary-Christine et Muriel pour l'animalerie, Laurent, Marie-Paule et Zuhail pour l'HPLC, Lucette pour la radioactivité, Mr le Pr Meunier pour la fourniture de médicaments, Mme Lydie Nadal-Desbarats pour la SRM, Mr le Pr Fetissov pour la réalisation de coupes paraffine, je n'aurais rien pu faire sans vous.

Et bien sûr à Marc Sitbon, Anne Keriell, Lavanya Madakasira, Hiroyuki Abe, Jawida Touhami, et Julien Cau à l'Institut de Génétique Moléculaire et à la plate forme imagerie de Montpellier. Vous m'avez accueilli les bras ouverts et initié à des techniques nouvelles dans une ambiance plus que sympathique, merci pour tout.

Résumé

Le réseau dopaminergique nigro-strié, qui est une composante des noyaux gris centraux (NGC), est lésé dans de nombreuses encéphalopathies métaboliques et dégénératives de l'enfant parmi lesquelles on compte des altérations du métabolisme du cuivre ou du fer, des aciduries organiques, des anomalies du cycle de l'urée ou des atteintes mitochondriales. Parmi l'ensemble des maladies avec altération des NGC, nous nous sommes intéressés aux maladies mitochondriales en raison de données de la littérature qui attestent du rôle central de la mitochondrie dans la neurodégénérescence au cours du développement et du vieillissement. L'implication d'une défaillance mitochondriale est ainsi établie dans la pathologie des maladies d'Alzheimer, de Parkinson et d'Huntington et de la sclérose latérale amyotrophique. Nous avons plus particulièrement centré notre étude sur le syndrome de Leigh (SL) qui constitue la maladie mitochondriale la plus fréquente chez l'enfant. Nous avons ainsi dans un premier temps généré un modèle de SL de l'enfant chez la souris C57BL/6J à 35 jours de vie par utilisation du MPTP, un toxique qui inhibe le complexe I mitochondrial. Nous avons ensuite recherché un éventuel effet neuroprotecteur des antiépileptiques (AE) dans ce modèle pharmacologique. Notre intérêt pour les AE découle du fait qu'ils inhibent certains canaux ioniques ATP-dépendants. Ils favorisent donc une épargne d'ATP et pourraient ainsi remettre en adéquation la consommation énergétique cellulaire avec les capacités de production d'ATP diminuées en période de stress métabolique. Certains AE pourraient également promouvoir un environnement protecteur pour les neurones en raison de leur effet anti glutamatergique, pro GABAergique et stabilisateur de membrane. Les AE présentent enfin une pharmacocinétique et un profil de tolérance très favorable chez l'enfant. Nous avons ainsi prouvé l'effet neuroprotecteur de la lamotrigine dans notre modèle de SL de l'enfant. Cet effet neuroprotecteur est probablement expliqué par la multiplicité des voies d'action de cette molécule : diminution du stress oxydatif, inhibition de la microglie, augmentation du GABA, blocage des canaux sodium et potassium voltage-dépendants, stimulation de la production de BDNF et inhibition directe de la formation du pore mitochondrial. Notre étude étant centrée sur la sensibilité des NGC au stress énergétique, nous avons enfin souhaité mieux caractériser le métabolisme du glucose et du phosphate au sein de cette structure. Nous avons donc réalisé un marquage par immunofluorescence du transporteur du glucose de type 1 et des transporteurs du phosphate inorganique de type 1 et 2, en utilisant des ligands extracellulaires spécifiques dérivés de rétrovirus.

Mots clefs : mitochondrie, neurodégénérescence, MPTP, ATP, antiépileptiques, lamotrigine

Résumé en anglais

The nigro-striatal network is part of the basal ganglia, which are involved in motricity, learning, and emotions. This network is affected in several metabolic and degenerative encephalopathies in childhood, including iron and copper metabolism disorders, organic acidurias, urea cycle deficits, and mitochondrial diseases. Among all these encephalopathies, we focused on mitochondrial diseases given all the data from the literature which underline the pivotal role of mitochondria in neurodegeneration. A mitochondrial failure is well established in stroke, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease and amyotrophic lateral sclerosis. We specifically centred our work on Leigh syndrome (LS), which represents one of the most frequent mitochondrial disorders in childhood. We first generated a childhood LS model in C57BL/6J mice (35 days old) through MPTP intoxication, which inhibits the mitochondrial complex I in the respiratory chain. We then evaluated the potential neuroprotective effect of anti convulsants (AC) in this model. Our interest for AC arises from the fact that they inhibit several ATP-dependent ion channels. Such properties promote ATP sparing and therefore provide an opportunity to adapt the cellular energy consumption to the limited ATP availability during the energetic distress. Some AC could also promote a protective environment for neurons since they exhibit anti glutamatergic, pro-GABAergic and membrane stabilization properties. Lastly, AC are well tolerated in humans even in early childhood. We proved that lamotrigine is neuroprotective in our LS model. This neuroprotective effect might rely on lamotrigine multiple and synergistic actions: oxidative stress lowering, microglial inhibition, GABA increase, sodium and potassium voltage-dependent channels inhibition, BDNF up regulation, mitochondrial pore direct inhibition. Since our study is focused on the basal ganglia sensibility to energetic stress, we studied the glucose and phosphate metabolism in this structure. We thus performed immunofluorescence staining for the glucose transporter type 1 and the phosphate transporter type 1 and 2 using specific extracellular ligands derived from retroviruses.

Keywords: mitochondrion, neurodegeneration, MPTP, ATP anti convulsants, lamotrigine

Table des matières

Remerciements	2
Résumé	3
Résumé en anglais	4
Table des matières	5
Liste des tableaux	8
Liste des figures	8
Liste des communications affichées et orales	9
I. INTRODUCTION GENERALE	10
A. Les noyaux gris centraux et la neurotransmission dopaminergique	10
1. Anatomie et organisation fonctionnelle des noyaux gris centraux	11
2. La neurotransmission dopaminergique	12
i. Principales voies de neurotransmission dopaminergique	12
ii. Rôles physiopathologiques du système dopaminergique.....	14
iii. Biosynthèse, stockage et libération de la dopamine	14
iv. Catabolisme de la dopamine	16
v. Recapture et régulation du métabolisme dopaminergique	17
B. Le métabolisme énergétique mitochondrial	17
1. Structure de la chaîne respiratoire mitochondriale.....	18
2. Pore mitochondrial (mitochondrial permeability transition pore).....	18
3. Voies d'apoptose caspases-dépendante et caspases-indépendante	20
4. Etapes réversibles de la cascade lésionnelle mitochondriale	21
5. Pathologies neuro dégénératives de l'adulte	23
6. Les encéphalopathies métaboliques et dégénératives de l'enfant	25
i. Clinique des maladies avec atteinte des NGC chez l'enfant.....	25
ii. Le syndrome de Leigh.....	26
iii. Susceptibilité des NGC au cours du développement	27
C. Le MPTP	28
1. Métabolisme du MPTP.....	28
2. Influence de l'âge et de la lignée sur la neurotoxicité du MPTP	29
3. Mécanismes d'action du MPTP	30
4. Les modèles d'intoxication par le MPTP	32

D. Propriétés neuroprotectrices éventuelles des antiépileptiques.....	32
1. Le concept de neuroprotection	32
2. Recherche de molécules candidates	33
3. Pathologies pour lesquelles un effet neuroprotecteur des AE est connu.....	34
4. Mécanismes connus de neuroprotection par les antiépileptiques.....	35
5. Critères de choix des antiépileptiques utilisés dans le modèle MPTP	35
II. RESULTATS EXPERIMENTAUX	37
A. Présentation des articles	37
B. Articles publiés et/ou sous presse :	40
1. Article 1: <i>MPTP intoxication in mice: a useful model of Leigh syndrome to study mitochondrial diseases in childhood.....</i>	40
2. Article 2: <i>Lamotrigine is neuroprotective in the energy deficiency model of MPTP intoxicated mice.....</i>	67
C. Article soumis : Article 3: <i>Basal ganglia neuroprotection with anticonvulsants after energy stress : a comparative study.</i>	75
D. Article en préparation : Article 4: <i>Surface expression of Glut1, Pit1 and Pit2 in normal and MPTP mouse brain as monitored by new metabolic markers.....</i>	92
III. DISCUSSION.....	113
A. Intoxication par le MPTP chez la souris : validation du modèle murin de syndrome de Leigh	113
1. Intérêt et originalité du modèle au regard des autres modèles de maladies mitochondriales	113
2. Limites du modèle :	114
i. Phénotype des souris MPTP.....	114
ii. Mécanisme de mort cellulaire après intoxication mitochondriale	115
B. Neuroprotection par les antiépileptiques dans le modèle murin de syndrome de Leigh	116
1. Molécules à action neuroprotectrice prouvée chez l'animal et l'homme.....	116
2. Effet neuroprotecteur de la lamotrigine	119
i. Effet neuroprotecteur chez l'animal et l'homme	119
ii. Voies de neuroprotection possibles.....	120

C. Coopération neurones-glie et métabolisme énergétique	124
1. Coopération neurones-glie	124
i. Rôle des astrocytes	124
a. Astrocytes et neurodégénérescence	124
b. Astrocytes et métabolisme énergétique	125
c. Astrocytes et neuroprotection	126
ii. Rôle de la microglie	126
a. Microglie et neurodégénérescence	126
b. Microglie et neuroprotection	127
2. Evaluation du statut énergétique cellulaire par l'intermédiaire de récepteurs rétroviraux	127
 IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	 130
A. Conclusions	130
B. Perspectives	130
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	 132

Liste des tableaux

Tableau 1 : Mode d'action des antiépileptiques	36
Tableau 2 : Molécules à action neuroprotectrice prouvée chez l'animal.....	118

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie et organisation fonctionnelle des noyaux gris centraux.....	11
Figure 2 : Les principales voies dopaminergiques du SNC des mammifères	13
Figure 3 : Biosynthèse et catabolisme de la dopamine.....	15
Figure 4 : Schéma d'une synapse dopaminergique.....	16
Figure 5 : Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale	18
Figure 6 : Schéma du pore mitochondrial	19
Figure 7 : Apoptose dépendante de la mitochondrie	21
Figure 8 : Cascade lésionnelle mitochondriale	23
Figure 9 : IRM d'un patient présentant un syndrome de Leigh.....	27
Figure 10 : Mécanismes d'action du MPTP.....	31

Liste des communications affichées et orales

Communications affichées:

1. P. Castelnau, E. Lagrue, L. Galineau, B. Abert, F. Chabab, S. Bodard, M. Briand, S. Chalon. Dopamine transporter analysis shows neuroprotective properties of anticonvulsant Lamotrigine, but not Topiramate, Valproate or Riluzole in the MPTP mouse model. New perspectives in neurotransmitter transporter biology. 15th Neuropharmacology Society meeting. Novembre 2005, **Washington**, USA.
2. E. Lagrue, B. Abert-Rozé, L. Galineau, F. Medja, A. Lombès, F. Chabab, S. Bodard, S. Chalon, P. Castelnau. Lésion du réseau dopaminergique nigro-strié par agression énergétique : un nouveau modèle de maladie mitochondriale. XIIèmes Journées Recherche de la Faculté de Médecine de **Tours**, Octobre 2005.
3. E. Lagrue, B. Abert, F. Chabab, L. Nadal-Desbarats, F. Fetissof, P. Meunier, P. Gressens, S. Chalon, P. Castelnau. Effet neuroprotecteur du lamictal dans un modèle d'agression énergétique mitochondriale. Congrès Annuel de la Société Française de Neuropédiatrie - **Strasbourg**, Janvier 2006.
4. E. Lagrue, B. Abert, F. Chabab, P. Gressens, S. Chalon, P. Castelnau. Effet neuroprotecteur du Lamictal dans un modèle d'agression énergétique mitochondriale. XIIèmes Journées de Neurologie de Langue Française, **Toulouse**, Avril 2006.
5. H. Abe, M. Lavanya, JL. Battini, E. Lagrue, JM. Lourmière, P. Castelnau, M. Sitbon. Retroviral envelope-derived ligands as new markers of in situ neurological metabolism. Journée jeunes chercheurs de l'Association pour la Recherche sur le Cancer, **Paris**, Octobre 2007.

Communications orales:

1. P. Castelnau, E. Lagrue, B. Abert, F. Chabab, P. Gressens, S. Chalon. Effet neuroprotecteur du Lamictal dans un modèle de souffrance énergétique cérébrale induite par le MPTP chez la souris. Club de Neuroprotection, **Montpellier**, Mai 2006.
2. P. Castelnau ; E. Lagrue, S. Arpin, B. Abert-Rozé, F. Chabab, L. Nadal-Desbarats, A. Lombès, P. Gressens, S. Chalon. Lésion du réseau dopaminergique nigro-strié par agression énergétique : un nouveau modèle de maladie mitochondriale. Congrès annuel de la Société Française de neurologie pédiatrique, **Rouen**, Janvier 2009.

I. INTRODUCTION GENERALE

La première partie de ce travail a pour but d'explicitier les différentes notions anatomiques, biochimiques, pharmacologiques, moléculaires et physiopathologiques nécessaires à la compréhension de la problématique développée dans la partie expérimentale de cette thèse.

Nous décrirons, en premier lieu, les noyaux gris centraux (NGC) et le système dopaminergique qui s'établit au sein de ces noyaux. Notre intérêt pour les NGC découle de leur atteinte spécifique au cours de nombreuses encéphalopathies métaboliques et dégénératives de l'enfant. Au sein de l'ensemble des maladies avec altération des NGC, nous nous sommes centrés sur l'étude des maladies mitochondriales et, plus particulièrement, en raison de sa fréquence sur le syndrome de Leigh (SL) que nous détaillerons.

De nombreux résultats expérimentaux soulignent en effet le rôle central de la mitochondrie dans l'apparition et l'évolution des maladies neurodégénératives. Nous préciserons ces aspects dans un second temps de l'introduction.

Le développement d'un modèle valide de SL nous semblait donc utile chez l'enfant afin de pouvoir tester l'efficacité de diverses stratégies de neuroprotection. Nous avons eu recours au 1-méthyl-4-phényl-1, 2, 3, 6 tétrahydropyridine (MPTP) dont les propriétés pharmacologiques seront explicitées dans un troisième temps. Parmi les axes de neuroprotection existants, nous décrirons enfin, dans un quatrième et dernier temps de cette partie introductive, les arguments qui nous ont amené à retenir les antiépileptiques comme molécules candidates.

A. Les noyaux gris centraux et la neurotransmission dopaminergique

Ce premier chapitre a pour but de décrire l'anatomie et la physiopathologie du système dopaminergique impliqué dans les maladies dégénératives avec atteinte des NGC tel que le SL.

1. Anatomie et organisation fonctionnelle des noyaux gris centraux

Les noyaux gris centraux sont une structure impliquée dans le contrôle de la posture et des mouvements du corps et dans les processus cognitifs d'apprentissage et de régulation des émotions (Afiki, 2003 ; Graybiel et al, 1994).

Les NGC sont constitués de plusieurs structures anatomiquement proches et fonctionnellement interconnectées nommées striatum (constitué du noyau caudé et du putamen), pallidum, noyau sub thalamique et substance noire (SN), divisée en SN pars compacta et SN pars reticulata (Fig. 1).

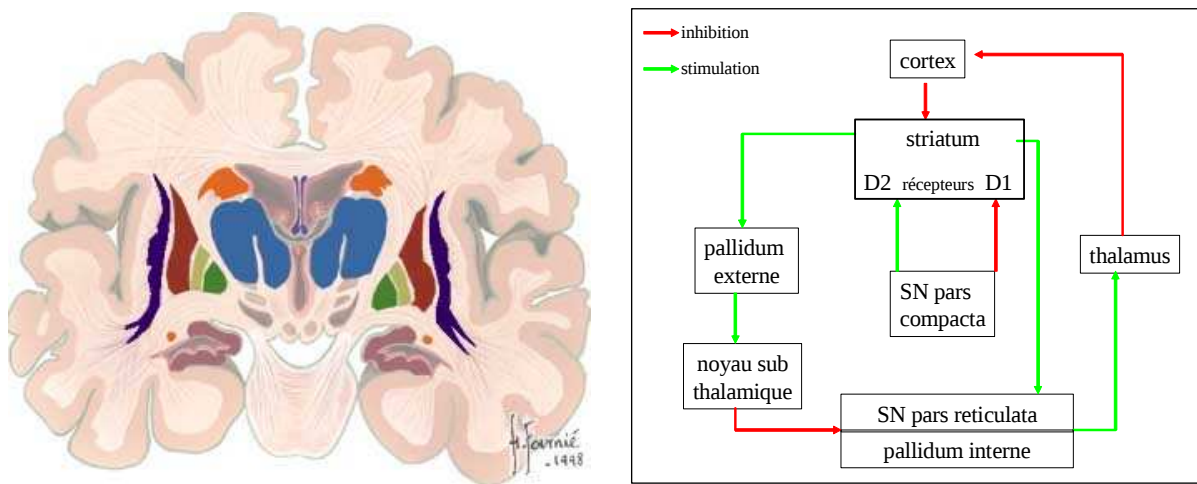


Figure 1 : Anatomie et organisation fonctionnelle des noyaux gris centraux (d'après H.Fournié)

Schéma d'une coupe frontale de cerveau humain passant par les NGC.

Les NGC sont constitués du striatum (noyau caudé et putamen), du thalamus, du pallidum (interne et externe), du noyau sub thalamique et de la SN.

Le fonctionnement des NGC implique l'intervention de divers neurotransmetteurs parmi lesquels le glutamate, le GABA et la dopamine (DA) (Mora et al, 2008). Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au sein des NGC au réseau dopaminergique nigro-strié (cf chapitre ii) 2)) qui relie la SN au striatum. Le système dopaminergique exerce en effet une modulation du contrôle moteur, participe aux phénomènes d'apprentissage, de régulation des

émotions et a un rôle neurodéveloppemental (Smidt et al, 2003). Le réseau nigro-strié est lésé dans de nombreuses encéphalopathies métaboliques et dégénératives de l'enfant par altération du métabolisme du cuivre, du fer, ou du métabolisme énergétique mitochondrial par exemple (Saudubray et Charpentier, 1995).

Le réseau nigro-strié est constitué par les afférences dopaminergiques émises de la substance noire pars compacta vers le striatum qui émet lui-même des efférences pour la SN pars reticulata. On distingue deux principales voies fonctionnelles : 1) la voie trans striatale directe (SN pars compacta → striatum → SN pars reticulata) qui active le cortex par désinhibition des noyaux de sortie, tandis que 2) la voie indirecte transsubthalamique (SN pars compacta → striatum → pallidum externe → noyau sub thalamique → SN pars reticulata) l'inhibe, permettant la terminaison et la modulation du mouvement (Graybiel et al, 1994).

2. La neurotransmission dopaminergique

i. Principales voies de neurotransmission dopaminergique

Le système dopaminergique des mammifères et des rongeurs qui inclue les NGC comprend en plus de la voie nigro-striée deux autres voies majeures nommées voie tubéro-infundibulaire et voie méso-cortico-limbique, elle-même divisée en voie méso-corticale et voie méso-limbique (Fig. 2)

Les neurones de la voie tubéro-infundibulaire ont leur corps cellulaires dans les noyaux arqués et se projettent sur l'hypophyse où ils contrôlent la sécrétion de prolactine par les cellules lactotropes. Les neurones de la voie nigro-striée ont comme vu précédemment leur corps cellulaires dans la SN, projettent sur le striatum et exercent principalement des fonctions de régulation motrice.

La voie méso-cortico-limbique émerge quand à elle de 2 noyaux. Les axones issus du tegmentum ou aire tegmentale ventrale (ATV) innervent le cortex frontal et le système

limbique (septum, amygdale). Les axones issus du noyau accumbens (NA) innervent le thalamus, le striatum, le mésencéphale et également l'ATV afin de permettre un rétrocontrôle par le NA des influx qu'il reçoit de l'ATV. La voie méso-corticale est impliquée dans le contrôle des fonctions cognitives et de l'apprentissage tandis que la voie méso-limbique constitue le réseau anatomique à l'origine des conduites affectives et des phénomènes de récompense (Lindvall et al, 1984).

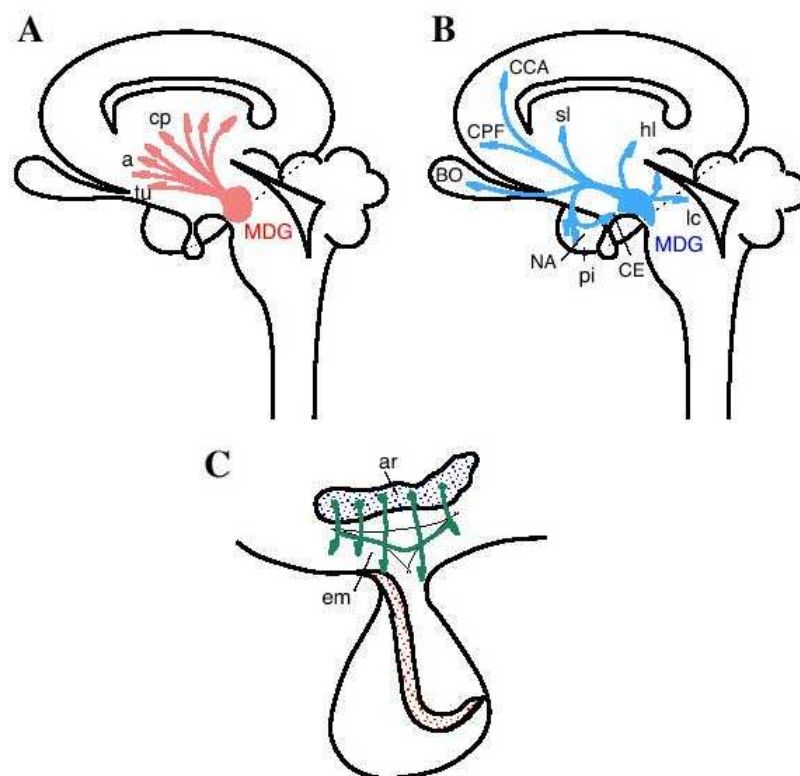


Figure 2 : Les principales voies dopaminergiques du système nerveux central des mammifères

(d'après Lindvall et Björklund, 1984).

A. voie nigro-striée, B. voie méso-cortico-limbique et C. voie tubéro-infundibulaire.

Abréviations : a, noyau accumbens; ar, noyau arqué; BO, bulbe olfactif; CCA, cortex cingulaire antérieur; CE, cortex entorhinal; cp, noyau caudé-putamen; CPF, cortex préfrontal; em, éminence médiane; hl, noyau latéral de l'habénula; lc, locus coeruleus; MDG, groupe mésencéphalique dopaminergique; NA, noyau amygdalien; pi, cortex piriforme; sl, noyau septal latéral et tu, tubercule olfactif.

ii. Rôles physiopathologiques du système dopaminergique

La DA présente au niveau des NGC et du réseau nigro-strié constitue l'un des principaux neuromédiateurs du système nerveux central (SNC) en raison de l'importance et de la multiplicité des phénomènes physiopathologiques dans lesquelles elle est impliquée.

La DA exerce en premier lieu un rôle central au cours du développement du SNC. Des expériences d'intoxication prénatale à la cocaïne (qui entraîne une augmentation de la DA cérébrale) ont ainsi permis de prouver l'apparition d'anomalies de développement du cortex telles qu'une croissance dendritique aberrante (Levitt et al, 1997). Ces anomalies sont prédominantes au niveau des zones riches en afférences dopaminergiques et rares dans les zones innervées en majorité par des terminaisons sérotoninergiques et noradrénergiques (Jones et al, 1996).

Sur le plan physiologique, la DA régule à la fois comme vu antérieurement des fonctions motrices par la voie nigro-striée et des fonctions cognitives par la voie méso-cortico-limbique. Une altération du métabolisme dopaminergique est en cause dans diverses affections neurologiques telles que la maladie de Parkinson (Hamani et Lozano, 2003), l'autisme (Makkonen et al, 2008), le syndrome d'hyperactivité avec déficit attentionnel (Tripp et Winckens, 2008) ou la schizophrénie (Murray et al, 2008).

iii. Biosynthèse, stockage et libération de la dopamine

La DA ne passe pas la barrière hémato encéphalique. Ce neurotransmetteur est donc synthétisé *in situ* au niveau des corps cellulaires et des terminaisons synaptiques des neurones dopaminergiques. Le précurseur de la DA est la tyrosine qui est elle-même synthétisée à partir de la phénylalanine par action de la phénylalanine hydroxylase. La tyrosine est convertie en dihydroxyphénylalanine ou L-DOPA par la tyrosine hydroxylase (TH) qui représente l'enzyme limitante de la synthèse de la DA (Fig. 3). La TH est une enzyme cytosolique qui

nécessite comme cofacteurs de la tétrahydroptérine, des molécules d'oxygène et de fer. La L-DOPA est enfin transformée en DA par l'action de la Dopa décarboxylase (Siegel et al, 2005).

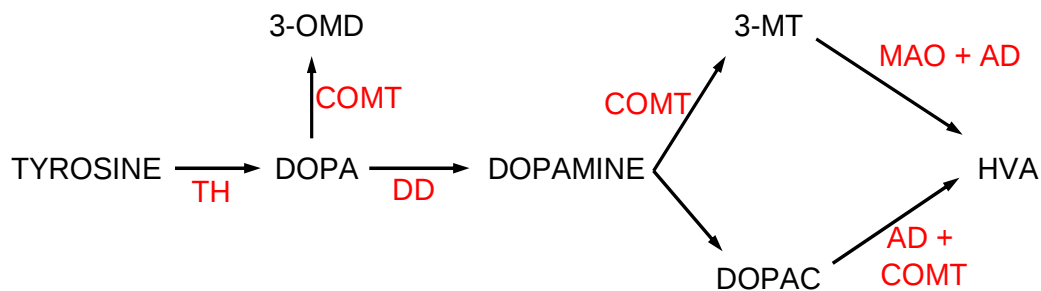


Figure 3 : Biosynthèse et catabolisme de la dopamine

AD = Aldéhyde déshydrogénase, COMT = Catéchol - O - Méthyl - Transférase,

DD = DOPA décarboxylase, MAO = Monoamine oxydase, TH = tyrosine hydroxylase.

La DA nouvellement synthétisée est de localisation cytoplasmique. Cette DA peut secondairement être stockée au sein de deux types de vésicules via le transporteur vésiculaire des monoamines VMAT2. Le premier type de vésicules est représenté par 20% des vésicules présynaptiques qui contiennent de la DA nouvellement synthétisée (comme dans le pool cytoplasmique) et qui sera relarguée préférentiellement. Le deuxième type de vésicules est représenté par des vésicules non disponibles pour un relargage immédiat (Kapatos et Zigmond, 1977).

La libération de la DA peut s'effectuer soit par un phénomène calcium-dépendant, soit par un phénomène calcium indépendant. Dans la modalité calcium dépendante la dépolarisation neuronale induit l'entrée d'ions calcium puis la libération de la DA par exocytose des vésicules de stockage (Kelly, 1993). Dans la modalité calcium indépendante, il survient un transport reverse au niveau du transporteur de la dopamine (DAT) qui assure normalement la recapture de la DA depuis la fente synaptique (Leviel, 2001).

iv. Catabolisme de la dopamine

Le métabolisme de la DA est réalisé soit par les monoamine oxydase A et B, soit par la catéchol-O-méthyl transférase. Les MAO-A et -B sont localisées au niveau de la membrane externe mitochondriale des neurones et des cellules gliales respectivement. La COMT est une enzyme extracellulaire associée à la membrane neuronale. La DA présente dans la terminaison présynaptique est métabolisée par la MAO-A neuronale en acide dihydroxyphénylacétique (Dopac). Le Dopac est ensuite transformé par la COMT dans la fente synaptique en acide homovanilique (HVA). La DA présente dans la fente synaptique est quand à elle transformée par la COMT en 3-méthoxytyramine, elle-même transformée par la MAO-B gliale en HVA. Les taux de Dopac rendent ainsi majoritairement compte de l'activité métabolique cellulaire alors que l'HVA reflète le catabolisme de la DA libérée dans la fente synaptique.

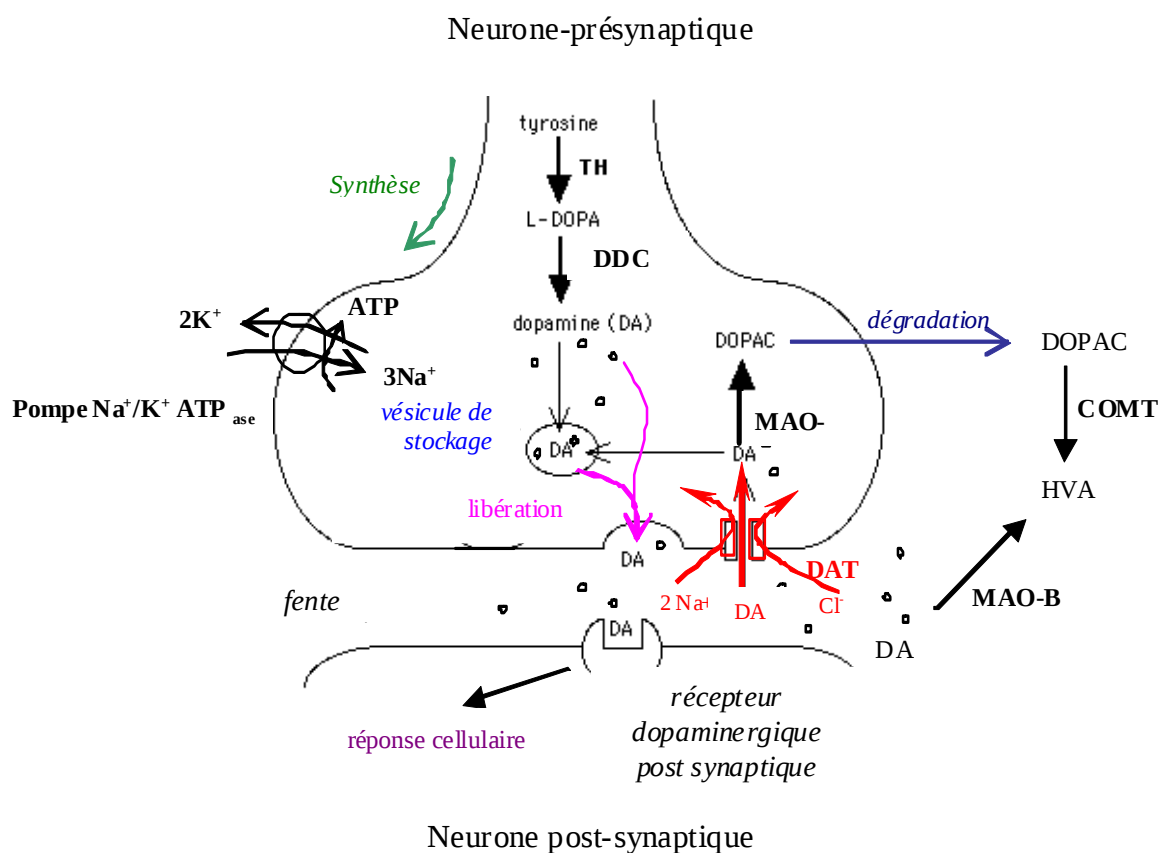


Figure 4 : Schéma d'une synapse dopaminergique

v. Recapture et régulation du métabolisme dopaminergique

La dopamine libérée dans la fente synaptique est recaptée à 80% par son transporteur membranaire DAT, qui contrôle ainsi l'intensité et la durée d'action de la DA dans la synapse. Le DAT représente ainsi un marqueur moléculaire dont l'étude donne un reflet assez fidèle du métabolisme dopaminergique *in vivo*.

Le DAT est une protéine membranaire présynaptique composée de 12 segments transmembranaires dont les extrémités N et C terminales sont intra-cytoplasmiques. La séquence de 620 acides aminés du DAT est très conservée puisque le DAT humain possède 98% de similitude avec celui du rat (Giros et al, 1992) ce qui souligne le rôle probablement majeur de cette molécule au cours du développement. Le transport par le DAT est un cotransport $\text{Na}^+ \text{Cl}^-$ consommateur d'énergie apportée par le gradient de concentration en ions Na^+ et K^+ généré par la pompe Na^+/K^+ ATPase.

Nous avons donc décrit dans ce chapitre la structure et le fonctionnement des NGC qui sont lésés au cours de nombreuses encéphalopathies métaboliques et dégénératives de l'enfant. Au sein de l'ensemble des maladies avec altération des NGC, nous nous sommes centrés sur l'étude des maladies mitochondriales. Nous rappellerons donc à ce stade certains éléments de la physiologie mitochondriale.

B. Le métabolisme énergétique mitochondrial

Ce deuxième chapitre a pour but d'expliciter la structure de la chaîne respiratoire (CR) mitochondriale et du pore mitochondrial, de définir la notion de mort cellulaire programmée par apoptose et de montrer le rôle central de la mitochondrie dans les phénomènes de neurodégénérescence aussi bien chez l'adulte au cours du vieillissement que chez l'enfant au cours du développement.

1. Structure de la chaîne respiratoire mitochondriale

Le fonctionnement enzymatique cellulaire en particulier le fonctionnement des canaux ioniques ATP-dépendants tel que le DAT requiert de l'énergie essentiellement extraite des molécules d'adénosine triphosphate (ATP). L'ATP est produit à 90% par le cycle de Krebs et par la phosphorylation oxydative mitochondriale au niveau de la chaîne respiratoire (CR), constituée de cinq complexes enchâssés dans la membrane interne mitochondriale (Fig.5) : le complexe I ou NADH CoQ oxydoréductase, le complexe II ou succinate deshydrogénase, le complexe III ou coenzyme Q cytochrome C oxydoréductase, le complexe IV ou cytochrome C oxydase et le complexe V ou ATPase (Berg et al, 2006).

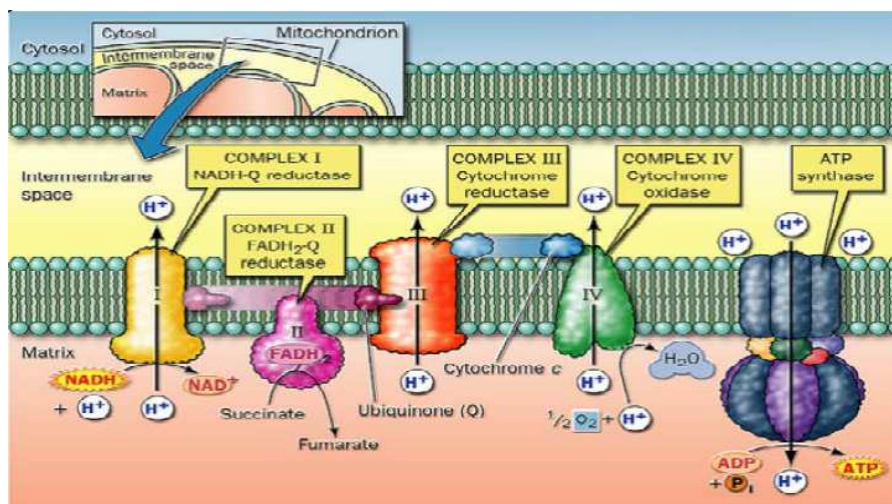


Figure 5 : Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale

2. Pore mitochondrial (mitochondrial permeability transition pore)

Le pore mitochondrial (TP) est une structure multimoléculaire qui permet le transfert du calcium de la matrice mitochondriale vers le cytosol. Le dogme établi depuis plusieurs années à propos de la structure du TP est qu'il résulterait de l'assemblage de trois molécules principales : le canal ionique voltage dépendant (VDAC), l'adénine nucléotide translocase (ANT) et la cyclophiline D (Fig. 6). Le VDAC comporterait deux conductances calciques, l'ANT serait responsable de l'ouverture-fermeture du pore par utilisation d'ATP et la

cyclophiline D aurait un rôle de stabilisation conformationnelle. Mais cette notion a été remise en cause récemment par l'étude de souris knock-out pour ces différents constituants et la nature exacte du TP reste donc à déterminer (Juhaszova et al, 2008).

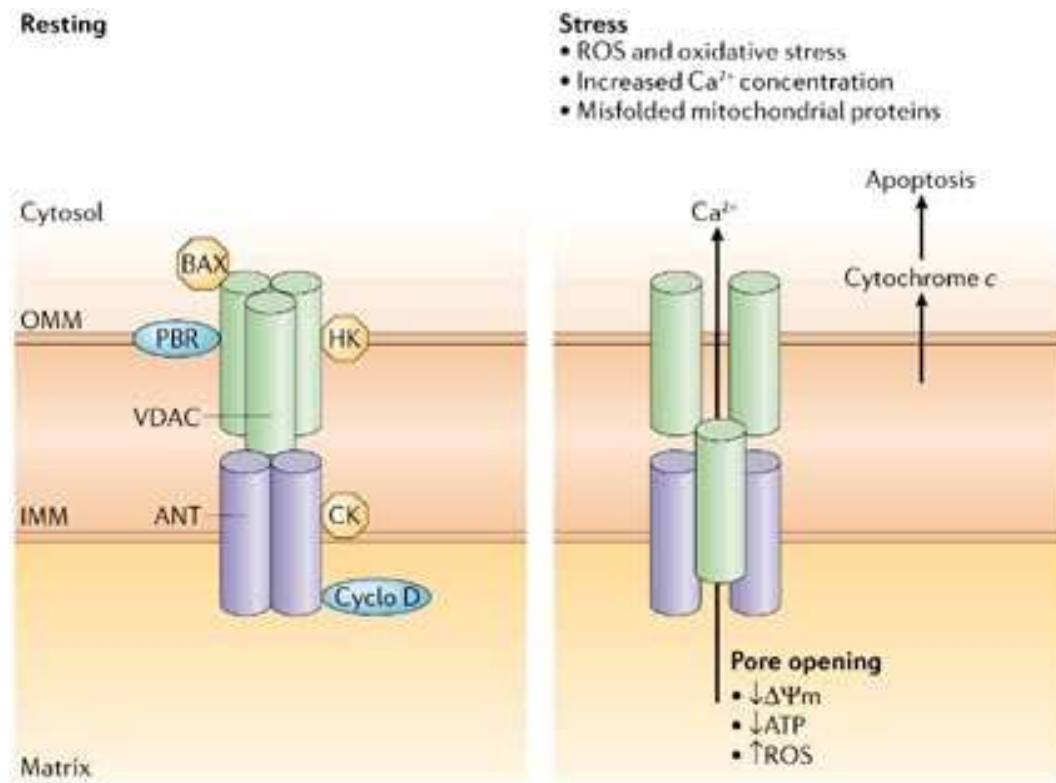


Figure 6 : Schéma du pore mitochondrial (mitochondrial permeability transition pore)

(d'après Abou-Sleiman, 2006)

De nombreuses hypothèses concernant le fonctionnement du TP sont également à confirmer, mais son implication dans la mort cellulaire et le stress oxydatif est aujourd'hui prouvée (Crompton, 1999). Le stress oxydatif secondaire à la diminution du contenu cellulaire en ATP entrainerait le maintien du TP en conformation ouverte (d'où une surcharge calcique cytosolique) et provoquerait la destruction de la membrane externe mitochondriale (d'où la libération du cytochrome C intra mitochondrial). Ces deux phénomènes déclencheraient le

phénomène d'apoptose. La charge calcique entretenant par elle-même l'ouverture du TP, le phénomène deviendrait rapidement irréversible, y compris en cas de restauration du contenu cellulaire en ATP.

3. Voies d'apoptose caspases-dépendante et caspases-indépendante

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus physiologique au cours du développement, mais également observé en pathologie et particulièrement dans les maladies neurodégénératives (Friedlander, 2003). L'apoptose est caractérisée sur le plan morphologique par la formation de corps apoptotiques : le cytoplasme et le noyau se condensent, les mitochondries et la chromatine s'agrègent et l'acide désoxyribonucléique (ADN) est clivé. Deux voies distinctes conduisent à l'apoptose : une voie caspase-dépendante et une voie caspase-indépendante (Fig. 7).

La voie caspase-dépendante peut être activée par différents stimuli : diminution des facteurs neurotrophiques, suractivation des récepteurs glutamatergiques, stress oxydatif, altération de l'ADN. Le stimulus initial active la libération de molécules telles que JNK et p53 qui induisent l'expression et la translocation mitochondriale des facteurs pro apoptotiques Bax et Bak. Le stress oxydatif active également l'ouverture du pore mitochondrial d'où la libération massive de cytochrome C qui se lie à Apaf 1 et à la procaspase 9 pour constituer l'apoptosome. La procaspase 9 est alors clivée en caspase 9 qui active la caspase 3, d'où l'initiation du processus apoptotique (Li, 2008).

La mise en jeu de la voie caspase-indépendante est secondaire à la suractivation des récepteurs glutamatergiques : l'enzyme NAD-dépendante PARP1 est activée et déclenche la libération des molécules pro apoptotiques AIF et endonucléase G depuis la mitochondrie (au lieu du cytochrome C dans la voie caspase-dépendante). AIF se transloque alors dans le noyau et déclenche la fragmentation de l'ADN (Van Loo, 2001 ; Yu, 2003).

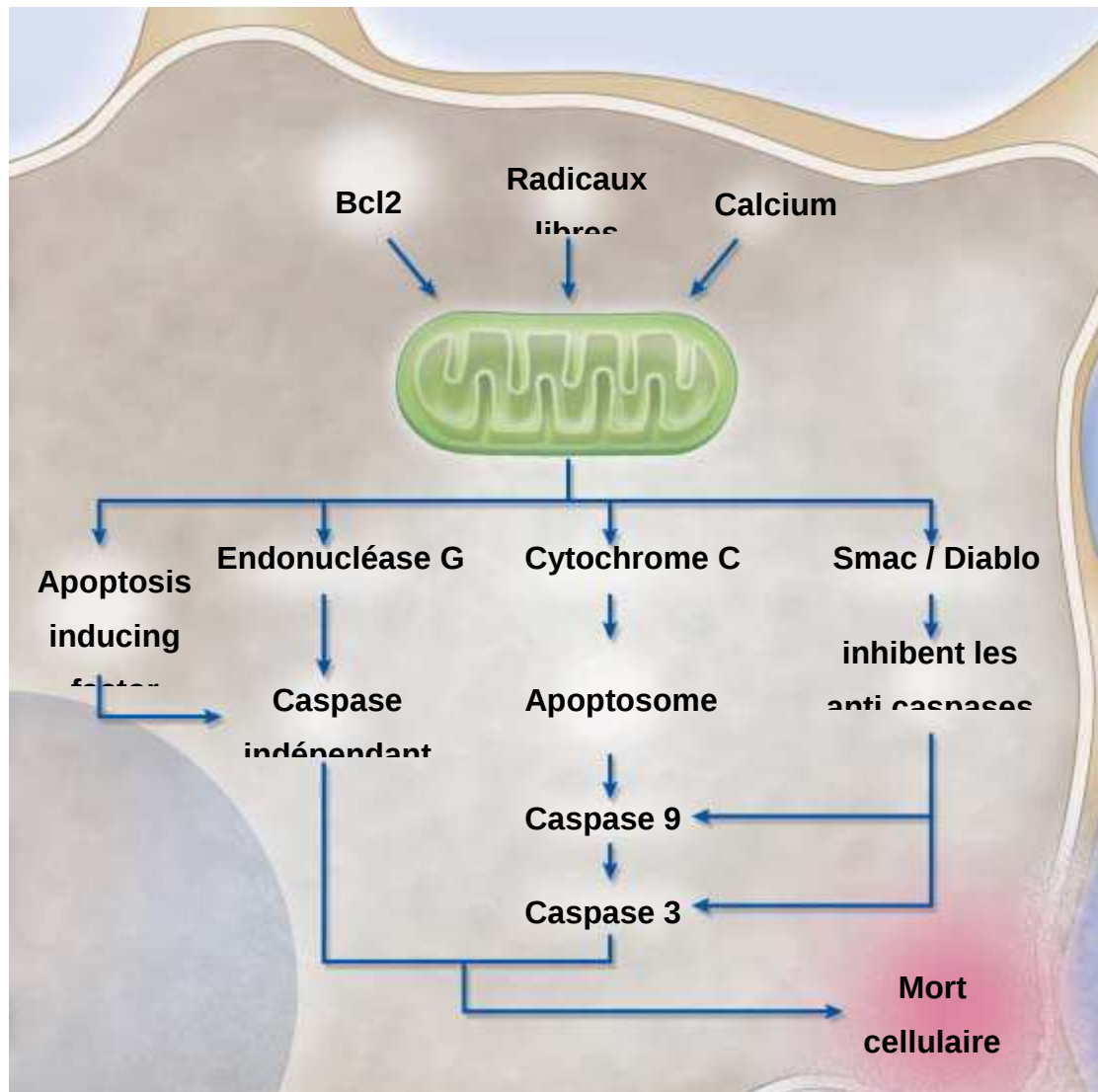


Figure 7 : Apoptose dépendante de la mitochondrie

(d'après Friedlander, 2003)

4. Etapes réversibles de la cascade lésionnelle mitochondriale

Une déficience de la synthèse d'ATP par la CR a pour conséquence une souffrance cellulaire, encore réversible à un stade initial, mais qui va rapidement déclencher l'apoptose par une triple voie : peroxydation lipidique par stress oxydatif, activation de la voie AMP kinase, dérégulation calcique et excitotoxicité par ouverture du pore mitochondrial (Brini, 2003).

L'inhibition de la CR entraîne en premier lieu la genèse d'ion superoxyde qui s'associe au monoxyde d'azote (NO) produit par les cellules microgliales pour constituer le peroxynitrite à

l'origine de la peroxydation lipidique. Le NO est produit après activation de la forme inductible de son enzyme de synthèse nommée NO synthase (Schulz et al. 1997). Le NO stimule par ailleurs la libération de calcium à partir du réticulum endoplasmique et déclenche donc l'ouverture du pore mitochondrial (Jacobson et al, 2002). Enfin les complexes de la CR sont eux-mêmes oxydés d'où une aggravation de la carence énergétique et l'irréversibilité rapide du phénomène (Jacobson et al, 2005).

La défaillance énergétique peut aussi déclencher un phénomène d'apoptose direct médié par la voie de l'AMP kinase. L'AMP kinase est un senseur du statut énergétique cellulaire activé par l'augmentation du rapport AMP/ATP suite à la diminution d'ATP. La phosphorylation de l'AMP kinase permet en cas de stress énergétique de courte durée de bloquer les processus consommateurs d'ATP et d'activer les voies de production d'ATP indépendantes de la mitochondrie pour tenter de normaliser le rapport AMP/ATP. En cas de persistance du manque d'ATP, la libération de facteurs apoptotiques se produit et la cellule entre en apoptose (Shaw et al, 2004).

La carence énergétique entraîne enfin l'apoptose par un phénomène de dérégulation calcique et d'excitotoxicité glutamatergique. La libération du calcium intra mitochondrial dans le cytosol par ouverture du pore mitochondrial est encore réversible au stade immédiat (« immediate Ca^{2+} deregulation »), mais évolue secondairement vers un stade irréversible (« delayed Ca^{2+} deregulation ») (Nicholls et al, 2003). La dépolarisation neuronale partielle par manque d'énergie entraîne par ailleurs une surcharge en glutamate extracellulaire et l'activation des récepteurs NMDA. L'association de ces deux phénomènes pathologiques déclenche le processus d'apoptose.

Ces éléments soulignent l'intrication majeure des différentes voies pathologiques qui mènent toutes à l'apoptose. Les premières étapes de l'ensemble de ces réactions sont supposées réversibles et les axes développés en neuroprotection reposent sur cette réversibilité

potentielle. La lutte conjointe contre l'accumulation de calcium, de glutamate et de NO permettrait ainsi de prévenir les lésions cellulaires consécutives à la défaillance énergétique mitochondriale. La prise en compte de la coexistence des deux types de mort cellulaire caspase-dépendante et caspase-indépendante semble d'autre part nécessaire.

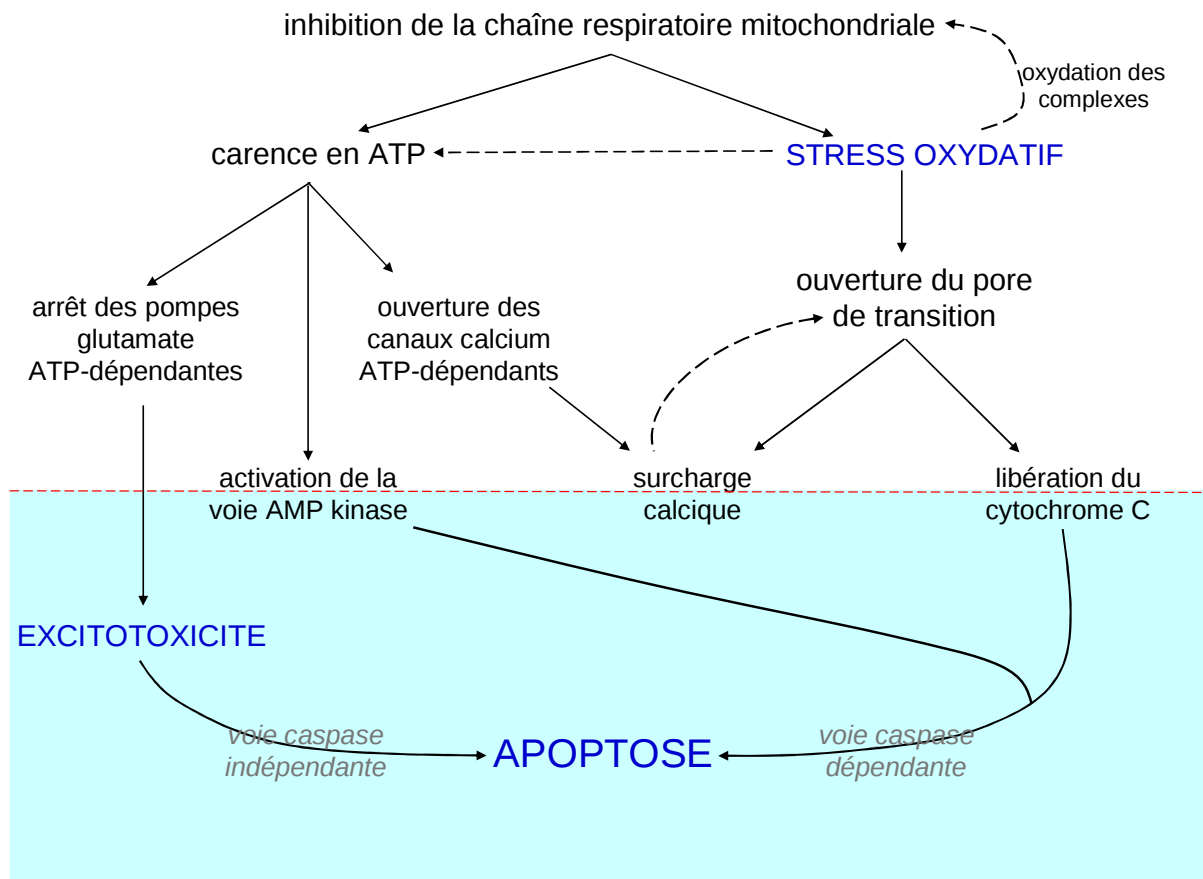


Figure 8 : Cascade lésionnelle mitochondriale

5. Pathologies neuro dégénératives de l'adulte

La dépense énergétique intense des neurones et leur dépendance au glucose explique qu'ils constituent une cible privilégiée en cas de stress métabolique par défaillance de la CR mitochondriale (Beal, 1995). Le SNC est en particulier sensible au stress oxydatif en raison de sa consommation élevée en oxygène, de sa densité en acides gras polyinsaturés

membranaires, de ses capacités anti oxydantes faibles et d'un stock ferreux important dans certaines régions (Rego et Oliveira, 2003).

L'implication d'une défaillance mitochondriale est ainsi établie dans la pathologie des accidents vasculaires cérébraux ou médullaires, des maladies d'Alzheimer, de Parkinson et d'Huntington et de la sclérose latérale amyotrophique (pour revue, Mattson et al, 2008). L'existence d'un splicing alternatif (en faveur des isoformes de plus petite taille) secondaire à la carence en ATP a été récemment démontrée dans un modèle animal de défaillance mitochondriale par intoxication au paraquat (Maracchioni et al, 2007). La survenue des maladies dégénératives à un âge avancé est également expliquée par l'altération du génome mitochondrial : le fonctionnement de la CR mitochondriale diminue, le contenu en calcium intracellulaire augmente (Squier et Bigelow, 2000) et la susceptibilité du pore au calcium est majorée (Mather et Rotenberg, 2000).

Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, plusieurs points attestent de l'altération mitochondriale : le métabolisme énergétique cérébral mesuré par tomographie par émission de positons (TEP) est réduit (Mosconi et al, 2008) et l'activité du complexe III de la CR est diminuée (Maurer et al, 2000). Ces atteintes seraient secondaires à la surcharge en peptide β amyloïde ($A\beta$) qui augmente la production de radicaux libres, diminue la production d'ATP et déclenche un stress calcique chez des neurones en culture (Hashimoto et al, 2003). Le peptide $A\beta$ déclenche également l'apoptose caspase-dépendante (Darios et al, 2005).

Dans le cas de la maladie de Huntington, l'étude de lignées de souris mutantes a permis d'établir que le trafficking des protéines mitochondriales est altéré (Chang et al, 2006) et que les mitochondries se dépolarisent pour une charge calcique moindre (Panov et al, 2002), avec une ouverture du pore par conséquent plus facile (Choo et al, 2004). Enfin les neurones mutants ont une sensibilité augmentée à l'excitotoxicité (Fernandes et al, 2007).

Dans le cas de la maladie de Parkinson, le rôle de la mitochondrie semble central. Une diminution du complexe I de la CR est ainsi présente chez les patients atteints de la forme sporadique de cette maladie (Swerdlow et al, 1996). La surexpression dans des neurones en culture de la protéine α -synucléine (protéine qui entre dans la constitution des corps de Léwy accumulés dans les neurones altérés) majore le stress oxydatif (Hsu et al, 2000) et augmente la vulnérabilité cellulaire à l'apoptose caspase-dépendante (Tanaka et al, 2001). Dans certaines formes de maladie de Parkinson génétique (mutation des gènes parkin et PINK1), l'implication de la mitochondrie est également démontrée. Les souris avec mutation du gène parkin ont ainsi une diminution des complexes I et IV de la CR (Palacino et al, 2004). Les souris knock out pour le gène PINK1 ont des mitochondries de morphologie anormale et dont la dépolarisation est aberrante (Exner et al, 2007).

6. Les encéphalopathies métaboliques et dégénératives de l'enfant

i. Clinique des maladies avec atteinte des NGC chez l'enfant

Une atteinte des NGC est également en cause dans diverses encéphalopathies métaboliques et dégénératives de l'enfant. Parmi celles-ci, on compte des anomalies du métabolisme du fer, du cuivre, des aciduries organiques, des anomalies du cycle de l'urée, différents déficits de la CR mitochondriale et le SL. Ils sont également lésés en cas d'hypoxie-ischémie en période périnatale chez un enfant à terme.

Comme nous l'avons vu antérieurement, les NGC sont impliqués dans le contrôle de la posture et des mouvements du corps et dans les processus cognitifs d'apprentissage. L'atteinte des NGC se traduit en conséquence cliniquement par une atteinte motrice et une régression cérébrale. Le phénotype moteur inclue le plus souvent une dystonie, des mouvements anormaux de type choréo athétosiques ou balliques, une ataxie, une hypotonie axiale avec hypertonie périphérique, un syndrome parkinsonien (Thomas et al, 2004).

L'atteinte spécifique des NGC est également détectable radiologiquement par scanner ou imagerie par résonance magnétique (IRM). Ainsi, dans le cas des maladies neurodégénératives avec accumulation intra cérébrale de fer, la surcharge en fer se traduit par une réduction du signal en séquence IRM T2, T2*, FLAIR et diffusion (Kurian et al, 2008)

ii. Le syndrome de Leigh

Nous nous sommes plus spécifiquement intéressés dans ce travail au SL. Le SL est la maladie mitochondriale la plus fréquente, avec une prévalence estimée de 2,05 enfants pour 10000, tandis que la prévalence des maladies mitochondriales dans leur ensemble est estimée entre 7,5 et 8,7 enfants pour 10000 (Castro-Gago et al, 2006). Ce syndrome a été initialement décrit comme une encéphalomyélite nécrosante subaiguë du nourrisson ou de l'enfant. Ses critères diagnostiques incluent aujourd'hui une atteinte cognitive et motrice progressive avec retard mental, hypotonie, mouvements anormaux, dégénérescence du tronc cérébral (TC) et des NGC et souvent augmentation du taux de lactate dans le sang et/ou dans le liquide céphalo rachidien (Bernier et al, 2002).

Les lésions radiologiques mettent typiquement en évidence des anomalies de signal du TC et des NGC à un stade précoce, suivi d'une nécrose des NGC (Piao et al, 2006, Schiff et al, 2006). Yang et al ont ainsi pratiqué une IRM chez 65 patients avec SL. Cinquante huit soit 90% des sujets avaient des lésions nécrotiques symétriques des NGC, du thalamus et de TC. La nécrose avec perte neuronale a été confirmée par l'autopsie (Yang et al, 2006).

Le SL est secondaire à un déficit de production d'énergie dans la mitochondrie, par déficit en pyruvate deshydrogénase, déficit en pyruvate carboxylase, ou déficit en complexe de la CR. Parmi ces déficits en complexe de la CR, les complexes I et IV (cf. schéma Fig. 5) sont le plus fréquemment atteints (Malfatti et al, 2007, Lebon et al, 2007).

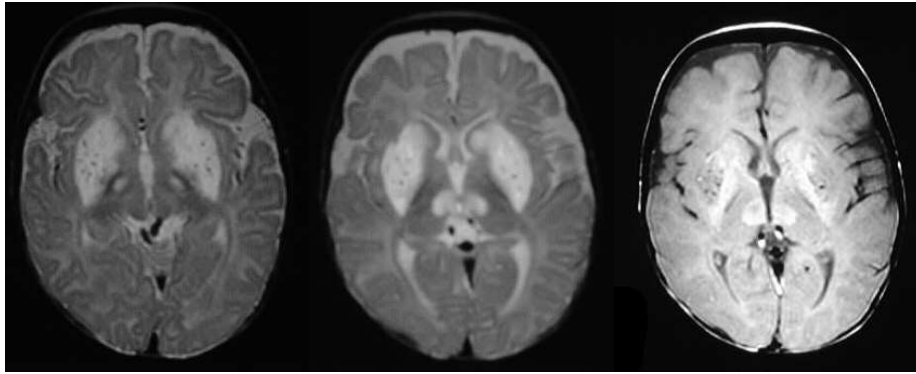


Figure 9: IRM d'un patient présentant un syndrome de Leigh

L'IRM met évidence des anomalies de signal à type d'hyposignal T1 et hypersignal T2 au niveau des putamen, globus pallidus, noyaux caudés et thalamus, sans effet de masse.

Cet aspect est évocateur de syndrome de Leigh mais peut aussi s'observer dans l'acidémie méthylmalonique, la maladie de Wilson, le syndrome d'Hallervorden-Spatz et différentes intoxications (méthanol, CO, cyanure).

iii. Susceptibilité des NGC au cours du développement

Les NGC semblent donc présenter une susceptibilité particulière à la souffrance énergétique d'origine mitochondriale. La défaillance mitochondriale a été prouvée chez l'homme dans différentes maladies avec atteinte des NGC. Dans le cas de l'acidémie méthylmalonique, des dérivés de l'acide méthylmalonique en excès (propionyl-CoEnzyme A, 2-méthylcitrate et malonate en particulier) inhiberaient de manière synergique la CR mitochondriale et le cycle de Krebs et seraient à l'origine des lésions du globus pallidus (Kölker et al, 2003).

La défaillance énergétique mitochondriale constituerait le pivot de ces différentes maladies, mais doit être interprétée en tenant compte des interactions neurones-astrocytes (cf. IIIc), de la maturation du SNC en développement, du terrain génétique et de facteurs environnementaux (Strauss et Morton, 2003).

De multiples éléments interviendraient ainsi potentiellement dans l'altération des NGC et en particulier du striatum et expliquerait l'atteinte âge-dépendante :

1. La demande métabolique cérébrale est élevée (débit sanguin et production d'ATP) et augmente durant les trois premières années de vie, d'où une susceptibilité à la défaillance énergétique.
2. L'expression des récepteurs NMDA est majorée durant le développement cérébral et facilite le déclenchement d'une réaction excitotoxique.
3. Les facteurs pro apoptotiques, tel que Bcl-xL, sont abondamment exprimés afin de permettre la synaptogenèse et contribue à la survenue d'une apoptose en cas de stress cellulaire.
4. L'atteinte conjointe des astrocytes altère le métabolisme du potassium, du glutamate et de la dopamine et entraîne la libération de NO.

Les NGC constituent donc une cible commune aussi bien chez l'adulte durant le vieillissement que chez l'enfant durant le développement. L'établissement d'un modèle de lésion des NGC secondaire à une souffrance énergétique d'origine mitochondriale nous a donc paru justifié.

C. Le MPTP

1. Métabolisme du MPTP

Le tableau constitué lors d'une défaillance de la production énergétique mitochondriale peut être mimé par l'utilisation d'inhibiteurs des complexes mitochondriaux. Il existe au-delà de la susceptibilité globale des NGC une susceptibilité régionale mise en évidence par l'utilisation de différentes toxines. Le MPTP et la roténone (qui inhibent le complexe I) lèsent ainsi les neurones dopaminergiques de la SN, tandis que l'acide malonique ou l'acide 3 nitro-propionique (3NP) (qui inhibent le complexe II) lèsent les neurones épineux du noyau caudé

et du putamen (Bonsi P et al, 2006). Nous avons choisi d'utiliser le MPTP afin de tenter de développer un modèle murin de SL par déficit en complexe I de la CR mitochondriale.

Le MPTP a été isolé à la fin des années 1970 dans un analogue synthétique de l'héroïne après constatation de nombreux cas de syndromes parkinsoniens chez des toxicomanes (Langston et al, 1983). Son utilisation dans des modèles animaux de maladie de Parkinson s'est ensuite généralisée durant les années 1990, avant même que la propriété d'inhibition mitochondriale du MPTP ne soit connue.

Le MPTP administré chez l'animal par voie intra péritonéale (ip) est hautement lipophile et traverse la barrière hémato-encéphalique (BHE) librement. Il est transformé en un premier métabolite nommé MPDP⁺ par action de la MAO-B au niveau des astrocytes, puis le MPDP⁺ est supposé s'auto oxyder en un métabolite actif nommé MPP⁺. Le MPP⁺ est une molécule polaire qui ne peut donc pas diffuser librement au travers des membranes. Le MPP⁺ se lie au DAT pour lequel il présente une haute affinité ce qui explique la sélectivité du MPTP envers les neurones dopaminergiques (Bezard et al, 1999). Le MPP⁺ peut ensuite soit rester dans le cytoplasme et interagir avec différentes enzymes, soit être concentré dans la mitochondrie où il inhibe majoritairement le complexe I de la chaîne respiratoire mais aussi les complexes III et IV (Mizuno et al, 1987).

La cellule nerveuse peut lutter contre l'accumulation du MPP⁺ par deux mécanismes : elle peut le stocker dans des synaptosomes par transfert par le transporteur vésiculaire des monoamines VMAT2 ou le dégrader en un métabolite inactif nommé nor MPTP par action du cytochrome P450 (Upadhya et al, 2001).

2. Influence de l'âge et de la lignée sur la neurotoxicité du MPTP

Il est important de noter que la sensibilité du réseau nigro-strié à la neurotoxicité du MPTP est dépendante de la lignée de souris utilisée et de l'âge des animaux. La sensibilité augmente

progressivement entre 2 et 24 mois pour ensuite se stabiliser. Cette dépendance à l'âge serait liée, selon les auteurs, à l'augmentation contemporaine du taux de MAO-B (Irwin et al, 1992), à une activation microgliale plus marquée chez la souris adulte (Sugama et al, 2003) à une production accrue de radicaux libres (Ali et al, 1994), ou encore à l'accumulation de lésions de l'ADN mitochondrial (Mandavilli et al, 2000).

La lignée de souris la plus couramment utilisée est la C57BL/6J en raison de sa sensibilité au MPTP. Cette susceptibilité serait liée au profil immunologique particulier de cette lignée (profil Th1) avec production de diverses cytokines après intoxication par le MPTP (IL-10, IL-12(p40), IL-13, IFN- γ , MCP-1 and TNF- α). Cette production de cytokines n'est pas retrouvée dans le LCR des souris de la lignée BAL/B peu sensibles au MPTP (Yasuda J et al, 2008). Une activation différentielle de la voie c-Jun/JNK (voie pro apoptotique) serait également en cause : c-Jun serait fortement induit par le MPTP chez les souris C57BL/6J mais pas dans la lignée SW résistante au MPTP (Boyd et al, 2007).

3. Mécanismes d'action du MPTP

Le MPP⁺ exerce son effet neurotoxique selon des modalités multiples aussi bien dans la mitochondrie que dans le cytosol des neurones dopaminergiques. Au niveau de la mitochondrie, le MPP⁺ inhibe majoritairement le complexe I de la chaîne respiratoire, mais aussi les complexes III et IV (Mizuno et al, 1987). Il s'ensuit une déplétion en ATP et la production d'ion superoxyde qui s'associe au NO produit par les cellules microgliales pour constituer du peroxynitrite (Cleeter et al, 1991). Le peroxynitrite détruit les protéines, les lipides et l'ADN. Parmi les protéines altérées, le peroxynitrite inactive la TH par nitration (. L'altération de l'ADN induit la machinerie de réparation dont l'enzyme PARP (poly(ADP-ribose) polymérase) qui aggrave la défaillance mitochondriale par consommation du NAD (Przedborski et al, 2000).

Au niveau cytosolique, le MPTP active la voie NF-KB. NF-KB est une molécule maintenue à l'état quiescent dans le cytoplasme par des protéines inhibitrices de la famille des IKB (inhibitrices de NF-KB). Le MPTP provoque la phosphorylation des IKB qui sont ubiquitinylées et dégradées par le protéasome. Les signaux de localisation nucléaire des sous-unités NF-KB sont ainsi démasqués, le complexe NF-KB libre peut pénétrer dans le noyau, se lier aux sites spécifiques de l'ADN et activer la transcription de gènes codant pour des protéines de l'inflammation ou des facteurs pro apoptotiques (Ghosh et al, 2007)

Le MPTP provoque également l'accumulation de fer dans les neurones dopaminergiques. Le MPTP déclenche la destruction des enzymes de régulation du métabolisme du fer par le protéasome après ubiquitinylisation. Le fer ainsi accumulé se combine aux radicaux libres pour produire des radicaux hydroxyles à fort pouvoir oxydant qui sont impliqués dans la neurodégénérescence du réseau nigro-strié (Youdim, 2003).

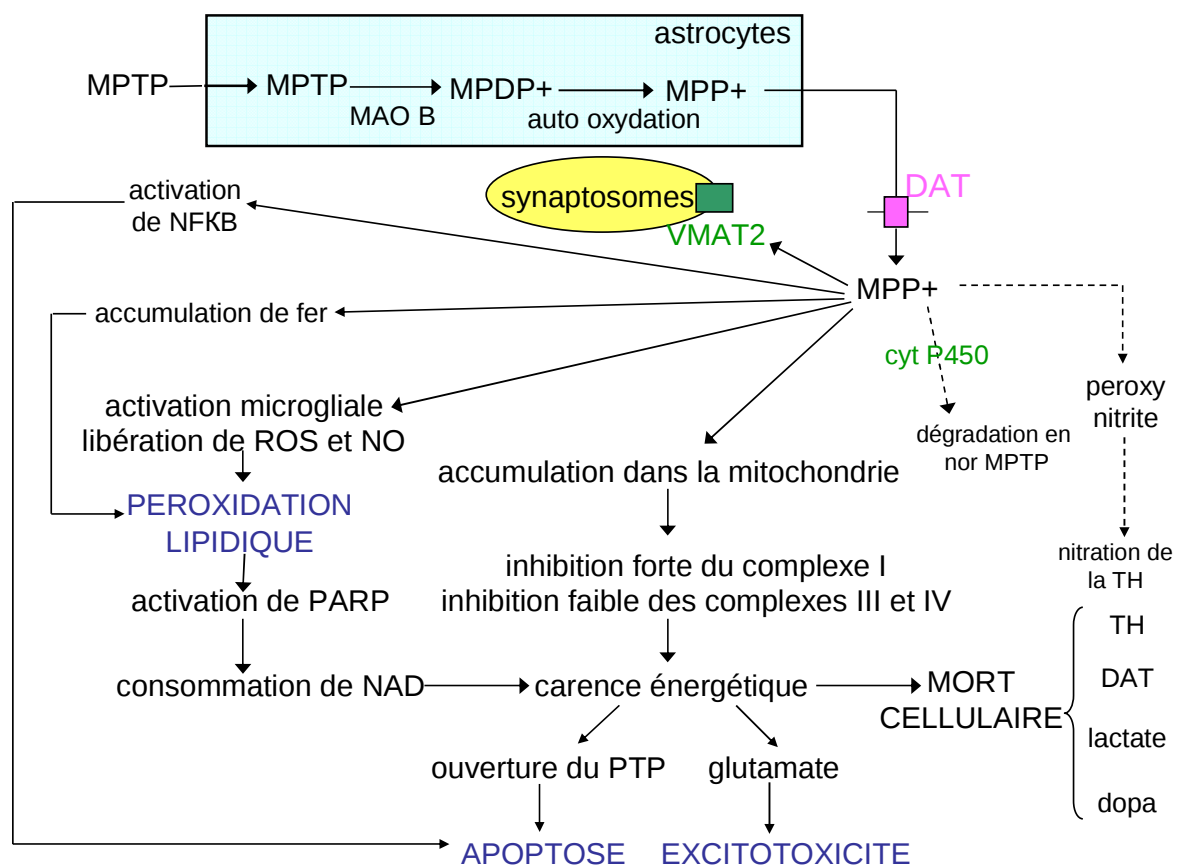


Figure 10 : Mécanismes d'action du MPTP

4. Les modèles d'intoxication par le MPTP

Le MPTP peut être administré selon de multiples paradigmes en fonction des caractéristiques biochimiques et neuropathologiques recherchées. La voie d'administration peut ainsi être orale, sous cutanée, ip, ou stéréotaxique intra striatale. La voie ip est la plus couramment utilisée en raison de la reproductibilité des lésions induites. Le calendrier d'injection peut consister en une unique injection (intoxication aiguë), en 4 injections sur la même journée (intoxication subaiguë), ou en une injection quotidienne durant 5 jours (intoxication chronique). Les intoxications aiguë et subaiguë entraînent une dégénérescence du réseau nigro-strié par mort cellulaire non apoptotique, tandis que l'intoxication chronique déclenche une apoptose prépondérante (Jackson-Lewis et Przedborski, 2007). Il n'existe donc pas un modèle MPTP mais des modèles MPTP développés par les équipes de recherche selon leurs besoins pour étudier les différents aspects de la neurodégénérescence dopaminergique. Nous avons choisi de recourir au modèle MPTP d'intoxication subaiguë afin de valider l'atteinte nigro-striée secondaire à la défaillance énergétique, puis de tester des molécules neuroprotectrices candidates.

D. Propriétés neuroprotectrices éventuelles des antiépileptiques

1. Le concept de neuroprotection

La recherche en neuroprotection concerne actuellement un ensemble de maladies très diverses qui inclue les maladies neurodégénératives citées antérieurement mais aussi l'hypoxie-ischémie périnatale, les accidents vasculaires cérébraux (AVC), les traumatismes crâniocérébraux et rachidiens, la sclérose en plaque et le glaucome (Yenari et al, 2008). Les deux écueils principaux sont l'absence d'efficacité d'une molécule ou l'impossibilité de son utilisation chez l'homme en raison d'effets indésirables. De nombreux cas d'échec en recherche clinique après preuve d'un effet neuroprotecteur chez l'animal sont ainsi connus.

Un des exemples les plus frappants est celui de la recherche de molécules neuroprotectrices en phase aiguë d'AVC. De multiples études précliniques ont établi l'efficacité de différentes classes thérapeutiques (antagonistes glutamatergiques, bloqueurs de canaux ioniques, anti inflammatoires, anti radicaux libres) sans démontrer par la suite d'efficacité clinique (pour revue, Hill, 2007). Dans le cas de l'étude du facteur neurotrophique β FGF, le groupe traité a même présenté un devenir péjoratif par rapport au groupe placebo (Alzheimer et al, 2002).

Il est donc nécessaire de définir précisément la population étudiée, les critères d'étude, la fenêtre thérapeutique et le dosage utilisé. Il convient, enfin, de garder à l'esprit qu'une combinaison de molécules, ou l'utilisation de molécules avec modes d'action pléiotrope peut être préférable afin d'agir sur les différents mécanismes synergiques de mort cellulaire mis en jeu dans la neuro dégénérescence que l'on cherche à prévenir.

2. Recherche de molécules candidates

La recherche de molécules candidates en neuroprotection est essentiellement basée sur les connaissances physiopathologiques apportées par l'étude des modèles animaux des maladies humaines et sur les propriétés pharmacologiques des différentes classes thérapeutiques à disposition. Dans le cas de la défaillance énergétique d'origine mitochondriale, les principales classes de molécules testées avec succès ont été des modulateurs énergétiques (carnitine, créatine, coenzyme Q10, acides gras polyinsaturés (Virmani et al, 2005)), des molécules anti radicaux libres et NO (Grünblatt et al, 2000), des anti inflammatoires (Esposito et al, 2007), des antagonistes glutamatergiques (Mitchell et Carroll, 1997), des agonistes dopaminergiques (Schapira, 2002), des chélateurs du fer (Lan et Jiang, 1997), des inhibiteurs des canaux calciques (Mandel et al, 2003), des composés anti apoptotiques (Eberhardt et Schulz, 2003) et des facteurs neurotrophiques (Nagatsu et Sawada, 2005).

Le choix innovant de tester des antiépileptiques dans notre modèle a reposé sur le fait qu'ils présentent plusieurs caractéristiques pharmacologiques à potentiel neuroprotecteur. En effet, les antiépileptiques inhibent certains canaux ioniques ATP-dépendants. Ils favorisent donc une épargne d'ATP et pourraient ainsi remettre en adéquation les capacités de production d'ATP diminuées en période de stress métabolique avec la consommation énergétique cellulaire. Certains antiépileptiques pourraient également promouvoir un environnement protecteur pour les neurones en raison de leur effet anti glutamatergique, pro GABAergique et stabilisateur de membrane (Czapinski et al, 2005, Urenjak et Obrenovitch, 1998).

Les antiépileptiques présentent par ailleurs une pharmacocinétique et un profil de tolérance très favorable chez l'enfant. Les doses à utiliser pour obtenir des taux plasmatiques efficaces comparables à ceux de l'adulte sont connus (Hwang et al, 2008 ; Toubanc et al, 2008 ; Reimers et al, 2007 ; Tallian et al, 2004 ; French et al, 2003 ; Battino et al, 1997) et les effets indésirables sont peu fréquents à de telles doses (Bootsma et al, 2008 ; Shechter et al, 2005 ; French et al, 2003 ; Vanhatalo et al, 2002 ; Sabers et al, 2000).

3. Pathologies pour lesquelles un effet neuroprotecteur des AE est connu

Les pathologies pour lesquelles les antiépileptiques ont prouvé un effet en dehors du champ de l'épileptologie lui-même sont multiples et incluent principalement des maladies neuropsychiatriques telles que la migraine (Frediani, 2004), les douleurs neuropathiques (Eisenberg, 2007), le tremblement essentiel (Frima et Grünwald, 2006), l'ischémie cérébrale (Hanon et Klitgaard, 2001), le trouble bipolaire (Weisler et al, 2006), la schizophrénie (Hosak et Libiger, 2002) ou encore l'anxiété (Johanessen Landmark, 2008).

4. Mécanismes connus de neuroprotection par les antiépileptiques

Les mécanismes par lesquels les antiépileptiques exerceraient leur effet neuroprotecteur sont multiples :

- Effet anti canaux ioniques ATP dépendants : phénytoïne et riluzole (Ates et al, 2007), carbamazépine et topiramate (Costa et al, 2006), lamotrigine (Kapoor, 2008), valproate de sodium (Ragsdale et Avoli, 1998)
- Effet anti radicalaire : valproate de sodium (Wang et al, 2003), lamotrigine (Papazisis et al, 2008), gabapentine (Baydas et al, 2005)
- Effet anti excitotoxique (anti glutamatergique et pro GABAergique) : topiramate (Sfaello et al, 2005), valproate de sodium (Feng et al, 2008), felbamate (Palmer, 2001), tiagabine (Yang et al, 2000)
- Effet anti apoptotique : valproate de sodium (Kim et al, 2005)
- Effet pro neurogenèse : carbamazépine et lamotrigine (Chang et al, 2008)

Certaines voies potentiellement neuroprotectrices (effet anti inflammatoire et effet anti chélation du fer) ne semblent pas en revanche mises en jeu par les antiépileptiques.

5. Critères de choix des antiépileptiques utilisés dans le modèle MPTP

Parmi les 19 antiépileptiques commercialisés actuellement, l'exclusion de plusieurs molécules a été justifiée en raison d'interaction pharmacologiques avec le MPTP. Les antiépileptiques qui inhibent la MAO-B (tel que la phénytoïne par exemple) ou induisent le cytochrome P450 (tel que le phénobarbital par exemple) diminuent en effet la neurotoxicité du MPTP par diminution de son métabolite actif le MPP⁺ et semblent de ce fait faussement neuroprotecteurs. Nous avons donc finalement testé 7 antiépileptiques couramment utilisés : lamotrigine (Lamictal®), lévétiracétam (Keppra®), gabapentine (Neurontin®), prégabaline (Lyrica®), tiagabine (Gabitril®), clonazépam (Rivotril®), vigabatrin (Sabril®).

Anti-épileptiques	Classe / Mécanisme d'action
Lévétiracétam (Keppra®)	Probable action sur le relargage des neurotransmetteurs
Vigabatrin (Sabril®)	Gabamimétique indirect
Gabapentine (Neurontin®)	- Gabamimétique indirect - Action sur les canaux calcium voltage-dépendants
Prégabaline (Lyrica®)	- Gabamimétique indirect - Action sur les canaux calcium voltage-dépendants
Tiagabine (Gabitril®)	Gabamimétique indirect
Clonazépam (Rivotril®)	Benzodiazépines (gabamimétique direct)
Lamotrigine (Lamictal®)	Inhibiteur des canaux sodium voltage-dépendants

Tableau 1 : Mode d'action des antiépileptiques

II. RESULTATS EXPERIMENTAUX

A. Présentation des articles

Au terme de la synthèse bibliographique de ce travail, nous pouvons donc formuler deux séries de constatations issues des données de la littérature :

1) La première série de constatations concerne la susceptibilité particulière des NGC et plus spécifiquement du réseau nigro-strié : Le réseau nigro-strié est lésé dans de nombreuses encéphalopathies métaboliques et dégénératives de l'enfant bien que ces affections soient d'origine très diverses : anomalies du métabolisme du fer (maladie d'Hallervorden-Spatz, maladie de Friedreich), du cuivre (maladie de Wilson, maladie de Menkes), aciduries organiques (acidémie méthylmalonique, propionique, glutarique, isovalérique), anomalies du cycle de l'urée, déficits de la CR mitochondriale ou encore hypoxie-ischémie en période périnatale chez un enfant à terme. Cette susceptibilité serait expliquée par les étapes physiopathologique communes décrites au cours de ces maladies, avec comme acteur central la mitochondrie. En effet, l'implication de la mitochondrie et du métabolisme énergétique dans les pathologies neurodégénératives est aujourd'hui parfaitement établie tant chez l'adulte que chez l'enfant. Une défaillance de la production d'ATP au sein de la CR mitochondriale déclenche en effet une cascade de réactions pathologiques qui incluent le stress oxydatif, l'excitotoxicité glutamatergique et la dérégulation calcique et se concluent par la mort neuronale par apoptose, comme nous l'avons détaillé dans la partie introductive.

Ces éléments nous ont conduits à formuler l'hypothèse selon laquelle l'utilisation d'un toxique de la CR mitochondriale permettrait de développer un modèle de dégénérescence du réseau nigro-strié par stress énergétique et plus spécifiquement un modèle de SL. Comme nous l'avons vu, le SL constitue en effet l'affection mitochondriale la plus fréquente de ce groupe chez l'enfant. La caractérisation d'un modèle animal de SL nous semblait donc utile afin de pouvoir tester ensuite l'efficacité de diverses stratégies de neuroprotection. Ce modèle

est innovant dans la mesure où les principaux modèles animaux d'altération mitochondriale actuellement utilisés sont i) soit des modèles génétiques nécessitant la mise en œuvre de techniques lourdes et spécifiques (Ohsawa et al, 2008) ii) soit des modèles nécessitant l'utilisation de primates (Eslamboli, 2005) iii) soit des modèles plus éloignés de la pratique clinique qu'un modèle murin tel que par exemple des modèles de levures (Braungart et al, 2004). La validation de notre modèle fait l'objet de l'article 1.

2) La deuxième série de constatations concerne le domaine de la neuroprotection :

La découverte du rôle central de la mitochondrie dans les phénomènes neuro dégénératifs a conduit à l'émergence du concept de « neuroprotection énergétique ». Comme nous l'avons vu, de nombreuses classes médicamenteuses ont ainsi été testées en se basant sur diverses propriétés pharmacologiques. Une molécule est potentiellement neuroprotectrice si elle peut limiter ou bloquer une voie délétère (peroxydation lipidique, excitotoxicité glutamatergique, afflux calcique) ou inhiber la nécrose et/ou l'apoptose qui en découlent. De nombreux composés ont ainsi prouvé leur efficacité in vitro, mais se sont souvent avérés inefficaces ou mal tolérés une fois transposés chez l'homme. Les écueils semblent être :

- Le caractère rapidement irréversible des lésions, une action trop en aval ne permettant ainsi pas de bloquer l'évolution vers l'apoptose.
- La coexistence de plusieurs cascades pathologiques et de différents types de mort cellulaire (caspase dépendante et indépendante) qui impliquent l'utilisation de molécules à modes d'action multiples.
- Les problèmes de tolérance.

Nous avons donc émis l'hypothèse que l'utilisation de telles molécules pléiotropes pourrait avoir un meilleur potentiel neuroprotecteur. Ainsi, nous avons choisi de retenir la classe des antiépileptiques capables de fournir simultanément des propriétés anti excitotoxiques et pro

GABAergique et surtout d'inhiber les canaux ioniques ATP dépendants. Cette dernière propriété pourrait donc permettre de remettre en adéquation la consommation énergétique de cellules soumises à un stress mitochondrial avec leurs capacités de production transitoirement limitées d'ATP.

Nous avons testé plusieurs antiépileptiques dans le modèle MPTP. Les molécules testées présentent un profil de tolérance très favorable chez l'enfant et le nourrisson. Parmi les différentes molécules testées, seule la lamotrigine a prouvé un effet neuroprotecteur. L'étude de cet effet neuroprotecteur de la lamotrigine dans notre modèle de SL chez l'animal fait l'objet de l'article 2.

Deux autres publications sont actuellement en cours de soumission et de préparation. La première concerne la comparaison de l'effet neuroprotecteur de l'ensemble des antiépileptiques compatibles sur le plan pharmacologique avec le modèle MPTP chez la souris. La seconde porte sur l'évaluation de l'état énergétique des NGC chez des souris témoins et intoxiquées par le MPTP par étude de l'expression du transporteur du glucose du glucose de type 1 et des transporteurs du phosphate inorganique de type 1 et 2. Le glucose constitue en effet le nutriment principal du cerveau et le phosphate entre dans la constitution des composés à haute énergie tels que l'ATP. L'étude de l'expression de leur transporteur permet donc d'avoir un reflet de l'utilisation intracellulaire de ces nutriments et donc du métabolisme énergétique cellulaire en particulier dans les NGC après inhibition de la chaîne respiratoire.

B. Articles publiés et/ou sous presse :

1. Article 1: *MPTP intoxication in mice: a useful model of Leigh syndrome to study mitochondrial diseases in childhood. **Metabolic Brain Disease**, 2009.*

Cette première publication est issue de notre travail concernant la susceptibilité des NGC et plus particulièrement du réseau nigro-strié au stress énergétique. Notre intérêt pour les NGC découle de deux éléments : 1) les NGC intègrent de multiples données sensorielles, motrices et cognitives d'origine corticale et jouent ainsi un rôle neurologique majeur 2) les NGC constituent une cible commune altérée dans de nombreuses encéphalopathies métaboliques et dégénératives de l'enfant bien que ces affections soient d'origine très diverses.

Nous avons souhaité dans un premier temps valider l'hypothèse selon laquelle une défaillance énergétique serait à l'origine de l'atteinte du réseau nigro-strié, dans le but de générer par la suite un modèle d'altération des NGC par intoxication mitochondriale. Des données de la littérature commençaient en effet à l'époque à attribuer un rôle central à la mitochondrie au sein des différents effecteurs de la neuro dégénérescence (Murphy, 1999 ; Cassarino, 1999, Schapira, 1998).

Nous avons utilisé le toxique mitochondrial MPTP utilisé depuis plus de deux décennies comme modèle de maladie de Parkinson et ceci avant même que son effet d'inhibition de la mitochondrie ne soit établi. Nous avons dans un premier temps vérifié l'inhibition du complexe I et recherché une augmentation du taux de lactate après MPTP. Nous avons étudié les lésions du réseau nigro strié par étude de la TH (qui est l'enzyme limitante de synthèse de la dopamine), par marquage autoradiographique du DAT et par dosage de la dopamine et de ses catabolites par chromatographie (HPLC).

Nous avons ainsi confirmé que le MPTP inhibe le complexe I et entraîne une augmentation du taux de lactate plasmatique chez la souris au stade P35 (35^{ème} jour post natal), ce qui

correspond à l'adolescence chez l'homme. Nous avons ensuite caractérisé les lésions du réseau nigro strié par les trois marqueurs sus cités. L'association d'une diminution du nombre de corps cellulaires dopaminergiques dans la SN, d'une diminution du DAT dans le striatum et d'une réduction du contenu striatal en dopamine nous a permis d'établir que le stress énergétique consécutif à une inhibition du complexe I de la CR par le MPTP entraîne une dégénérescence du réseau nigro-strié chez la souris.

Ce modèle présente les intérêts majeurs d'être facile à produire, reproductible et de fournir un outil pour la recherche de molécules neuroprotectrices. La roténone lèse également le réseau nigro-strié par inhibition du complexe I, mais l'utilisation du MPTP nous semble à privilégier car le MPTP entraîne un stress énergétique plus marqué à doses comparables (Schmidt et Alam, 2006).

Certaines limites du modèle doivent malgré tout être évoquées :

- Le phénotype comportemental spécifique des souris MPTP (avec en particulier des déficits d'exploration de l'environnement) n'est pas détectable sans mettre en œuvre de tests de comportement.
- Le MPTP est métabolisé en MPP⁺ par la MAO-B. Le modèle MPTP n'est donc utilisable que chez la souris à plus de P28 environ, ce qui correspond au début de la deuxième décennie chez l'homme. Ce modèle n'est donc pas adapté à l'étude du nourrisson et du jeune enfant.

Au total, cette première série d'expérimentations a permis de valider l'utilisation du modèle MPTP chez la souris comme modèle de dégénérescence du réseau nigro-strié d'origine mitochondriale et plus spécifiquement de SL. Ce pré requis nous a par la suite permis d'évaluer le potentiel neuroprotecteur de plusieurs molécules.

MPTP INTOXICATION IN MICE: A USEFUL MODEL OF LEIGH SYNDROME TO STUDY MITOCHONDRIAL DISEASES IN CHILDHOOD

Running head: MPTP INTOXICATION IN MICE: A LEIGH SYNDROME MODEL

E. Lagrue^{1,2,3}; B. Abert^{1,3}; L. Nadal^{1,2,3}; L. Tabone^{1,3}; S. Bodard¹; F. Medja⁴; A. Lombes⁴;

S. Chalon^{1,2}; P. Castelnau^{1,2,3*}

¹ UMRS INSERM U 930, CNRS ERL 3106, Imagerie et cerveau », Tours, France

² Université François Rabelais de Tours, Tours, France

³ CHRU de Tours, Pôle de Pédiatrie, Hôpital Clocheville, Tours, France

⁴ INSERM, U582, Paris, France

*** Corresponding author:**

Pr Pierre Castelnau, MD, PhD

Neuropédiatrie et UMRS 930 CNRS ERL 3106 « Imagerie et cerveau »

Laboratoire de Biophysique Médicale et Pharmaceutique

31 Avenue Monge, 37200 Tours, France

Phone: +33-(0)2 47367243

Fax: +33-(0)2 47367224

E-mail: castelnau@med.univ-tours.fr

ABSTRACT:

The basal ganglia, which are interconnected in the striato-nigral dopaminergic network, are affected in several childhood diseases including Leigh syndrome (LS). LS is the most common mitochondrial disorder affecting children and usually arise from inhibition of the respiratory chain. This vulnerability is attributed to a particular susceptibility to energetic stress, with mitochondrial inhibition as a common pathogenic pathway. In this study we developed a LS model for neuroprotection trials in mice by using the complex I inhibitor MPTP.

We first verified that MPTP significantly inhibits the mitochondrial complex I in the brain ($p = 0.018$). This model also reproduced the biochemical and pathological features of LS: MPTP increased plasmatic lactate levels ($p = 0.023$) and triggered basal ganglia degeneration, as evaluated through dopamine transporter (DAT) autoradiography, tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemistry, and dopamine dosage. Striatal DAT levels were markedly decreased after MPTP treatment ($p = 0.003$). TH immunoreactivity was reduced in the striatum and substantia nigra ($p = 0.005$), and striatal dopamine was significantly reduced ($p < 0.01$). Taken together, these results confirm that acute MPTP intoxication in young mice provides a reproducible pharmacological paradigm of LS, thus opening new avenues for neuroprotection research.

KEY WORDS: basal ganglia, mitochondria, MPTP, Leigh syndrome, neuroprotection, mouse

INTRODUCTION

The basal ganglia mainly refer to the striatum (i.e., caudate nucleus and putamen), the globus pallidus, the nucleus accumbens, the sub-thalamic nucleus and the substantia nigra (SN). These nuclei are tightly interconnected and share a complex overlay of functions and regulations. They process informations from several cortical regions and are responsible for motor, sensory, and cognitive functions (Liss and Roeper, 2004).

Clinical and experimental evidences have shown that the basal ganglia represent vulnerable structures among the brain, especially during pre- and postnatal brain development (Marti et al, 1997, Klawitter et al, 2007). More specifically, a partial or total destruction of the striato-nigral dopaminergic network is found in several conditions occurring in childhood such as hypoxic-ischemic encephalopathy (Rutherford et al, 2005), iron metabolism disorders (Hartig et al, 2006), organic acidurias (Okun et al, 2002) and several forms of mitochondrial diseases (Di Filippo et al, 2006; Byrne, 2002). This vulnerability seems to be due to a particular susceptibility to energetic stress (Beal, 2000; Byrne, 2002). Mitochondrial inhibition appears to be a common pathogenic pathway in several basal ganglia diseases including Leigh syndrome (LS) (Mandemakers et al, 2007; Sas et al, 2007).

LS was originally described as a sub-acute necrotizing encephalopathy which affects infants and young children (OMIM #256000). The estimated prevalence of LS is 2.05 children per 10 000, while the estimated prevalence for all mitochondrial respiratory chain disorders is 7.5 – 8.7 per 10 000 (Castro-Gago et al, 2006). Therefore, LS represents one of the most frequent mitochondrial disorders in childhood. Children suffering from mitochondrial diseases, including LS, exhibit a high mortality rate (45% death before 20 years of age), and the age at onset appears to be the strongest predictor (Debray et al, 2007, Mercier et al, submitted). LS diagnostic criteria include a progressive neurological disease with motor and intellectual developmental delay, hypotonia, movement disorders, brainstem and/or basal ganglia

degeneration and often increased lactate levels in blood and/or cerebrospinal fluid (CSF) (Bernier et al, 2002). Besides these biochemical markers, little is known about the cerebral metabolic modifications which occur in LS.

Radiological evaluation can be performed in the young patients through MRI and typically characterizes signal abnormalities in the basal ganglia and brainstem at an early stage later followed by basal ganglia necrosis (Piao YS et al, 2006, Schiff et al, 2006). Yang et al performed MRI in 65 patients suffering from LS. Fifty-eight patients (90%) had typical symmetrical necrotizing lesions within the basal ganglia, thalamus, and brain stem. At autopsy, the basal ganglia degeneration includes multiple symmetrical foci of necrosis and a loss of neurons (Yang et al, 2006).

LS always arises from a deficiency in energy production in the mitochondria, secondary to an alteration or deficiency of the pyruvate deshydrogenase complex, the pyruvate carboxylase, or the respiratory chain complex. Deficiency of the respiratory chain complex are frequently due to mutations in genes coding for proteins of the mitochondrial respiratory chain complex I or IV (Malfatti et al, 2007; Lebon et al, 2007, Mercier et al, submitted). Either mitochondrial mutants (Wallace, 2002; Qi et al, 2004) or mitochondrial inhibitors (e.g., 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine [MPTP], rotenone) (Ramachandiran et al, 2007) can be used to experimentally generate complex I deficiency in mice. These toxins might provide a way to obtain an animal model of LS without genetic manipulation. Such LS model could help to clarify the basal ganglia particular susceptibility to energetic stress, which seems to constitute a core step in several pediatric and adult neurological diseases. Elucidating these vulnerability pathways is mandatory to further develop neuroprotective strategies.

Among all complex I inhibitors, we chose to use MPTP which toxicity has already been studied in mice and monkeys (Przedborski et al, 2000). Indeed, MPTP provides a model of Parkinson's disease and recapitulates some of its pathophysiological steps. In the present

study, we did not try to further characterize this Parkinson's disease model. We rather used MPTP for its ability to induce a mitochondrial stress. We aimed to demonstrate that this mitochondrial toxin could represent a tool to generate a reliable mouse model of LS.

Thus, we first studied the effect of MPTP intoxication on complex I and lactate metabolism. Then, we analysed the basal ganglia lesions through a characterisation of the nigro striatal nuclei using validated specific markers.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All experiments were performed on consanguineous male C57/Bl6N@Rj mice (5 weeks old, average weight: 19 ± 1 g, CERJ, France) with 6 mice per group. This strain is highly susceptible to MPTP neurotoxicity. All mice experiments were carried out in compliance with appropriate European Community Commission directive guidelines (86/609/EEC). The mice were kept under environmentally controlled conditions (room temperature (RT) = $23 \pm 1^\circ\text{C}$, humidity = $40.3 \pm 7.1\%$) on a 12-hour light/dark cycle with food and water *ad libitum*.

MPTP intoxication

The mice (n = 6 per group) were intoxicated with 4 administrations of MPTP (12.5 mg/kg) intraperitoneal (ip) at 1-hour intervals on a single day. MPTP (Sigma, France) was dissolved in 0.9% sodium chloride to a final concentration of 2.5 mg/mL (100 μL injection per 20 g body weight). The control mice (n = 6 per group) were injected 4 times with saline.

Mitochondrial respiratory complexes activity assays

For mitochondrial respiratory complexes activity assays, the mice were sacrificed by cervical dislocation 6 hours after the last MPTP injection. The two striata from the same animal were

dissected, pooled and homogenized in a Potter homogenizer in 9 volumes of MAN buffer (pH 7.2, 225 mM mannitol, 75 mM saccharose, 10 mM TrisHCl, 0.1 mM EDTA). The homogenate was centrifuged for 10 minutes at 650 x *g* and 4°C, and the resulting supernatant fraction was adjusted to a 1 mg/mL protein concentration.

For the assay of complex I (NADH ubiquinone oxidoreductase) activity, each sample (40 µg protein) was incubated with 100 µM decylubiquinone, 50 mM sodium phosphate (pH 7.5), and 3.75 mg/mL BSA. The reaction was triggered with 100 µM NADH. The NADH reduction rate was measured during 2 minutes, with and without rotenone, in order to subtract the non-specific rotenone activity.

For the assay of complex IV (cytochrome C oxidase) activity, each sample (10 µg protein) was added to 50 mM potassium phosphate (pH 7). The reaction was triggered with 80 µM cytochrome C. The cytochrome C oxidation rate was measured during 2 minutes.

All the results are expressed as nM/min/mg protein (mean ± SEM).

Lactate dosage

For lactate level measurements, mice were sacrificed by cervical dislocation and their blood immediately collected through trans-cardiac puncture. Each sample (500 µL) was analysed through spectroscopy magnetic resonance imaging. The results are expressed as mM (mean ± SEM). CSF collection is not routinely performed in the mouse and was not performed in this study.

Basal ganglia lesions evaluation

We evaluated the basal ganglia lesions through DAT, TH and DA. These markers constitute early and reliable indicators of the functional alteration secondary to the energetic impairment observed after MPTP intoxication (Cleren, 2008; Himeda, 2006).

1) Dopamine transporter autoradiographic studies

For dopamine transporter (DAT) autoradiographies, mice were sacrificed by cervical dislocation 7 days after MPTP intoxication. The brains were rapidly removed and frozen in isopentane (-35°C). Twenty-micron coronal sections were cut with a cryostat microtome (Reichert-Jung Cryocut CM3000 Leica, France), collected on gelatine-coated slides, and stored at -80°C.

For binding studies, 3 sections per animal were incubated for 90 minutes at RT with a pH 7.4 phosphate buffer (100 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.76 mM KH₂PO₄, 0.32 M sucrose) containing the radio ligand [¹²⁵I]PE2I (100 pM) as previously described (Chalon et al, 1999). Non-specific binding was assessed on adjacent sections with the same buffer containing 1 µM cocaine (Cooper, France) and subtracted from total binding to yield specific binding in each sample. After rinsing and drying, the sections were exposed to sensitive films (Biomax MR, Kodak, France) with standard radioactive scales (¹²⁵I-microscales, Amersham Bioscience AB, UK) for 1 day. The films were analyzed through an image analyzer (Betavision, Biospace Instruments, France) after identifying the substantia nigra pars compacta (SNpc) and striatum areas. The absorbance obtained was converted into apparent tissue ligand concentrations using the radioactive standards and the specific activity of the radioligand (74 TBq/mM). The intensity of [¹²⁵I]PE2I binding was expressed in nCi/mg (1 nCi = 37 Bq) of tissue equivalent (mean ± SD).

2) Tyrosine hydroxylase immunostaining

For tyrosine hydroxylase (TH) immunostaining, the mice were sacrificed by cervical dislocation 7 days after MPTP intoxication. The brains were removed, post-fixed in 4% paraformaldehyde (3 days, RT), embedded in paraffin, cut into serial coronal sections (16 µm) and coated onto Super Frost slides (VWR, Batavia, USA).

After paraffin removal and rehydration, the sections were heated in a microwave oven (for 1 minute at 750 W and then for 9 minutes at 300 W) and cooled at RT during 15 minutes. Endogenous peroxidases were blocked with hydrogen peroxide. Slides were first incubated with a rabbit polyclonal anti-TH antibody (Pel Freeze, USA) diluted at 1:500 for 3 hours at RT, then with a biotinylated goat anti rabbit for 1 hour at RT, and last with an avidin-biotin complex (Vector Laboratory, Burlingame, USA) for 30 minutes at RT. The staining was revealed with diaminobenzidine (Sigma, France) for 5 minutes. Control staining was performed by omitting the primary antibody. The optic density was expressed as mean $\pm$ SD in arbitrary unit (AU). Dopaminergic neurons were counted on four sections per animal with an optical microscope (x20; Leica, France) coupled to an image analyzer (Histolab, Microvision Instruments, France). The neurons were counted in the SNpc, excluding the ventral tegmental area, according to the Paxinos and Watson atlas (Plate 56, interaural 0.72 mm, bregma -3.08 mm) (Paxinos and Franklin, 2003). The number of TH neurons is expressed as the total number of neurons $\pm$ SD.

3) Dopamine (DA) content measurement

The two striata dissected from the same animal were pooled and sonicated with 750 μ L ice-cold (0.12 M perchloric acid, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM Na₂S₂O₅). The homogenate was centrifuged for 20 minutes at 16 000 $\times g$ (at 4 °C). The supernatant fraction (25 μ L) was injected onto a Beckman System Gold Carat HPLC (Beckman-Coulter, Fullerton, Calif). The biogenic amines were separated on an ultrasphere, ion pair, C18 reverse phase analytical column (LC-22C, BAS, West Lafayette, USA). Electrode detection was performed at +0.74 V, using an electrochemical detector (Concorde, Waters, France). The mobile phase contained 20 mM citric acid, 10 mM Na₂HPO₄, 3.25 mM heptane sulfonic acid, 3 mM octane sulfonic acid, 0.1 mM EDTA, 2 mM KCl, 0.2 % diethylamine, 0.6 % phosphoric acid, 7 % acetonitrile, 3 %

methanol. In each sample, total proteins were evaluated in the pellet with spectrophotometry using the Bradford assay (Bradford et al, 1976). The results are expressed as mean $\pm$ SD in nM DA per mg protein.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the Mann-Whitney test for monoamine quantification, DAT autoradiographic studies, and TH immunohistochemistry and with a Student t-test for mitochondrial complex activity assays and plasma lactate level measurements. Statistical significance was considered for $p < 0.05$.

RESULTS

In vivo complex I and IV activity

Complex I and complex IV activities were evaluated in the striatum of both control and MPTP-treated mice through spectrophotometry. Complex I activity was significantly decreased ($p = 0.018$) in the MPTP group (50.125 ± 5.31 nM/min/mg protein) compared with the control group (70.25 ± 3.08 nM/min/mg protein). In comparison, complex IV activity was not modified in the MPTP group (809 ± 70 nM/min/mg protein) compared with the control group (725 ± 160 nM/min/mg protein). Results for complex I activity are shown in Figure 1.

Plasma lactate level measurements

MPTP intoxication induced a significant rise in plasma lactate levels in the mice. The mean plasma lactate levels were 10.9 ± 1.13 mM/L in the control group and 14.76 ± 1.3 mM/L in the MPTP group ($p = 0.023$). These results are shown in Figure 2.

Basal ganglia lesions evaluation

The basal ganglia alterations were evaluated through 3 specific markers in the striatum and the SN: DAT, TH, and DA.

The DAT density in the striatum, evaluated with the specific radio-labelled ligand [¹²⁵I]PE2I, significantly decreased to 7.23 ± 1.01 nCi/mg in the MPTP group compared with 14.11 ± 1.51 nCi/mg in the control group ($p = 0.008$). Such reduction in the striatum was not found in the SNpc (control group: 1.86 ± 0.31 nCi/mg; MPTP group: 1.89 ± 0.26 nCi/mg). These results are shown in Figure 3.

The TH immunoreactivity was analyzed by optical density measurement in the striatum and the SNpc, and subsequently confirmed in the SNpc by counting dopaminergic neurons. In the striatum, TH immunoreactivity was significantly reduced in the MPTP group (91 ± 21 AU) compared with the control group (164 ± 42 AU) ($p = 0.005$).

TH immunostaining in the SNpc was statistically different between the MPTP group (68 ± 16 AU) and the control group (112 ± 20 AU, $p = 0.005$). The neuron count in the SNpc confirmed the optical density measurements: the number of TH-positive neurons in the MPTP group (26 ± 3) was significantly lower than in the control group (65 ± 9 , $p = 0.005$). These results are shown in Figure 4.

We finally evaluated the DA content in the striatum. MPTP intoxication caused a significant reduction in striatal DA content, (MPTP-intoxicated mice: 12.09 ± 2.2 nM/mg protein; control mice: 20.69 ± 4.5 nM/mg protein; $p < 0.01$).

DISCUSSION

This study aimed at showing that the MPTP model in young mice provides a valuable paradigm to mimic the energy failure which occurs in LS. In order to demonstrate that MPTP triggers a basal ganglia degeneration corresponding that observed in LS, we evaluated

complex I inhibition and lactate levels in MPTP-intoxicated young mice to confirm the mitochondrial origin of the pathogenesis observed. We also evaluated the mice nigro-striatal network through 3 specific and validated dopaminergic markers: TH, DAT, and striatal DA.

LS usually arises from a mitochondrial respiratory chain complex mutation, most frequently on complex I and IV (Malfatti et al, 2007, Lebon et al, 2007). We first verified that MPTP inhibits the mitochondrial complex I in the brain. In the present study, MPTP intoxication significantly reduced mitochondrial complex I activity by 28.7% in the mice striatum. To our knowledge, this result obtained through spectrophotometry is original because a complex I inhibition following MPTP intoxication has already been shown *in vitro* (Cleeter et al, 2001, Höglinger et al, 2003) but never *in vivo* after a systemic MPTP administration.

MPTP inhibits complex I through a series of key steps: MPTP is converted into N-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) by monoamine oxidase B (MAO-B) in the substantia nigra and is accumulated in dopaminergic neurons via the dopamine-reuptake system. MPP⁺ further accumulates in mitochondria by passive diffusion (Murphy et al, 1995) and binds to the complex I rotenone/piericidin-binding sites (Gluck et al, 1994).

We then verified that the energy failure induced through mitochondrial complex I inhibition is responsible for a striato-nigral degeneration, as observed in LS. An increase in lactate levels in blood and/or CSF is frequently found in LS (Böhm et al, 2006). In the present study, the plasmatic lactate concentration was significantly elevated (by 35%) in the MPTP group compared with the control group. We did not evaluate lactate levels in the CSF, as CSF collection is not routinely achieved in the mouse.

The elevation in plasma lactate concentration observed in the present study is in accordance with the literature: Vyas et al first showed a rise in lactate levels following MPTP intoxication *in vitro* using isolated mitochondrial preparations (Vyas et al, 1986). Since then, several *in*

vivo studies have confirmed this elevation in the rat (Rollema et al, 1994; Petzer et al, 2000). Dynamic *in vivo* imaging studies have also recently proven a lactate level elevation following MPTP intoxication in primates, cats, and mice (Brownell et al, 1998, Podell et al, 2003, Koga et al, 2006). This increase is also seen in another mitochondrial complex I inhibition model generated through rotenone intoxication (Hirata et al, 2005, Leng et al, 2003). A similar lactate elevation can be elicited through magnetic resonance spectroscopy in LS patients (Krägeloh-Mann et al, 1993). Therefore, mitochondrial complex I inhibition following systemic MPTP administration seems to reproduce the main biochemical alterations observed in LS.

Complex I activity measurement and plasma lactate level measurements showed that MPTP specifically inhibits mitochondrial respiratory chain complex I, and that this can be detected using peripheral markers. Because diagnostic criteria for LS also include basal ganglia degeneration (Bernier et al, 2002), we evaluated the nigro-striatal network through specific dopaminergic markers (TH, DAT, and DA content) in order to determine whether MPTP induces a functional deterioration comparable to that observed in LS.

We confirmed the striato-nigral network degeneration through DAT evaluation. DAT is the specific DA transporter located on the neurons striatal dendrites. DAT specifically recaptures 80% of DA from the synaptic cleft into the dendrites and therefore reflects the morphological nerve endings integrity and the striatal dopaminergic activity. We showed a 49% DAT decrease ($p = 0.008$) in the striatum. Two studies have described a comparable DAT reduction in this model (42% and 43%, respectively) (Himeda et al, 2006; Petzinger et al, 2007).

We also showed a statistically significant decrease in TH immunoreactivity in the striatum (45% decrease, $p = 0.005$). This result is in accordance with that from two other groups who respectively showed a 42% and a 44% decrease in TH immunoreactivity in the striatum

(Hamill et al, 2007; Oida et al, 2006). Concerning the dopaminergic neuron counts in the SNpc, our results indicate a 60% (significant) decrease following MPTP treatment also consistent with the literature which shows reductions in dopaminergic cell bodies in the SNpc after MPTP intoxication ranging from 58% to 71%, respectively (Liang et al, 2007; Geng et al, 2007).

Finally, we measured the striatal DA content to assess the functional effect on neurotransmission. We found a 42% decrease in striatal DA content. This result is consistent with that found by others in this model (Oida et al, 2006; Hamill et al, 2007).

Since striatal DAT, TH, and DA content reflect the dendrites density and the network activity, these results altogether demonstrate that MPTP specifically induces basal ganglia degeneration.

As others, we have previously shown an increased cell death in the basal ganglia in this model (Turmel et al, 2001; Lagrue et al, 2007). These results are corroborated by the *in vivo* imaging studies of the MPTP toxicity through MRI and diffusion tensor imaging techniques. Basal ganglia degeneration *in vivo* was first demonstrated by Miletich et al in 1994 in a primate model: unilateral intracarotid injection of MPTP caused MRI changes along with clinical signs, consisting in hyperintensity on T2-weighted images and hypointensity on T1-weighted images of the ipsilateral caudate and putamen (Miletich et al, 1994). Zhang et al showed later that not only these structures, but also the rostral globus pallidus were affected by MPTP (Zhang et al, 1999). Podell et al demonstrated an equivalent hyperintensity on T2-weighted images in the striatum of cats intoxicated with MPTP (Podell et al, 2003). Recently, Boska et al confirmed the SN degeneration in MPTP-intoxicated mice using quantitative diffusion tensor imaging (Boska et al, 2007).

However some limitations of this model should be outlined: MPTP-treated mice do not exhibit neurological symptoms exactly comparable to those seen in LS. To date, MPTP intoxication in rodents only elicits exploratory behaviour deficits which can be evaluated through open field tests (Crocker et al, 2003). Another limitation relies on the fact that the MPTP mouse model requires MAO-B expression to generate MPP⁺, the active MPTP toxic form. Therefore MPTP can only be used from 10 days post natal when cerebral MAO-B level becomes sufficient. This has been studied by others (Saura et al, 1994) and verified by us (data not shown).

Lastly, the MPTP mouse model can be compared to other means of mitochondrial inhibition: concerning molecular genetic approaches, these techniques require a complex procedure of selective mutations (Wallace, 2007). Regarding mitochondrial toxins, comparable acute rotenone intoxication provides a milder energetic stress. (Schmidt et al, 2006). Therefore we believe that MPTP appears to provide the most straightforward strategy to generate a reliable LS model.

Accumulating evidence suggests that the basal ganglia are vulnerable structures of the brain and that such vulnerability may arise from an energetic impairment secondary to mitochondrial dysfunction. In this study, we showed that the MPTP model mimics the main biochemical and pathological features of LS.

Promising neuroprotective therapies for mitochondrial diseases in the future might include anti-convulsant (Laguerre et al, 2007), anti-apoptotic (Dietz et al, 2008), anti-glutamate (Wallace et al, 2007), anti-oxidants (Watanabe et al, 2008) and mitochondrial cofactors such as coenzyme Q10 (Cleren et al, 2008).

ABBREVIATIONS

AU: arbitrary unit
BSA: bovine serum albumin
CSF: cerebrospinal fluid
DA: dopamine
DAT: dopamine transporter
ip: intraperitoneal
LS: Leigh syndrome
MAO-B: monoamine oxidase B
MPP+: N-methyl-4-phenylpyridinium
MPTP: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MRI: magnetic resonance imaging
MRS: magnetic resonance spectroscopy
PET: positron emission tomography
RT: room temperature
SNpc: substantia nigra pars compacta
TH: tyrosine hydroxylase
vs: versus

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank M-C. Furon for technical assistance with animal experiments, and Z. Gulhan, M-P. Vilar, and L. Galineau for contributive support on HPLC measurements. The authors also thank F. Paillard for editing the manuscript.

This work was supported by a fellowship from the Association des Anciens Internes des Hôpitaux de Paris to E. Lagrue.

REFERENCES

1. Beal, M.F. (2000). Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 23:298-304.
2. Bernier, F.P., Boneh, A., Dennett, X., Chow, C.W., Cleary, M.A., Thorburn, D.R. (2002). Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology.* 59:1406-1411.
3. Böhm, M., Pronicka, E., Karczmarewicz, E., Pronicki, M., Piekutowska-Abramczuk, D., Sykut-Cegielska, J., Mierzevska, H., Hansikova, H., Vesela, K., Tesarova, M., Houstkova, H., Houstek, J., Zeman, J. (2006). Retrospective, multicentric study of 180 children with cytochrome C oxidase deficiency. *Pediatr. Res.* 59:21-26.
4. Boska, M.D., Hasan, K.M., Kibuule, D., Banerjee, R., McIntyre, E., Nelson, J.A., Hahn, T., Gendelman, H.E., Mosley, R.L. (2007). Quantitative diffusion tensor imaging detects dopaminergic neuronal degeneration in a murine model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 26:590-596.
5. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
6. Brownell, A.L., Jenkins, B.G., Elmaleh, D.R., Deacon, T.W., Spealman, R.D., Isacson O. (1998). Combined PET/MRS brain studies show dynamic and long term physiological changes in a primate model of Parkinson's disease. *Nat. Med.* 4:1308-1312.
7. Byrne, E. (2002). Does mitochondrial respiratory chain dysfunction have a role in common neurodegenerative disorders? *J. Clin. Neurosci.* 9:497-501.
8. Castro-Gago, M., Blanco-Barca, M.O., Campos-Gonzalez, Y., Arenas-Barbero, J., Pintos-Martinez, E., Eiris-Punal, J. (2006). Epidemiology of pediatric mitochondrial respiratory chain in northwest Spain. *J. Pediatr. Neurol.* 34:204-211.
9. Chalon, S., Garreau, L., Emond, P., Zimmer, L., Vilar, M.P., Besnard, J.C., Guilloteau, D. (1999). Pharmacological characterization of (E)-N-(3-iodoprop-2-enyl) – 2beta-carbomethoxy-3beta(4'-methylphenyl)nortropine as a selective and potent inhibitor of the neuronal dopamine transporter. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291:648-654.
10. Cleeter, M.W.J., Cooper, J.M., Schapira, A.H.V. (2001). Nitric oxide enhances MPP+ inhibition of complex I. *FEBS Lett.* 504:50-52.
11. Cleren, C., Yang, L., Lorenzo, B., Calingasan, N.Y., Schomer, A., Sireci, A., Wille, E.J., Flint Beal, M. (2008). Therapeutic effects of coenzyme Q10 and reduced coenzyme Q10 in the MPTP model of Parkinsonism. *J Neurochem.* 104:1613-1621.
12. Crocker, S.J., Liston, P., Anisman, H., Lee, C.J., Smith, P.D., Earl, N., Thompson, C.S., Park, D.S., Korneluk, R.G., Robertson, G.S. (2003). Attenuation of MPTP-induced neurotoxicity and behavioural impairment in NSE-XIAP transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 12:150-161.
13. Debray, F.G., Lambert, M., Chevallier, I., Decarie, J.C., Shoubbridge, E.A., Robinson, B.H., Mitchell, G.A. (2007). Long-term outcome and clinical spectrum of 73 pediatric patients with mitochondrial diseases. *Pediatrics.* 119: 722-733.
14. Dietz, G.P., Stockhausen, K.V., Dietz, B., Falkenburger, B.H., Valbuena, P., Opazo, F., Lingor, P., Meuer, K., Weishaupt, H., Schulz, J.B., Bähr, M. (2008). Membrane-permeable Bcl-xL prevents MPTP-induced dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra. *J. Neurochem.* 104:757-765.
15. Di Filippo, M., Picconi, B., Costa, C., Bagetta, V., Tantucci, M., Parnetti, L., Calabresi, P. (2006). Pathways of neurodegeneration and experimental models of basal

- ganglia disorders: downstream effects of mitochondrial inhibition. *Eur. J. Pharmacol.* 1:65-72.
16. Geng, X., Tian, X., Tu, P., Pu, X. (2007). Neuroprotective effects of echinacoside in the mouse model of MPTP model of Parkinson's disease. *Eur. J. Pharmacol.* 564:66-74.
 17. Gluck, M.R., Krueger, M.J., Ramsay, R.R., Sablin, S.O., Singer, T.P., Nicklas, W.J. (1994). Characterization of the inhibitory mechanism of 1-methyl-4-phenylpyridinium and 4-phenylpyridine analogs in inner membrane preparations. *J Biol Chem.* 269:3167-3174.
 18. Hamill, C.E., Caudle, W.M, Richardson, J.R., Yuan, H., Pennell, K.D., Greene, J.G., Miller, G.W., Traynelis, S.F. (2007). Exacerbation of dopaminergic terminal damage in a mouse model of Parkinson's disease by the G-protein-coupled receptor-activated receptor 1. *Mol. Pharmacol.* 73:653-664.
 19. Hartig, M.B., Hortnagel, K., Garavaglia, B., Zorzi, G., Kmiec, T., Klopstock, T., Rostasy, K., Svetel, M., Kostic, V.S., Schuelke, M., Botz, E., Weindl, A., Novakovic, I., Nardocci, N., Prokisch, H., Meitinger, T. (2006). Genotypic and phenotypic spectrum of PANK2 mutations in patients with neurodegeneration with brain iron accumulation. *Ann. Neurol.* 59:248-256.
 20. Himeda, T., Kadoguchi, N., Kamiyama, Y., Kato, H., Maegawa, H., Araki, T. (2006). Neuroprotective effect of arundic acid, an astrocyte modulating agent, in mouse brain against MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) neurotoxicity. *Neuropharmacology.* 50:329-344.
 21. Hirata, Y., Nagatsu, T. (2005). Rotenone and CCCP inhibit tyrosine hydroxylation in rat striatal tissue slices. *Toxicology.* 216:9-14.
 22. Höglinger, G.U., Carrard, G., Michel, P.P., Medja, F., Lombès, A., Ruberg, M., Friguet, B., Hirsch, E.C. (2003). Dysfunction of mitochondrial complex I and the proteasome: interactions between two biochemical deficits in a cellular model of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 86:1297-1307.
 23. Klawitter, V., Morales, P., Bustamante, D., Gomez-Urquijo, S., Hökfelt, T., Herrera-Marschitz, M. (2007). Plasticity of basal ganglia neurocircuitries following perinatal asphyxia: effect of nicotinamide. *Exp. Brain. Res.* 180:139-152.
 24. Koga, K., Mori, A., Ohashi, S., Kurihara, N., Kitagawa, H., Ishikawa, M., Mitsumoto, Y., Nakai, M. (2006). H MRS identifies lactate rise in the striatum of MPTP-treated C57BL/6 mice. *Eur. J. Neurosci.* 23:1077-1081.
 25. Krägeloh-Mann, I, Grodd, W, Schöning, M, Marquard, K, Nägele, T, Ruitenbeek, W. (1993). Proton spectroscopy in five patients with Leigh's disease and mitochondrial enzyme deficiency. *Dev. Med. Child. Neurol.* 35:769-776.
 26. Lagrue, E., Chalon, S., Bodard, S., Saliba, E., Gressens, P., Castelnau, P. (2007). Lamotrigine is neuroprotective in the energy deficiency model of MPTP intoxicated mice. *Pediatr. Res.* 62:14-19.
 27. Lebon, S., Minai, L., Chretien, D., Corcos, J., Serre, V., Kadhon, N., Steffann, J., Pauchard, J.Y., Munnich, A., Bonnefont, J.P., Rotig, A. (2007). A novel mutation of the NDUFS7 gene leads to activation of a cryptic exon and impaired assembly of mitochondrial complex I in a patient with Leigh syndrome. *Mol. Genet. Metab.* 27:104-108.
 28. Leng, A., Feldon, J., Ferger, B. (2003). Rotenone increases glutamate-induced dopamine release but does not affect hydroxyl-free radical formation in rat striatum. *Synapse* 50:240-250.

29. Liang, L.P, Huang, J, Fulton, R, Day, B.J, Patel, M. (2007). An orally active catalytic metalloporphyrin protects against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine in vivo. *J. Neurosci.* 27:4326-4333.
30. Liss, B., Roeper, J. (2002). Correlating function and gene expression of individual basal ganglia neurons. *Trends Neurosci.* 27:475-481.
31. Malfatti, E., Bugiani, M., Invernizzi, F., de Souza, C.F., Farina, L., Carrara, F., Lamantea, E., Antozzi, C., Confalonieri, P., Sanseverino, M.T., Giugliani, R., Uziel, G., Zeviani, M. (2007). Novel mutations of ND genes in complex I deficiency associated with mitochondrial encephalopathy. *Brain* 130:1894-1904.
32. Mandemakers, W., Morais, V.A., De Strooper, B. (2007). A cell biological perspective on mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *J. Cell. Sci.* 15:1707-1716.
33. Marti, M.J., James, C.J., Oo, T.F., Kelly, W.J., Burke, R.E. (1997). Early developmental destruction of terminals in the striatal target induces apoptosis in dopamine neurons of the substantia nigra. *J. Neurosci.* 17:2030-2039.
34. Mercier, S., Josselin de Wasch, M., Labarthe, F., Jardel, C., Lombès, A., Munnich, A., Toutain, A., Nivet, H., Saliba, E., Chantepie, A., Castelnau, P. The PMDC: a diagnostic algorithm for mitochondrial cytopathies in childhood. *Arch. Ped. Submitted.*
35. Miletich, R.S., Bankiewicz, K.S., Quarantelli, M., Plunkett, R.J., Frank, J., Di Chiro, G. (1994). MRI detects acute degeneration of the nigrostriatal dopamine system after MPTP exposure in hemiparkinsonian monkeys. *Ann. Neurol.* 35:689-697.
36. Murphy, M.P., Krueger, M.J., Sablin, S.O., Ramsay, R.R., Singer, T.P. (1995). Inhibition of complex I by hydrophobic analogues of N-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) and the use of an ion-selective electrode to measure their accumulation by mitochondria and electron-transport particles. *Biochem J.* 306:359-365.
37. Oida, Y, Kitaichi, K, Nakayama, H, Ito, Y, Fujimoto, Y, Shimazawa, M, Nagai, H, Hara, H. (2006). Rifampicine attenuates the MPTP-induced neurotoxicity in mouse brain. *Brain Res.* 1082:196-204.
38. Okun, J.G., Horster, F., Farkas, L.M., Feyh, P., Hinz, A., Sauer, S., Hoffmann, G.F., Unsicker, K., Mayatepek, E., Kolker, S. (2002). Neurodegeneration in methylmalonic aciduria involves inhibition of complex II and the tricarboxylic acid cycle and synergistically acting excitotoxicity. *J. Biol. Chem.* 26:14674-14680.
39. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. #256000; 08/06/2007. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>. Accessed June 1, 2008.
40. Paxinos, G., Franklin, K.B. (2003). The mouse brain in stereotaxic coordinates Academic Press, San Diego.
41. Petzer, J.P., Bergh, J.J., Mienie, L.J., Castagnoli, N., Van Der Schyf, C.J. (2000). Metabolic defects caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and by HPTP (the tetrahydropyridinyl analog of haloperidol) in rats. *Life Sci.* 66:1949-1954.
42. Petzinger, G.M., Walsh, J.P., Akopian, G., Hogg, E., Abernathy, A., Arevalo, P., Turnquist, P., Vuckovic, M., Fisher, B.E., Togasaki, D.M., Jakowec, M.W. (2007). Effects of treadmill exercise on dopaminergic transmission in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned model of basal ganglia injury. *J. Neurosci.* 27:5291-5300.
43. Piao, Y.S., Tang, G.C., Yang, H., Lu, D.H. (2006). Clinico-neuropathological study of a Chinese case of familial adult Leigh syndrome. *Neuropathology.* 26:218-221.

44. Podell, M., Hadjiconstantinou, M., Smith, M.A., Neff, N.H. (2003). Proton magnetic resonance imaging and spectroscopy identify metabolic changes in the striatum in the MPTP feline model of parkinsonism. *Exp. Neurol.* 179:159-166.
45. Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Djaldetti, R., Liberatore, G., Vila, M., Vukosavic, S., Almer, G. (2000). The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism. *Restor. Neurol. Neurosci.* 16:135-142.
46. Qi, X., Lewin, A.S., Sun, L., Hauswirth, W.W., Guy, J. (2004). SOD2 gene transfer protects against optic neuropathy induced by deficiency of complex I. *Ann. Neurol.* 56:182-191.
47. Ramachandiran, S., Hansen, J.M., Jones, D.P., Richardson, J.R., Miller, G.W. (2007). Divergent mechanisms of paraquat, MPP+ and rotenone toxicity: oxidation of thioredoxin and caspase-3 activation. *Toxicol. Sci.* 95:163-171.
48. Rollema, H., Skolnik, M., D'Engelbronner, J., Igarashi, K., Usuki, E., Castagnoli, N. (1994). MPP+-like neurotoxicity of a pyridinium metabolite derived from haloperidol: *in vivo* microdialysis and *in vitro* mitochondrial studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268:380-387.
49. Rutherford, M.A., Azzopardi, D., Whitelaw, A., Cowan, F., Renowden, S., Edwards, A.D., Thoresen M. (2005). Mild hypothermia and the distribution of cerebral lesions in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy *Pediatrics* 116:1001-1006.
50. Sas, K., Robotka, H., Toldi, J., Vecsei, L. (2007). Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J. Neurol. Sci.* 257:221-239.
51. Saura, J., Richards, J.G., Mahy, N. (1994). Age-related changes on MAO in Bl/C57 mouse tissues: a quantitative radioautographic study. *J. Neural. Transm. Suppl.* 41:89-94.
52. Schiff, M., Miné, M., Brivet, M., Marsac, C., Elmaleh-Bergés, M., Evrard, P., Ogier de Baulny, H. (2006). Leigh's disease due to a new mutation in the PDHX gene. *Ann. Neurol.* 59:709-714.
53. Schmidt, W.J., Alam, M. (2006). Controversies on new animal models of Parkinson's disease pro and con: the rotenone model of Parkinson's disease (PD). *J Neural Trans Suppl.* 70:273-276.
54. Turmel, H., Hartmann, A., Parain, K., Douhou, A., Srinivasan, A., Agid, Y., Hirsch, E.C. (2001). Caspase-3 activation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: (MPTP)-treated mice. *Mov Disord.* 16:185-189.
55. Vyas, I., Heikkila, R.E., Nicklas, W.J. (1986). Studies on the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: inhibition of NAD-linked substrate oxidation by its metabolite, 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J. Neurochem.* 46:1501-1507.
56. Wallace, B.A., Ashkan, K., Heise, C.E., Foote, K.D., Torres, N., Mitrofanis, J., Benabid, A.L. (2007). Survival of midbrain dopaminergic cells after lesion or deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in MPTP-treated monkeys. *Brain* 130:2129-2145.
57. Wallace, D.C. (2002). Animal models for mitochondrial disease. *Methods Mol. Biol.* 197:3-54.
58. Watanabe, Y., Kato, H., Araki, T. (2008). Protective action of neuronal nitric oxide synthase inhibitor in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Metab. Brain Dis.* 23:51-69.
59. Yang, Y.L., Sun, F., Zhang, Y., Qian, N., Yuan, Y., Wang, Z.X., Qi, Y., Xiao, J.X., Wang, X.Y., Qi, Z.Y., Zhang, Y.H., Jiang, Y.W., Bao, X.H., Qin, J., Wu, X.R. (2006).

- Clinical and laboratory survey of 65 Chinese patients with Leigh syndrome. *Chin. Med. J. (Engl)* 119:373-377.
60. Zhang, Z., Zhang, M., Ai, Y., Avison, C., Gash, D.M. (1999). MPTP-Induced pallidal lesions in rhesus monkeys. *Exp. Neurol.* 155:140-149.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Mitochondrial complex I activity assay.

Each bar represents the mitochondrial complex I activity in the striatum of $n = 6$ mice per group (control group and MPTP group). The two striata from the same animal were pooled. The NADH reduction rate was measured during the first 2 minutes and the non-specific rotenone-independent activity was subtracted. Results are expressed as mean $\pm$ SEM in nM/min/mg protein. Complex I activity is significantly decreased ($p = 0.018$) in the MPTP group (50.125 ± 5.31) compared with the control group (70.25 ± 3.08) (* $p < 0.05$).

Figure 2: Plasma lactate level measurement dosage.

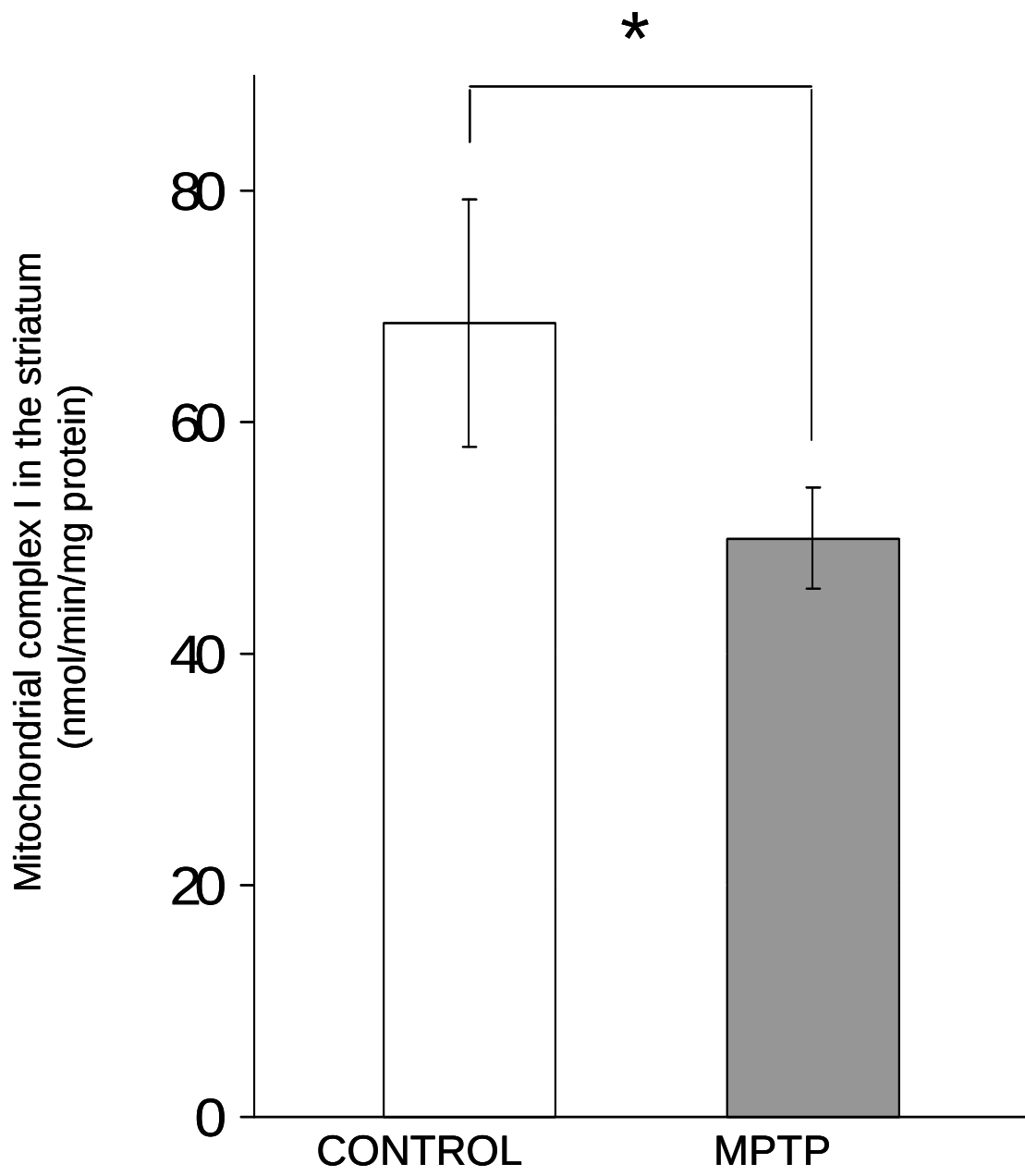
Lactate levels were evaluated by spectroscopy magnetic resonance imaging in MPTP-treated and control mice. Each bar represents the mean $\pm$ SEM of $n = 6$ mice per group. Lactate levels were significantly higher ($p = 0.023$) in the MPTP group (14.76 ± 1.3 mM/L) compared with the control group (10.9 ± 1.13 mM/L) (* $p < 0.05$).

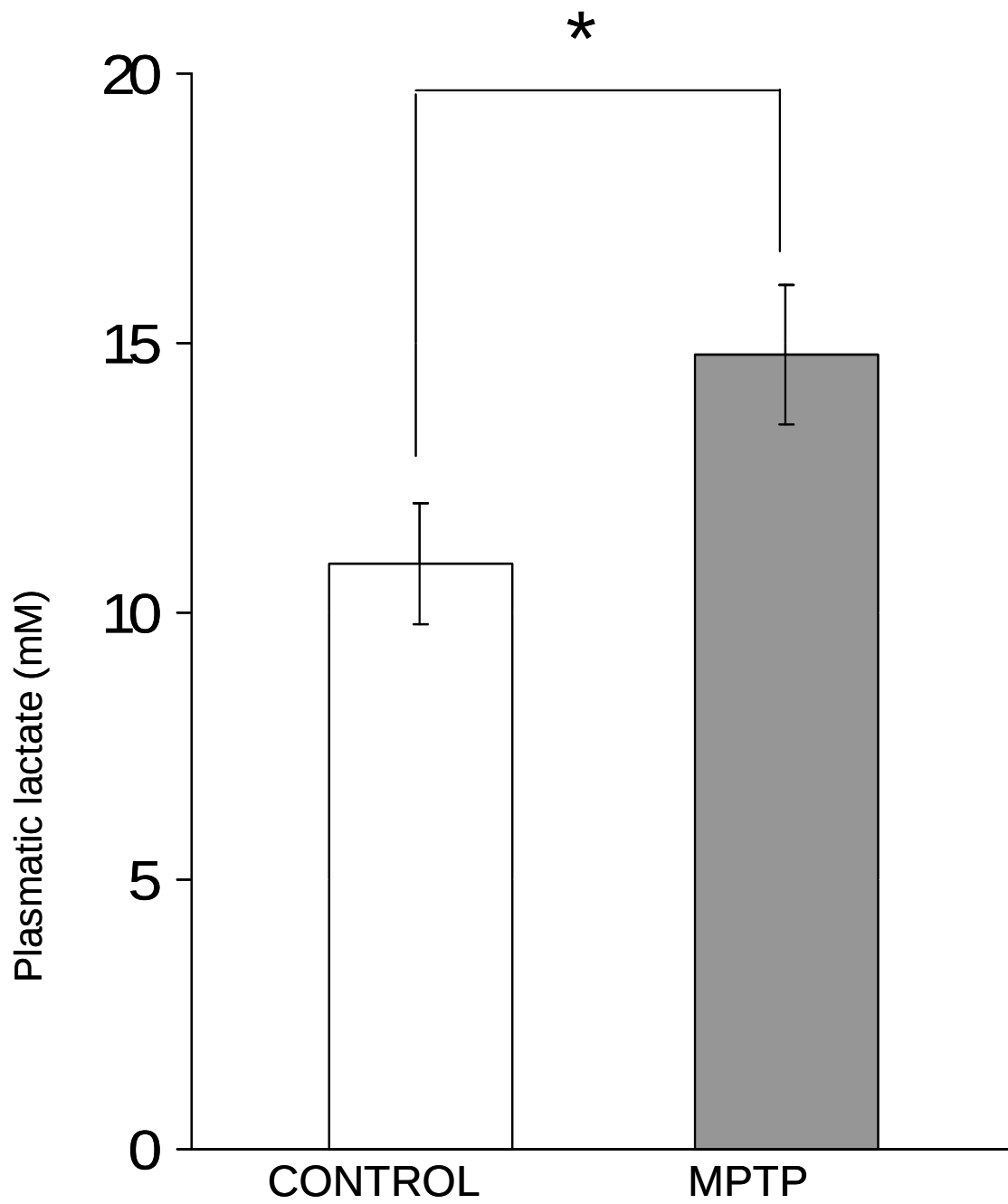
Figure 3: DAT density.

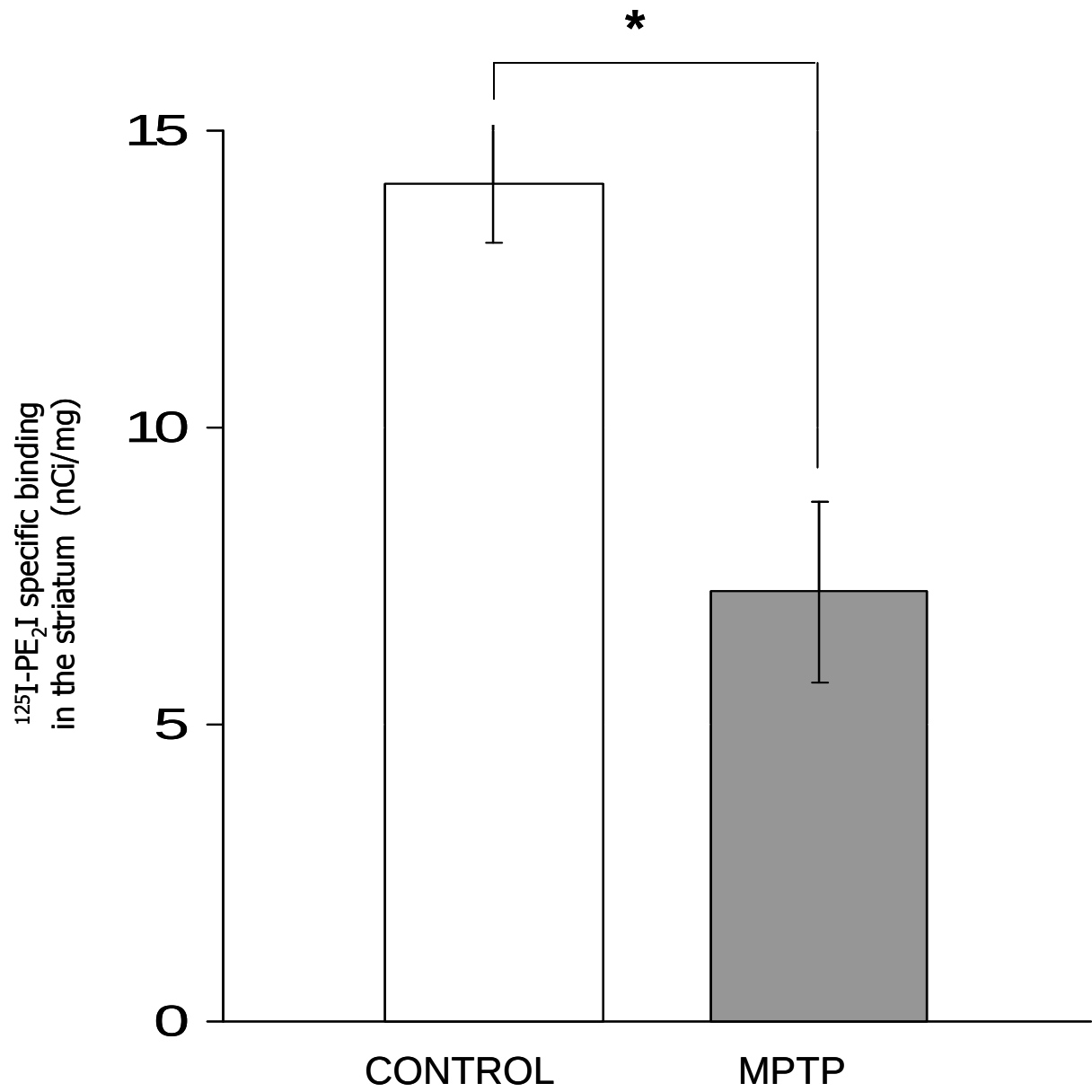
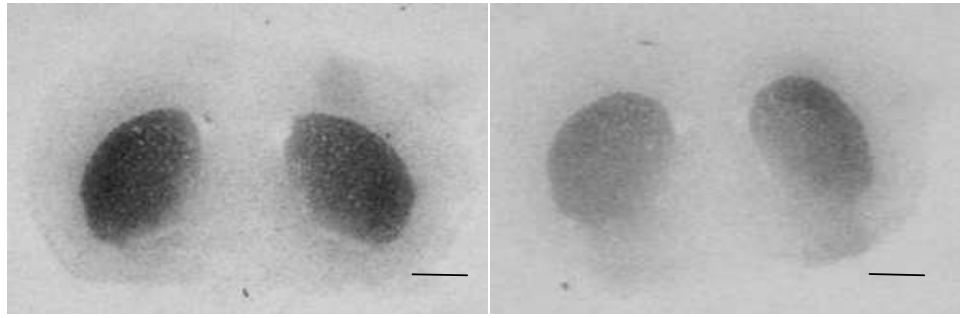
DAT density was evaluated through autoradiography using the specific radioligand [125 I]PE2I. Representative striatum autoradiographies from control and MPTP-treated mice are shown ($n = 6$ per group). Each bar represents the mean $\pm$ SD of DAT density in the striatum. Results are expressed in nCi/mg. DAT density was significantly (* $p = 0.008$) lower in the MPTP-treated mice compared with control mice (7.23 ± 1.01 nCi/mg vs 14.11 ± 1.51 nCi/mg, respectively).

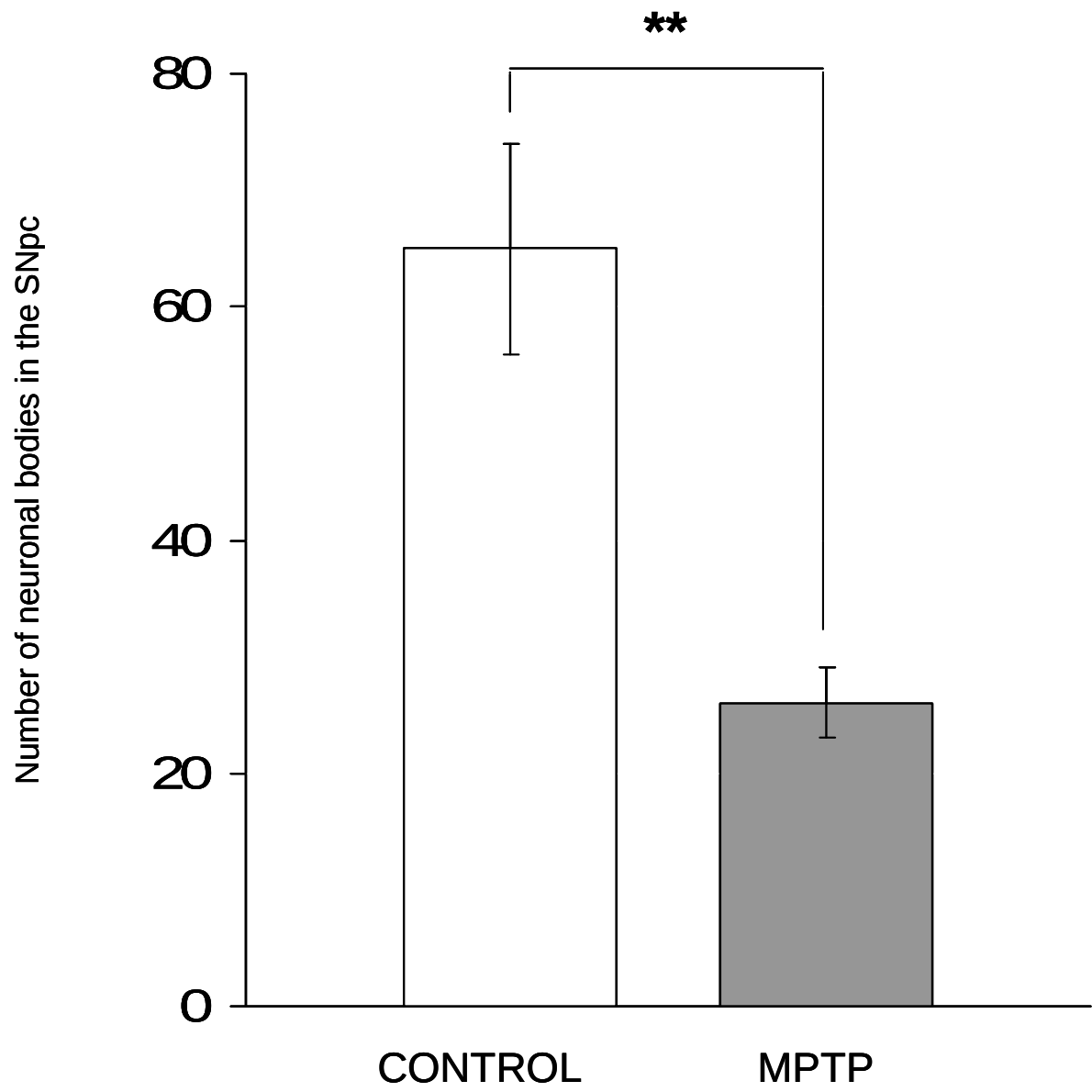
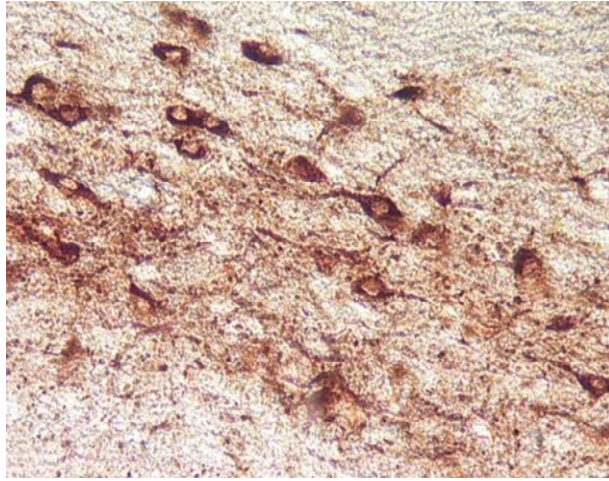
Figure 4: TH immunohistochemistry and neuron counts in the SNpc.

TH-positive neurons were counted bilaterally in the SNpc (representative photograph shown) excluding the ventral tegmental area on 4 adjacent sections per animal ($n = 6$ per group). Results are expressed as the mean total number of neurons $\pm$ SD. The number of TH-positive neurons was significantly lower (** $p = 0.005$) in MPTP-treated mice compared with control mice (26 ± 3 neurons vs. 65 ± 9 neurons, respectively).









2. Article 2: *Lamotrigine is neuroprotective in the energy deficiency model of MPTP intoxicated mice.*

Nous avons souhaité après validation du modèle MPTP chez la souris évaluer le potentiel neuroprotecteur de différentes molécules. Les classes pharmaceutiques déjà testées dans ce modèle dans le cadre de recherches sur la maladie de Parkinson ont été nombreuses et diverses : agonistes dopaminergiques (Schapira, 2002), anti radicaux libres (Matthews et al, 1999), œstrogènes (Ramirez et al, 2003), neurotrophines (Zeng et al, 2006), anti glutamatergiques (Lange et Riederer, 1994), modulateurs énergétiques (Clerehugh et al, 2008), anti inflammatoires (Soliman et al, 2009). Nous avons émis l'hypothèse que les antiépileptiques pourraient présenter un potentiel neuroprotecteur en raison de leurs propriétés pharmacologiques particulières. Les antiépileptiques ont en effet des propriétés anti glutamatergiques, pro GABAergiques et inhibent dans certains cas les canaux ioniques ATP-dépendants. Nous avons privilégié des molécules à modes d'actions pléiotropes et par conséquent susceptibles d'agir sur les différentes voies pathologiques d'excitotoxicité, de peroxydation lipidique et de dérégulation calcique mises en jeu après intoxication par le MPTP. Les antiépileptiques nous ont par ailleurs intéressés en raison de leur profil de tolérance très favorable chez l'enfant, y compris très jeune.

Nous avons choisi de tester le valproate de sodium, le topiramate et la lamotrigine. Le topiramate n'avait jamais été testé dans le modèle MPTP, mais avait prouvé un effet neuroprotecteur après intoxication à l'iboténate (Sfaello et al, 2005), dans l'état de mal convulsif induit par le lithium-pilocarpine (Cha et al, 2002) ou bien encore l'hypoxie-ischémie (Yang et al, 1998). La lamotrigine avait quand à elle démontrée un effet protecteur dans des modèles d'hypoxie ischémie (Crumrine et al, 1997 ; Shuaib et al, 1995). Nous avons enfin retenu le valproate de sodium comme contrôle négatif (Melamed et al, 1986).

Nous avons évalué le potentiel effet neuroprotecteur de ces trois molécules par les techniques d'évaluation du réseau nigro-strié antérieurement décrites : immunohistochimie anti TH, marquage autoradiographique du DAT, dosage de la dopamine et des ses dérivés par HPLC.

Cette étude ne nous a pas permis de prouver un effet neuroprotecteur du topiramate dans notre modèle. Cette molécule a même eu un effet délétère sur la population des neurones dopaminergiques de la SN. La lamotrigine a au contraire prouvé un effet bénéfique.

Nous avons émis l'hypothèse qu'une inhibition différentielle des canaux ioniques ATP-dépendants pourrait être à l'origine de ces résultats. La lamotrigine inhibe en effet un large spectre de canaux ioniques (canaux sodiques, canaux potassiques, canaux calciques de type L, N, P/Q et R) tandis que le topiramate n'inhibe que les canaux sodiques et les canaux calciques de type L et stimule les canaux potassiques et les canaux calciques de type N, P/Q et R. Le topiramate augmenterait par ailleurs la libération de radicaux libres par les astrocytes ce qui pourrait majorer le stress oxydatif post MPTP (Pavone et Cardile, 2003).

La lamotrigine semble constituer une molécule à fort potentiel de neuroprotection. Un effet protecteur a également été prouvé dans d'autres modèles d'intoxication mitochondriale par le 3-NP (Lee et al, 2000) et le malonate (Connop et al, 1997). Cette molécule est également en phase de test clinique chez l'homme dans le cadre de la sclérose en plaques (Kapoor, 2008).

Au total, ce travail a permis de caractériser l'effet neuroprotecteur de la lamotrigine dans le modèle de dégénérescence du réseau nigro-strié par intoxication au MPTP chez la souris. Nous continuons actuellement ce travail dans le but de préciser les mécanismes par lesquels cette neuroprotection s'exerce (dosage du complexe I et évaluation du stress oxydatif par exemple). Nous envisageons par ailleurs de déterminer si cet effet neuroprotecteur est stable dans le temps par des études in vivo par tomographie par émission de positons. Nous envisageons enfin de tester la lamotrigine dans le modèle MPTP chez le primate.

Lamotrigine Is Neuroprotective in the Energy Deficiency Model of Mptp Intoxicated Mice

EMMANUELLE LAGRUE, SYLVIE CHALON, SYLVIE BODARD, ELIE SALIBA, PIERRE GRESENS, AND PIERRE CASTELNAU

InsERM, U619 [E.L., S.C., S.B., E.S., P.C.], Tours, F-37000 France; Université François-Rabelais [E.L., S.C., E.S., P.C.], Tours, F-37000 France; CHRU Tours [E.L., E.S., P.C.], Hôpital Clocheville, Tours, F-37000 France; INSERM, U676 [P.G.], Paris, F-75019, France; Université Paris 7 Denis-Diderot [P.G.], Faculté de médecine Xavier Bichat, IFR62, Paris, F-75019, France; Hôpital Robert Debré [P.G.], Paris, F-75019, France

ABSTRACT: The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) inhibits the mitochondrial complex I of the respiratory chain. This results in ATP and ion homeostasis disturbances, which lead to selective death of the substantia nigra dopaminergic neurons. Well known as a Parkinson's disease model, the MPTP animal model also provides a potential paradigm of the energy deficiencies found in childhood. In these conditions, anticonvulsants may provide neuroprotection by limiting cellular energy consumption. We tested valproate, topiramate and lamotrigine in the MPTP mouse model. Dopamine transporter (DAT) density was assessed by quantitative autoradiography, tyrosine hydroxylase (TH) was evaluated by immunohistochemistry and dopamine (DA) levels by HPLC-ED whereas neuronal apoptosis was monitored through active caspase-3. Expectedly, the DAT density, TH immunoreactive neurons and DA content in the MPTP group were respectively reduced to 51%, 40% and 26% versus control animals. Unlike valproate and topiramate, lamotrigine provided a significant neuroprotection against MPTP in maintaining these levels at 99%, 74% and 58% respectively and reducing the induced apoptosis. Altogether, the data indicate that lamotrigine limits dopaminergic neuronal death in the substantia nigra and promotes striatal dendrites sprouting. Lamotrigine, a widely used and well-tolerated molecule in young patients, could represent a valuable adjuvant therapy in various energy deficiency conditions during childhood. (*Pediatr Res* 62: 1–3, 2007)

Evidences from degenerative and metabolic encephalopathies studies indicate that the striatum and the substantia nigra (SN) are vulnerable structures in the brain, especially during pre and postnatal brain development (1,2). A partial or total destruction of this striato-nigral dopaminergic network is found in several conditions occurring in childhood such as iron or copper metabolism abnormalities (1), organic acidurias (3), urea cycle disorders, various mitochondrial energy production deficiencies (1,4), or hypoxia-ischemia (2,5). All these conditions witness the vulnerability of this particular deep nuclei network involved in multiple motor, sensory and cognitive functions.

These basal ganglia share a common susceptibility to energetic stress (6,7), which can be studied experimentally using mitochondrial inhibitors (8). Once converted into MPP⁺, the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) inhibits the mitochondrial electron transport chain at complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase) resulting in decreased oxygen consumption and ATP production and ion homeostasis disturbances which, together, lead to neuronal cell death (9). This toxin depletes dopaminergic neurons in the SN and causes neuronal degeneration of the nigrostriatal pathway in animals and humans (9).

Several neuroprotection studies were performed in this MPTP mouse model using: energy sparing drugs; free radicals scavengers; anti-glutamatergic drugs; anti-apoptotic molecules and neurotrophines (10–12).

Anticonvulsants share several cell protective properties such as ATP-dependent ion channel inhibition, glutamate release inhibition and GABA release stimulation. We chose to test in the MPTP mouse model, anticonvulsants that operate on a large number of the pathologic ways described above and which might spare energy through ion channels inhibition. ATP dependent ion channels inhibition may indeed protect neurons as it adapts the cellular metabolism to the limited ATP availability during the energetic distress (13). Moreover, current anticonvulsants carry now a reasonable tolerance profile in humans even in young children. Therefore, anticonvulsants provide good candidates for neuroprotection assays especially in energy stress conditions in childhood.

Among them, we tested topiramate (TOP), valproate (VPA) and lamotrigine (LMT), each of which recapitulates these properties (14–16). None of these drugs activate cytochrome P450 or monoamine oxidase B that interferes with MPP⁺ metabolism thereby reducing MPTP toxicity (9). TOP has never been tested in the MPTP mice model. This relatively new anticonvulsant exhibits neuroprotective properties, which were reported in other conditions such as status epilepticus

Received October 23, 2006; accepted March 1, 2007.

Correspondence: Pierre Castelnau, M.D., Ph.D., Neuropharmacologie et InsERM U619, Université de Tours, Hôpital d'Enfants Gaston de Clocheville, 40 Bd Bessanger, 37044 Tours cedex 01, France. Phone: 33 (0)2 47476220 - Fax: 33 (0)2 47476250. E-mail: p.castelnau@des-tours.fr

E.L. was supported by a fellowship from Fondation de Neurologie de Langue Française.

Abbreviations: ATP, adenosine triphosphate; ADCC, arbitrary unit; AU, arbitrary unit; DA, dopamine; DAT, dopamine transporter; LMT, lamotrigine; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; RT, room temperature; SN, substantia nigra; SNpc, substantia nigra pars compacta; TH, tyrosine hydroxylase; TOP, topiramate; VPA, valproate

and hypoxia-ischemia (17,18). VPA, tested by Melamed *et al.*, did not show significant neuroprotection (19). In contrast, LMT could have neuroprotective properties when associated to MPTP administration (20). However, the mechanism by which LMT provides this effect remains poorly understood.

In the present study, we examined, through tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine transporter (DAT), two specific dopaminergic markers, and the neuroprotective properties of VPA, TOP and LMT on MPTP-induced neurotoxicity in mice. As LMT showed marked neuroprotective properties in this model, we subsequently focused on this well tolerated anticonvulsant to clarify its mechanisms of action using apoptosis and dopamine (DA) content analysis.

MATERIALS AND METHODS

Animals. All experiments were performed on consanguineous male C57/Bl6NOR mice (5 wk old, average weight: 19 ± 1 g, CERJ, France) in accordance with the European Community Commission guidelines (86/609/EEC). The mice were kept under controlled conditions on a 12 h light/dark cycle with food and water *ad libitum*. Since mature levels of monoamine oxidase B are required to convert MPTP into its active toxic form MPP⁺, younger animals were not used in the present study.

Anticonvulsant treatments. Five groups ($n = 6$ per group) were constituted for DAT and TH study: control (saline p.o. and i.p.), MPTP (saline p.o., - MPTP i.p.), VPA-MPTP (VPA p.o., - MPTP i.p.), TOP-MPTP (TOP p.o., - MPTP i.p.) and LMT-MPTP (LMT p.o., - MPTP i.p.). Each group was treated with the corresponding anticonvulsant twice a day p.o. from day 1 (D1) to day 7 (D7). The cumulative dose was 100 mg/kg/d for VPA (Depakine[®], Sanofi-Synthelabo, France) and TOP (Eptoina[®], Janssen-Cilag, France) and 40 mg/kg/d for LMT (Lamictal[®], GlaxoSmithKline, France). Each anticonvulsant was dissolved in saline to obtain a final 200 μ L volume of oral administration. Each mice was weighed daily.

MPTP intoxication. The mice were intoxicated with 4 administrations of MPTP (12.5 mg/kg) i.p. at 1 h intervals on D3. MPTP (Sigma Chemical Co., France) was dissolved in 0.9% sodium chloride to a final concentration of 2.5 mg/mL (100 μ L injection/20g mouse body weight). The control mice only received saline.

DA immunohistochemical studies. The mice were killed by cervical dislocation 7 d after MPTP intoxication (i.e., 3 d after the end of the anticonvulsant treatment). The brains were rapidly removed, frozen (-35°C), subsequently cut into 20 μ m coronal sections (Reichert-Jung Cryostat CM3000 Leica, France) and stored at -80°C .

For binding studies, 3 sections/animal were incubated for 90 min at room temperature (RT) in a phosphate buffer containing [¹²⁵I]PEIT (100 pM) as previously described (21). Nonspecific binding was assessed on adjacent sections with the same buffer containing 1 μ M cocaine (Cooper, France) and subtracted from total binding to yield specific binding. After rinsing and drying, the sections were exposed to sensitive films (Biomax MR, Kodak, France) with radioactive standard scales ([¹²⁵I]-microscales, Amersham Bioscience AB, UK). The films were analyzed through an image analyzer (Betavision, Biospace Instruments, France) after identifying the substantia nigra pars compacta (SNpc) and striatum areas. The absorbance obtained was converted into apparent tissue ligand concentrations with reference to standards and specific activity of the radioligand (74 TBq/mmol). The intensity of [¹²⁵I] PEIT binding was expressed in aKimg of equivalent tissue (mean $\pm$ SD).

Tyrosine hydroxylase immunostaining. The sections used were from the same animals analyzed for DAT immunohistochemistry. The slides were thawed, postfixed in 4% paraformaldehyde and the endogenous peroxidases were blocked. The primary antibody (rabbit polyclonal anti-TH antibody, Pd France, USA, 1:500, 3h, RT), the secondary biotinylated antibody (goat anti rabbit, 1h, RT) and the Avidin Biotin Complex (Vector Laboratory, Burlingame, USA, 30 min, RT) were consecutively incubated. The staining was revealed with diaminobenzidine (Sigma Chemical Co., France, 5 min). Internal control staining was performed by omitting the primary antibody. The optic density expressed as mean $\pm$ SD in arbitrary unit (AU) and the dopaminergic neurons counts were evaluated with an optical microscope (Leica, France) coupled to an image analyzer (HistoLab, Microvision Instruments, France) on 4 sections/animal. The neurons were counted in the SNpc, excluding the ventral tegmental area. The number of TH positive neurons is expressed as the total number of neurons $\pm$ SD.

DA content measurement. Both striata dissected from the same animal (3 groups: control, MPTP, LMT-MPTP in the same conditions as above; $n = 5$ per group) were pooled and homogenized with 750 μ L ice-cold 0.12 M perchloric acid (0.1 mM EDTA, 0.5 mM Na₂S₂O₈). After centrifugation (4 $^{\circ}\text{C}$, 16000 g, 20 min), a fraction of the resulting supernatant was injected into the HPLC device (Beckman-Coulter, Fullerton, CA). The biogenic amines were separated on an Ultraphase, Ion Pair, C18 Reverse Phase analytical column (LC-21C, BAS, West Lafayette, USA). The electrochemical was performed with a +0.74V electrochemical detector (Concordia, Waters, France). The mobile phase contained 20 mM citric acid, 10 mM Na₂HPO₄, 5.25 mM heptane sulfonic acid, 3 mM octane sulfonic acid, 0.1 mM EDTA, 2 mM KCl, 0.2% diethylamine and 0.8% phosphoric acid, 7% acetonitrile, 3% methanol. The proteins from each sample were evaluated on the pellet with spectrophotometry according to Bradford (22). The results are expressed as mean $\pm$ SD in nmol DA/mg protein.

Active caspase 3 immunostaining. For active caspase 3 staining, the mice (3 groups: control, MPTP, LMT-MPTP in the same conditions as above; $n = 5$ per group) were killed by cervical dislocation 7 d after MPTP intoxication. The brains were removed, postfixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin and cut into 16 μ m serial coronal sections. After deparaffinization and rehydration, the sections were heated in a microwave oven (750W 1 min, 30 $^{\circ}\text{C}$ 9 min) and cooled at RT. After saturation with goat serum, the primary antibody (rabbit polyclonal CM1 antibody, Dakocytomation, USA, 1:500, overnight, 37 $^{\circ}\text{C}$), the secondary antibody (biotinylated rabbit anti mouse IgG 1%, Dakocytomation, USA, 45 min, RT) and the Avidin Biotin Complex (Vector Laboratory, Burlingame, USA, 45 min, RT) were consecutively incubated and the staining revealed with diaminobenzidine (Sigma Chemical Co., France, 60 min). Internal control staining was performed by omitting the primary antibody. The caspase-3 positive cells were counted in the striatum and the results were expressed as mean $\pm$ SEM. This experiment was performed on control, MPTP and LMT mice sections using 8 sections/animal.

Statistical analysis. Data were prospectively collected and analyzed with the Winks software (Tucson, USA). Statistical significance was evaluated with the nonparametric Mann-Whitney test for compared values from small groups. Statistical significance was considered for $p < 0.05$.

RESULTS

MPTP and anticonvulsant treatment tolerance. Preliminary experiments were performed to monitor the impact of each anticonvulsant on mice growth and survival. Each of the 4 groups (MPTP, VPA-MPTP, TOP-MPTP and LMT-MPTP) was compared with the control group. During the observation

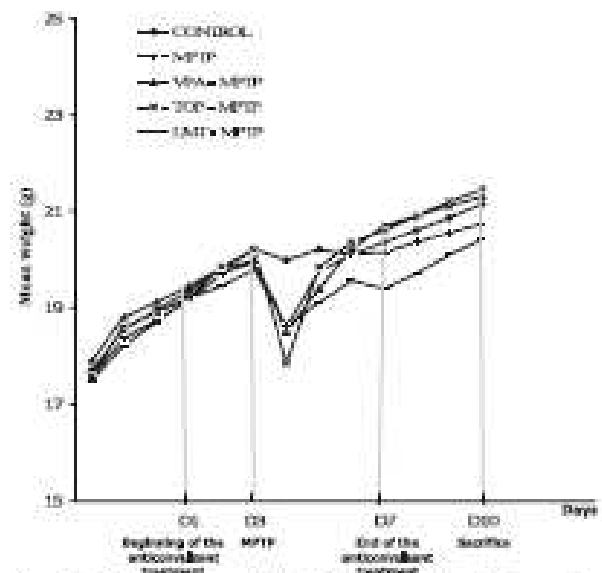


Figure 1. Mice growth curves during MPTP intoxication and anticonvulsant treatment. The mean weight per group ($n = 6$ in each group - C57/Bl6 strain) is indicated at each time point.

period, all the animals survived and the MPTP-induced transient weight loss at day 4 did not significantly affect the final animal weight as shown in Figure 1 (MPTP: 20.75 ± 0.42 g; VPA: 21.3 ± 0.67 g; TOP: 21.45 ± 0.52 g; LMT: 20.4 ± 0.36 g). The brain mean weight was 0.4 ± 0.02 g in all groups. To validate the reproducibility of the anticonvulsant oral administration procedure, we determined residual serum VPA concentration that, unlike LMT and TOP, is available on a routine basis (concentration 12 h after the last administration, 5 d of treatment, $n = 5$ animals). The mean concentration was 1.94 ± 0.95 mg/L.

Effect of VPA, TOP and LMT on DAT density. Figure 2A shows representative striatum autoradiographies of each mice group with an apparent normal DAT density in the LMT-MPTP group. The DAT level, evaluated with the specific radio-labeled ligand [125 I]PE2I reached 7.23 ± 1.01 nCi/mg in the MPTP-intoxicated mice compared with 14.11 ± 1.51 nCi/mg in the control group ($p = 0.008$). This significant reduction found in the striatum is shown on Figure 2B. VPA (7.64 ± 2.67 nCi/mg) and TOP (8.06 ± 1.54 nCi/mg) did not modify the DAT density versus the MPTP-intoxicated mice. In contrast, the DAT level in the LMT-MPTP group (13.98 ± 1.34 nCi/mg) was comparable to the control group but statistically higher than in the MPTP intoxicated mice ($p = 0.008$).

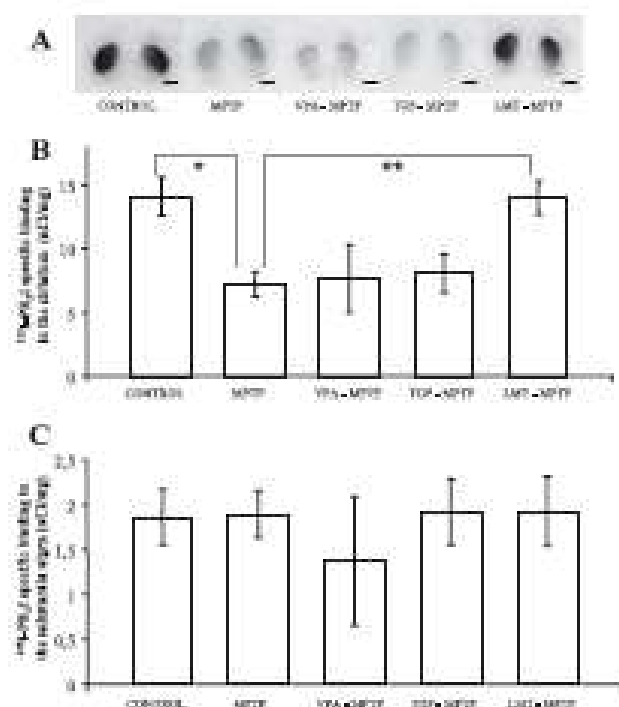


Figure 2. DAT density in control and MPTP intoxicated mice groups compared with the anticonvulsant treated groups ($n = 6$ in each group). (A) Representative striatum autoradiographies of each mice group showing a macroscopically apparent preservation of the basal level in the LMT-MPTP group. Interestingly, both external superior poles of the striata in the LMT-MPTP group exhibit the highest signal intensity as in the basal physiologic pattern. Scale bar = 200 μ m. Mean values $\pm$ SD are expressed in nCi/mg in the striatum (B) and the SN (C). Noteworthy, DAT density is reduced in the MPTP group ($*p < 0.01$ vs control level) and apparently normal in the LMT-MPTP group ($**p < 0.01$ vs MPTP level).

As shown in Figure 2C, the DAT expression was not significantly reduced in the SNpc of MPTP-intoxicated mice (1.89 ± 0.26 nCi/mg) compared with control mice (1.86 ± 0.31 nCi/mg).

Effect of VPA, TOP and LMT on TH immunoreactivity. The TH immunoreactivity was analyzed by optic density measurement in the striatum and the SNpc and subsequently confirmed in the SNpc by dopaminergic neurons count.

In the striatum, the TH immunoreactivity was significantly reduced in the MPTP group (91 ± 21 AU) versus the control group (164 ± 42 AU, $p = 0.005$). Compared with the MPTP group, this reduction was significantly blocked by the LMT treatment (140 ± 34 AU, $p = 0.008$), but not by VPA (79.5 ± 31 AU) or TOP (77 ± 12 AU) as shown in Figure 3A.

The TH immunostaining in the SNpc was statistically different between the MPTP intoxicated mice (68 ± 16 AU) and the control animals (112 ± 20 AU, $p = 0.005$). It remained at

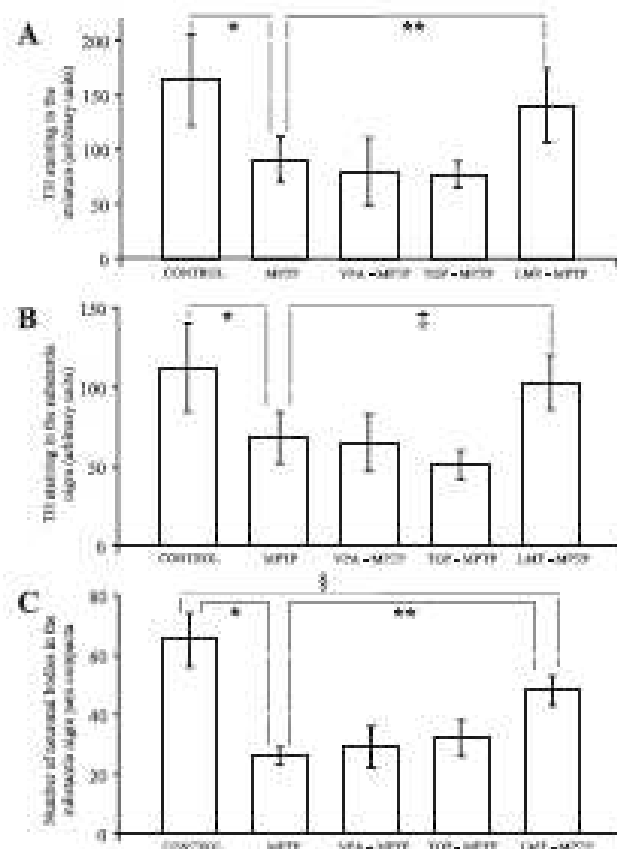


Figure 3. Effects of VPA, TOP and LMT on the TH immunostaining in the striatum and SN of C57Bl6 MPTP intoxicated mice compared with control animals ($n = 6$ in each group). Each histogram represents the mean $\pm$ SD of optic density in the striatum (A) and in the SN (B). In both areas, TH immunoreactivity is significantly reduced in the MPTP intoxicated group ($*p = 0.005$ vs control group) and apparently protected in the LMT-MPTP group ($**p < 0.01$ vs MPTP group in the striatum, $\S p = 0.005$ vs MPTP group in the SN). C) Effects of VPA, TOP and LMT on the MPTP-induced dopaminergic cell loss. The number of TH positive neurons was significantly reduced after MPTP intoxication ($*p = 0.005$ vs control group) but partially preserved in the LMT-MPTP group ($**p < 0.01$ vs MPTP group; $\S p < 0.01$ vs control group).

a low level in the VPA and the TOP treated mice (65 ± 18 AU in both groups) and was still significantly reduced versus control mice ($p = 0.005$). In contrast, the LMT treatment provided an apparent stability of the TH immunoreactivity (103 ± 17 AU). This level was higher than the one measured in the MPTP group ($p = 0.005$). The results are shown in Figure 3B.

The neurons count in the SNpc confirmed the optic density measurements: the number of TH positive neurons in the MPTP group (26 ± 3) was significantly lower than in the control group (65 ± 9 , $p = 0.005$). It was comparable in the VPA-MPTP and TOP-MPTP groups versus the MPTP group (29 ± 7 and 23 ± 5 neurons respectively) keeping lower than in the control group ($p = 0.005$). In the LMT-MPTP group, the number of TH positive neurons (48 ± 5) was higher than in the MPTP group ($p = 0.008$). These results are shown in Figure 3C. (Fig. 4).

Effect of LMT on DA content. MPTP intoxication caused a significant reduction in striatal DA content compared with the controls (MPTP: 0.88 ± 0.42 nmol/mg protein, control: 3.43 ± 0.83 nmol/mg protein, $p = 0.012$). In the LMT-MPTP group, the DA concentration was intermediary between the MPTP-intoxicated and control mice (1.98 ± 0.54 nmol/mg protein, $p = 0.022$ versus both MPTP and control).

Effect of LMT on MPTP induced apoptosis. MPTP-induced apoptosis was investigated with activated caspase 3 immunostaining in the control, MPTP and LMT-MPTP groups. No staining was seen in the control and the LMT-MPTP groups, whereas apoptosis was identified in the MPTP intoxicated mice (0.67 ± 0.27 neurons, $p = 0.0002$).

DISCUSSION

This study aimed to characterize the potential neuroprotective effects of VPA, TOP and LMT in the MPTP mouse model. MPTP inhibits the mitochondrial respiratory chain complex I and therefore provides, to some extent, a valuable tool to mimic the energy failure which occurs in various childhood conditions. The neuroprotective properties of these

anticonvulsants were evaluated through the DAT density, the TH and Caspase-3 immunoreactivities and the DA content within the nigro-striatal network.

MPTP induced a weight loss in all intoxicated groups, with a complete retrieval within a day. This might be caused by the multiple manipulations on D3 or by a direct MPTP effect (23).

In the MPTP-intoxicated mice striatum, the DAT expression was reduced to 51% of the control levels. A similar decrease was observed in other studies using comparable methods (24,25). In contrast, the DAT levels in the SN of the control and MPTP mice were not statistically different. Consequently, the anticonvulsant treatment impact on DAT density was not assessable in this area. This result is consistent with previous studies from our laboratory and others (6,26) and probably relies on the autoradiographies spatial resolution, which prevents discrete evaluation of small structures such as the SNpc.

Through OD measurement, we found a 45% TH immunoreactivity decrease in the striatum and a 40% decrease in the SNpc of the MPTP intoxicated mice. Our results are consistent with the literature (27) reporting a 45% decrease in these experimental conditions in mice. Dopaminergic neurons count in the SNpc showed an even greater decrease (60%) responsible for a residual neuronal count in the MPTP group, which represents 40% of the control level. The fact that the TH projections decrease in the striatum is lower than the dopaminergic neuronal death in the SNpc might reflect a compensatory TH over-expression in the remaining dopaminergic neurons through reactive sprouting. Such sprouting following MPTP has been already shown (26).

VPA enhances GABA release, inhibits sodium channels and stabilizes cell membranes (15). In accordance with a previous report (19), VPA did not provide neuroprotection in our study.

TOP carries anti-glutamatergic and pro-GABA properties, it inhibits calcium and sodium channels and it stabilizes cytoplasmic membranes (14,16). This anticonvulsant did not show neuroprotective effects in our study and even seemed deleterious concerning TH immunoreactivity. Moreover, astrocytes exposed to TOP release higher reactive oxygen species (28). Therefore, both TOP and MPTP can induce oxidative stress and this might explain the absence of neuroprotection in our experimental conditions. As far as we know, these results are original since TOP has never been tested in the MPTP mouse model.

LMT is a potent anti glutamatergic anticonvulsant with calcium channels inhibition properties. It also inhibits sodium channels and stabilizes neuronal plasmic membranes. In this study, LMT provided a neuroprotective effect in the MPTP mouse model. Jones-Humble has shown that a single 40 mg LMT dose, 2 h before MPTP intoxication, maintains normal DA striatal levels (20). Our results, based on DAT, TH, DA content and apoptosis analysis, confirm the LMT neuroprotective effect using complementary approaches which precise its mode of action.

LMT provided an apparent protection of DAT density in MPTP mice. These results could be explained by a striatal sprouting of the dopaminergic dendrites where DAT is highly expressed (29). After MPTP intoxication, a natural sprouting

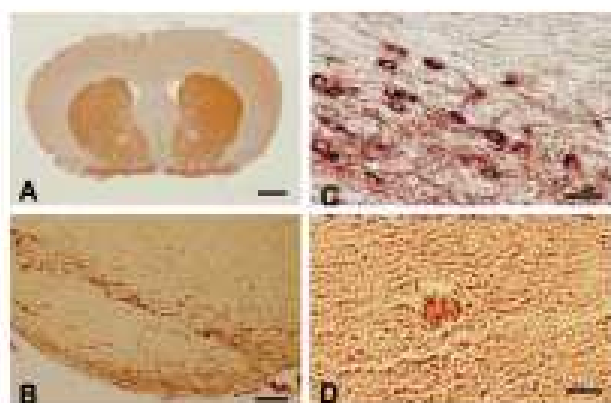


Figure 4. Representative microphotographs in the striatum (A) $\times 2.5$, scale bar: 500 μ m) and the SNpc of a control mouse brain section showing regular neuronal TH immunoreactivity (B) $\times 10$, scale bar: 200 μ m; (C) $\times 20$, scale bar: 50 μ m; (D) Representative microphotograph of active neuronal caspase-3 immunoreactivity from an MPTP intoxicated mice SNpc ($\times 40$, scale bar: 10 μ m).

occurs and concerns 10% of the dendrites (26,30). Thus, the near normal DAT level (99%) found in the LMT-MPTP mice (versus 51% in the MPTP group) is probably related to the anticonvulsant treatment and not only spontaneous. This result suggests that LMT promotes dopaminergic neurons sprouting in the striatum following energetic stress.

The residual dopaminergic neurons count, evaluated through TH immunoreactivity in the SNpc, was significantly higher (74% of the control levels) in the LMT-MPTP group than in the MPTP group (40%). Previous studies have shown the absence of spontaneous dopaminergic neurons recovery or recruitment after MPTP lesion (30,31). Therefore, the present results indicate that, under our experimental conditions, LMT significantly limited neuronal death in the SNpc. Our active caspase 3 staining study shows that this protection might occur through apoptosis inhibition.

Altogether, these data suggest that LMT limits dopaminergic neuronal death in the SNpc and promotes compensatory sprouting of the dendrites projections in the striatum.

In this model, the DA content decrease exceeds the neuronal loss due to MPTP-induced TH nitration (32). Conversely, such data indicate that TH phenotype rescue does not necessarily imply an active DA synthesis and, therefore, does not represent a reliable neuroprotection marker. Thus, we also analyzed DA production following LMT treatment. DA concentration is significantly higher in the LMT-MPTP group (58% of the control levels) than in the MPTP group (26%). This demonstrates that LMT maintains an active TH enzyme activity and not only a TH phenotype, which, thereby, confirms its neuroprotective property. LMT does not interact with monoamine oxidase B (33) and cytochrome P450 (34). Thus it is unlikely that LMT protects against MPTP toxicity through an increased MPP⁺ catabolism (9).

According to the working hypothesis of our study, several advances in the anticonvulsants mechanisms of action deserve to be outlined: VPA, which does not provide neuroprotection in experimental energetic stress conditions, does not act on the ATP dependant calcium channels (ADCC) (35). TOP, which apparently enhances dopaminergic cell death during energy deficiency, inhibits the L type ADCC but stimulates the PQ, N and R types (36). Conversely, LMT, which appears neuroprotective, inhibits the L, PQ, N and R types ADCC (37). Altogether, these data suggest that a wide range of ADCC types inhibition allows a significant ATP consumption braking which appears to be neuroprotective in energetic stress conditions. Presumably, this also prevents calcium overload that could, subsequently, promote the excitotoxic cascade.

In addition to its ATP dependent ion channels modulation properties, LMT might promote mitochondrial stability through its anti oxidant (39), anti excitotoxic (40) and anti apoptotic effects (41). LMT might also carry additional properties on the mitochondrial membrane permeability and/or the respiratory chain complexes activity, which have not been reported yet. In the 3-nitro-propionate model, where the mitochondrial complex II is targeted, LMT improves the cellular energy status (38). The fact that LMT is neuroprotective in several respiratory chain complex inhibition models suggests

that LMT could be beneficial in various types of mitochondrial stress.

In conclusion, LMT shows an appropriate combination of neuroprotective properties in the energy deficiency model generated with MPTP intoxication in young mice. LMT is a widely used and well-tolerated molecule in children, even under two years old (39). LMT could therefore represent an interesting adjuvant neuroprotective therapy to consider in energetic stress of the basal ganglia encountered in various childhood conditions.

Acknowledgments. The authors thank P. Eward and D. Guilleaume for support; M-C. Furon and M. Briand for technical assistance on animal experiments; Z. Gulhan and L. Gelineau for contributive support on HPLC-ED measurements; P. Meunier, E. Autret-Leca and G. Painsaud for pharmacological assistance on anticonvulsant preparation and serum dosage; L. Schwendemann, L. Tabone and F. Fétissol for precious help on paraffin embedding and caspase-3 immunohistochemistry; F-X. Griffoin and B. Giraudeau for expert contribution to the statistical analysis.

REFERENCES

1. Sandhu J-M, Chiquetier C 2001 Clinical phenotype: diagnosis/algorithms. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The metabolic and molecular bases of inherited disease. McGraw-Hill, New York, pp 337-400.
2. Grosjean J, Bessier MJ, de Vries LS 2005 Pre-natal degeneration in the neonatal brain following perinatal cerebral hypoxia-ischemia demonstrated with MRI. *Stroke* 36:146-150.
3. Olson JA, Horner F, Parkes LM, Feys P, Huet A, Sauer S, Hoffmann GF, Ueberschär K, Mayhew J, Kottler S 2002 Neurodegeneration in methylmalonic aciduria involves inhibition of complex II and the tricarboxylic acid cycle and synergistically acting excitotoxicity. *J Biol Chem* 277:14574-14580.
4. Cavanagh JB, Harding BN 1994 Pathogenic factors underlying the lesions in Leigh's disease. Tissue responses to cellular energy deprivation and their clinical-pathological consequences. *Brain* 117:1357-1376.
5. Shi LT, van der Knaap MS, Oosting J, de Vries LS, Lafont BA, Valk J 2000 MR patterns of hypoxic-ischemic brain damage after perinatal, perinatal or perinatal asphyxia. *Neuroradiology* 51:123-136.
6. Brown SE, Bowling AC, MacGarry U, Bask MJ, Berger SC, Mughal MM, Red ED, Red MF 1997 Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol* 41:546-553.
7. Red MF 2000 Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 23:290-304.
8. Schulz JB, Matthews RT, Henshaw DR, Red MF 1996 Neuroprotective strategies for treatment of lesions produced by mitochondrial toxins: implications for neurodegenerative diseases. *Neuroscience* 71:1043-1048.
9. Fumagalli S, Jackson-Lewis V, Djaldetti R, Liberatore G, Vila M, Valasek S, Astar G 2000 The parkinsonian toxin MPTP action and mechanism. *Exptl Neurol* 161:135-142.
10. Matthews RT, Jerome RJ, Kiviyi P, Yang L, Klein AM, Mueller G, Kaldani-Douk R, Red MF 1998 Creatine and cyclocreatine attenuate MPTP neurotoxicity. *Exp Neurol* 157:142-149.
11. Srivastava R, Brouillet E, Red MF, Storey E, Hyman BT 1993 Blockade of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) signal toxicity in the rat by prior deconvolution or MK-801 treatment: a stereological estimate of neuronal loss. *Neurobiol Aging* 14:289-301.
12. Aloni T, Barak O, Vardi R, Williams CE, Clark RG, Gluckman PD, Hughes PE 2003 Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's disease. *Prog Neurobiol* 69:409-470.
13. Olanowitch TP, Uryga J 1995 Glutamate release inhibitors: a critical assessment of their action mechanism. *Ann Rev Neurosci* 18:141-150.
14. Shink RP, Cardacki JF, Stricker AJ, Maryanoff BE 2000 An overview of the preclinical aspects of topiramate pharmacology, pharmacokinetics and mechanism of action. *Epilepsia* 41:53-59.
15. Löscher W 1999 Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanism of action. *Prog Neurobiol* 58:31-59.
16. White HS 2003 Mechanism of action of newer anticonvulsants. *J Clin Psychiatry* 64:5-8.
17. Kozak AP, Debnath-Vollstuber G, Vollstuber S, Elger CE, Rute WS 2004 The mechanism of neuroprotection by topiramate in an animal model of epilepsy. *Epilepsia* 45:1478-1487.
18. Yang Y, Li Q, Shushu A 2000 Enhanced neuroprotection and reduced hemorrhagic incidence in focal cerebral ischemia of rat by low dose combination therapy of arbutin and topiramate. *Neuropharmacology* 39:101-108.

C. Article soumis : Article 3: *Basal ganglia neuroprotection with anticonvulsants after energy stress : a comparative study.*

Nous avons souhaité après l'étude du valproate de sodium, du topiramate et de la lamotrigine élargir notre recherche de molécules neuroprotectrices à l'ensemble de la classe des antiépileptiques en utilisant la technique de marquage autoradiographique du DAT comme test. Parmi les molécules actuellement commercialisées, nous avons retenu celles qui ne présentaient pas d'interaction pharmacologique avec le MPTP au niveau de la MAO-B et du cytochrome P450. Nous avons ainsi testé le lévétiracétam, le vigabatrin, la gabapentine, la prégabaline, la tiagabine, le clonazépam. Seul le lévétiracétam avait déjà été testé dans le modèle MPTP chez le primate dans le but de réduire les dyskinésies post L-DOPA (Hill et al, 2003). Nous avons par ailleurs souhaité confirmer les résultats antérieurs en recherchant un effet dose de l'effet neuroprotecteur de la lamotrigine.

Parmi ces sept antiépileptiques, seule la lamotrigine a confirmé l'effet neuroprotecteur antérieurement démontré. De plus, l'étude aux posologies de 5 mg/kg, 20 mg/kg et 40 mg/kg a permis de caractériser un effet lié à la dose.

Il convient de noter que cinq de ces six nouvelles molécules testées (gabapentine, prégabaline, tiagabine, vigabatrin, clonazépam) ont pour mécanisme d'action principal un effet pro GABAergique qui ne semble donc pas constituer l'axe de neuroprotection à privilégier dans le modèle MPTP. Le mode d'action du lévétiracétam est quand à lui unique au sein de la classe des antiépileptiques : le lévétiracétam entraîne une diminution de la libération de neurotransmetteurs en présynaptique (Yang et al, 2003) et un impact sur la neurodégénération post MPTP semble donc difficile à évaluer. Aucune de ces molécules n'a pour mode d'action principal l'inhibition de canaux ionique ATP-dépendants au contraire de la lamotrigine. Cette voie d'épargne énergétique nous pourrait donc constituer un axe de neuroprotection à développer.

**BASAL GANGLIA NEUROPROTECTION WITH ANTICONVULSANTS
AFTER ENERGY STRESS : A COMPARATIVE STUDY**

Running title: Neuroprotection in a Leigh's Syndrome model

S. Arpin^{1,2}, E. Lagrue^{1,2,3}; S. Bodard¹; S. Chalon^{1,2}; P. Castelnau^{1,2,3*}

¹ UMRS INSERM U 930, CNRS ERL 3106, Imagerie et cerveau », Tours, France

² Université François Rabelais de Tours, Tours, France

³ CHRU de Tours, Pôle de Pédiatrie, Hôpital Clocheville, Tours, France

Category of study: short communication

Word count of abstract: 250 max

Word count of manuscript: 4000

Number of figures: 2

Number of references:

*** Corresponding author:**

Pr Pierre Castelnau, MD, PhD

Neuropédiatrie et UMRS 930 CNRS ERL 3106 « Imagerie et cerveau »

Laboratoire de Biophysique Médicale et Pharmaceutique

31 Avenue Monge, 37200 Tours, France

Phone: +33-(0)2 47367243

Fax: +33-(0)2 47367224

E-mail: castelnau@med.univ-tours.fr

ABSTRACT

The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) inhibits the mitochondrial complex I of the respiratory chain. This results in ATP and ion homeostasis disturbances, which lead to selective death of the substantia nigra dopaminergic neurons. Well known as a Parkinson's disease model, the MPTP animal model also provides a potential paradigm of the energy deficiencies found in childhood. In these conditions, anticonvulsants may provide neuroprotection by limiting cellular energy consumption. We tested 7 anticonvulsants: levetiracetam, vigabatrin, gabapentine, pregabalin, tiagabine, clonazepam and lamotrigine in the MPTP mouse model. Dopamine transporter (DAT) density was assessed by quantitative autoradiography. Unlike the other anticonvulsants, lamotrigine provided a significant neuroprotection against MPTP. Altogether, the data indicate that lamotrigine.... Lamotrigine, a widely used and well-tolerated molecule in young patients, could represent a valuable adjuvant therapy in various energy deficiency conditions during childhood.

KEY WORDS:

basal ganglia, mitochondria, MPTP, Leigh syndrome, neuroprotection, mouse, anticonvulsant

INTRODUCTION

Evidences from degenerative and metabolic encephalopathies studies indicate that the striatum and the substantia nigra (SN) are vulnerable structures in the brain, especially during pre and postnatal brain development [1, 2]. A partial or total destruction of this striato-nigral dopaminergic network is found in several conditions occurring in childhood such as iron or copper metabolism abnormalities [1], organic acidurias [3], urea cycle disorders, various mitochondrial energy production deficiencies including Leigh syndrome [1, 4], or hypoxia-ischemia [2, 5]. All these conditions witness the vulnerability of this particular deep nuclei network involved in multiple motor, sensory and cognitive functions.

These basal ganglia share a common susceptibility to energetic stress [6, 7], which can be studied experimentally using mitochondrial inhibitors [8]. Once converted into MPP⁺, the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) inhibits the mitochondrial electron transport chain at complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase) resulting in decreased oxygen consumption and ATP production and ion homeostasis disturbances which, together, lead to neuronal cell death [9]. This toxin depletes dopaminergic neurons in the SN and causes neuronal degeneration of the nigrostriatal pathway in animals and humans [9]. As recently shown by Lagrue *et al* [10], this intoxication is a reproducible pharmacological paradigm of Leigh syndrome, thus opening new avenues for neuroprotection research.

Several neuroprotection studies were performed in this MPTP mouse model using: energy sparing drugs; free radicals scavengers; anti-glutamatergic drugs; anti-apoptotic molecules and neurotrophines [11-13].

Anticonvulsants share several cell protective properties such as ATP-dependent ion channel inhibition, glutamate release inhibition and GABA release stimulation. We chose to test in the MPTP mouse model, anticonvulsants that operate on a large number of the pathological ways described above and which might spare energy through ion channels inhibition. ATP

dependent ion channels inhibition may indeed protect neurons as it adapts the cellular metabolism to the limited ATP availability during the energetic distress [14]. Moreover, current anticonvulsants carry now a reasonable tolerance profile in humans even in young children. Therefore, anticonvulsants provide good candidates for neuroprotection assays especially in energy stress conditions in childhood. We then chose to test all the anticonvulsants that could actually be used in the MPTP model, that is none of these drugs activate cytochrome P450 or monoamine oxidase B which interferes with MPP⁺ metabolism thereby reducing MPTP toxicity [9].

Among them, we tested levetiracetam (LVT), vigabatrin (VGT), gabapentine (GPT), pregabalin (PGB), tiagabine (TGB), clonazepam (CZP) and lamotrigine (LMT), each of which recapitulates these properties. None of them, except LMT, was ever tested in the MPTP mice model. GPT, VGT and TGB exhibit neuroprotective properties which were reported in other conditions such as status epilepticus and hypoxia-ischemia [15-17]. LVT, a relatively new anticonvulsant, tested by Gibbs *et al*, showed an interesting protection against mitochondrial dysfunction in hippocampus after status epilepticus [18]. In contrast, LMT could have neuroprotective properties when associated to MPTP administration [19]. However, the mechanism by which LMT provides this effect remains poorly understood.

In the present study, we examined through dopamine transporter (DAT), a specific dopaminergic marker, the neuroprotective properties of these anticonvulsants on MPTP-induced neurotoxicity in mice. As LMT showed marked neuroprotective properties in this model, we subsequently focused on this well tolerated anticonvulsant to identify a possible dose effect to determinate the active dose, which would be as closest as possible to the posology administered to human.

MATERIALS AND METHODS

All experiments were performed on consanguineous male C57/Bl6N@Rj mice (5 weeks old, average weight: 19 ± 1 g, CERJ, France) in accordance with the European Community Commission guidelines (86/609/EEC). The mice were kept under controlled conditions on a 12 hours light/dark cycle with food and water ad libitum. Since mature levels of monoamine oxidase B are required to convert MPTP into its active toxic form MPP⁺, younger animals were not used in the present study.

Anticonvulsant treatments

Ten groups (n = 6 per group) were constituted for DAT study: control (saline p.o. and i.p.), MPTP (saline p.o. - MPTP i.p.), GPT-MPTP (GPT p.o. - MPTP i.p.), CZP-MPTP (CZP p.o. - MPTP i.p.), VGT-MPTP (VGT p.o. - MPTP i.p.), LVT-MPTP (LVT p.o. - MPTP i.p.), PGB-MPTP (PGB p.o. - MPTP i.p.), TGB-MPTP (TGB p.o. - MPTP i.p.) and LMT-MPTP (LMT p.o. - MPTP i.p.). Each group was treated with the corresponding anticonvulsant twice a day p.o. from day 1 (D1) to day 7 (D7). The cumulative dose was 50 mg/kg/day for GPT (Neurontin®, Pfizer, France), 0,1 mg/kg/day for CZP (Rivotril®, Roche, France), 200 mg/kg/day for VGT (Sabril, Marion Merrell S.A, France), 1000 mg/kg/day for LVT (Keppra, Ucb SA, France), 10 mg/kg/day for PGB (Lyrica, Pfizer, France), 17 mg/kg/day for TGB (Gabitril, Cephalon, France) and 40 mg/kg/day for LMT (Lamictal®, GlaxoSmithKline, France). Each anticonvulsant was dissolved in saline to obtain a final 200µl volume of oral administration. Each mice was weighted daily.

MPTP intoxication

The mice were intoxicated with 4 administrations of MPTP (12.5 mg/kg) i.p. at 1 h intervals on D3. MPTP (Sigma, France) was dissolved in 0.9% sodium chloride to a final concentration

of 2.5 mg/ml (100µl injection / 20g mouse body weight). The control mice only received saline.

DAT autoradiographic studies

The mice were sacrificed by cervical dislocation 7 days after MPTP intoxication (i.e. 3 days after the end of the anticonvulsant treatment). The brains were rapidly removed, frozen (-35°C), subsequently cut into 20 µm coronal sections (Reichert-Jung Cryocut CM3000 Leica, France) and stored at -80 °C.

For binding studies, 3 sections/animal were incubated for 90 min at room temperature (RT) in a phosphate buffer containing [¹²⁵I]PE2I (100 pM) as previously described (21). Non specific binding was assessed on adjacent sections with the same buffer containing 1 µM cocaine (Cooper, France) and subtracted from total binding to yield specific binding. After rinsing and drying, the sections were exposed to sensitive films (Biomax MR, Kodak, France) with radioactive standard scales (¹²⁵I-microscales, Amersham Bioscience AB, UK). The films were analyzed through an image analyzer (Betavision, Biospace instruments, France) after identifying the substantia nigra pars compacta (SNpc) and striatum areas. The absorbance obtained was converted into apparent tissue ligand concentrations with reference to standards and specific activity of the radioligand (74 TBq/mmol). The intensity of [¹²⁵I] PE2I binding was expressed in nCi/mg of equivalent tissue (mean ± SD).

Statistical analysis (maJ)

Data were prospectively collected and analyzed with the Winks software (Texasoft, USA). Statistical significance was evaluated with the non parametric Mann-Whitney test for non paired values from small groups. Statistical significance was considered for $p < 0.05$.

RESULTS

Preliminary experiments were performed to monitor the impact of each anticonvulsant on mice survival and growth. Each animal group was compared to a reference group based on the strain characteristics from the mice provider. During the observation period, all the animals survived and the MPTP-induced transient weight loss at day 4 did not significantly affect the final animal weight as shown in Figure 1A. The brain mean weight was 0.4 ± 0.02 g in all groups.

The striatal DAT density was subsequently evaluated through autoradiography using the specific radio-labeled ligand [125 I]PE2I. In the LMT-MPTP group, the DAT level appeared macroscopically normal compared to the control mice. The Figure 1B shows representative micrographs from each animal group.

A semi-quantitative analysis showed a DAT level of 20 ± 1 Bq/mg in the MPTP-intoxicated mice compared to 38 ± 11 Bq/mg in the control group ($p=0.005$). The DAT density in the LMT-MPTP group (32 ± 6 Bq/mg) was comparable to the control group ($p=0.575$) but statistically different than in the MPTP intoxicated mice ($p=0.005$). No significant effect was found with any of the other anticonvulsants tested. The Figure 1C recapitulates the effect of each anticonvulsant as a percentage of the control group.

In order to identify a possible dose effect, we tested different LMT dosages. The DAT level reached 140 ± 44 Bq/mg in the MPTP-intoxicated mice compared to 215 ± 39 Bq/mg in the control group ($p=0.007$). The density in the MPTP-LMT mice group at 5, 20 and 40 mg/kg/day was respectively: 154 ± 27 Bq/mg, 192 ± 25 Bq/mg and 226 ± 19 Bq/mg. Therefore a significant neuroprotection was obtained at 20 mg/kg/day ($p=0.149$) and 40 mg/kg/day ($p=0.288$). The Figure 3 shows an histogram of this dose effect including representative micrographs of the corresponding striatum.

DISCUSSION

This study aimed to characterize the potential neuroprotective effects of all the anticonvulsants, which can be used in a mice model of Leigh syndrome, using the MPTP toxicity [10]. MPTP inhibits the mitochondrial respiratory chain complex I and therefore provides, to some extent, a valuable tool to mimic the energy failure which occurs in various childhood conditions including Leigh syndrome. The neuroprotective properties of these anticonvulsants were evaluated through the DAT density, within the nigro-striatal network.

MPTP induced a weight loss in all intoxicated groups, with a complete retrieval within a day. This might be caused by the multiple manipulations on D3 or by a direct MPTP effect [20].

In the MPTP-intoxicated mice striatum, the DAT expression was reduced to 47,37% of the control levels. A similar decrease was observed in other studies using comparable methods [21, 22]. In contrast, the DAT levels in the SN of the control and MPTP mice were not statistically different. Consequently, the anticonvulsant treatment impact on DAT density was not assessable in this area. This result is consistent with previous studies from our laboratory and others (6, 26) and probably relies on the autoradiographies spatial resolution, which prevents discrete evaluation of small structures such as the SNpc.

Our results are consistent with the literature [23] reporting a 45% decrease in these experimental conditions in mice.

LMT is a potent anti glutamatergic anticonvulsant with calcium channels inhibition properties. It also inhibits sodium channels and stabilizes neuronal plasmic membranes. In this study, LMT provided a neuroprotective effect in the MPTP mouse model. Lagrue *et al* had already shown the effectiveness of the LMT in the same model with the 40 mg/kg/day dosage and Jones-Humble pointed out that a single 40 mg LMT dose, 2 hours before MPTP intoxication, maintains normal DA striatal levels. [19].

Our results, based on DAT, confirm the LMT neuroprotective effect and show that in these particular experimental conditions, the other anticonvulsants do not bring satisfying neuroprotection to the striatum. As far as we know, these results are original since none of them had ever been tested in the MPTP mouse model. LMT provided an apparent protection of DAT density in MPTP mice. These results could be explained by a striatal sprouting of the dopaminergic dendrites where DAT is highly expressed (29). After MPTP intoxication, a natural sprouting occurs and concerns 10% of the dendrites (26, 30). Thus, the near normal DAT level (84,21%) found in the LMT-MPTP mice (versus 47,37% in the MPTP group) is probably related to the anticonvulsant treatment and not only spontaneous. This result suggests that LMT promotes dopaminergic neurons sprouting in the striatum following energetic stress. What Lagrue's results suggested, was that LMT limits dopaminergic neuronal death in the SNpc and promotes compensatory sprouting of the dendrites projections in the striatum [24].

In addition, LMT might promote mitochondrial stability through its anti oxidant [25], anti excitotoxic [26] and anti apoptotic effects [27]. LMT might also carry additional properties on the mitochondrial membrane permeability and/or the respiratory chain complexes activity which have not been reported yet. In the 3-nitro propionate model, where the mitochondrial complex II is targeted, LMT improves the cellular energy status [28]. The fact that LMT is neuroprotective in several respiratory chain complex inhibition models suggests that LMT could be beneficial in various types of mitochondrial stress.

The other fact our results pointed out is the presence of an obvious dose effect. Indeed, we showed a significant neuroprotection at 20 and 40 mg/kg/day contrary to the 5 mg/kg/day dosage. Jones-Humble had already pointed out the efficiency of a single 40 mg LMT dose; moreover, he showed that there was no more efficiency by use of a 100 mg/kg/day dosage[19].

In conclusion, LMT shows an appropriate combination of neuroprotective properties in the energy deficiency model generated with MPTP intoxication in young mice. LMT is a widely used and well tolerated molecule in children, even under two years old [25]. LMT could therefore represent an interesting adjuvant neuroprotective therapy to consider in energetic stress of the basal ganglia encountered in various childhood conditions and particularly in Leigh syndrome .

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank M-C. Furon for technical assistance with animal handling, L. Garreau, M-P. Vilar, and J. Vergotte for contributive support on experiments and B. Hoinard (orthographe?) for expert contribution to statistical analysis. The authors also thank F. Paillard for editing the manuscript. This work was supported by fellowships from Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and from the DRASS Région Centre, France to S. Arpin.

ABBREVIATIONS

ATP dependant calcium channel: ADCC

AU: arbitrary unit

DA: dopamine

DAT: dopamine transporter

LMT: lamotrigine

MPTP: 1-methyl-4-phenyl 1,2,3,6 tétrahydropyridine

RT: room temperature

SN: substantia nigra

SNpc: substantia nigra pars compacta

AE : anti-épileptique

ATP : adénosine tri phosphate

CZP : clonazépam (Rivotril®)

CR : chaîne respiratoire

DAT : dopamine transporter (transporteur de la dopamine)

DOPAC : acide dihydroxyphénylacétique

DS : déviation standard (écart type)

GABA : acide gamma-aminobutyrique

GPT : gabapentine (Neurontin®)

HVA : acide homovanillique

ip : intra péritonéal

LMT : lamotrigine (Lamictal®)

LVT : lévétiracétam (Keppra®)

MAO : monoamine oxydase (de type A ou B)

MPTP : 1-méthyl-4-phényl-1, 2, 3, 6 tétrahydropyridine

NGC : noyaux gris centraux

NP : neuroprotecteur

PBS : phosphate buffered saline (tampon phosphate salin)

PGB : prégabaline (Lyrica®)

RLZ : riluzole (Rilutec®)

SP : sérum physiologique

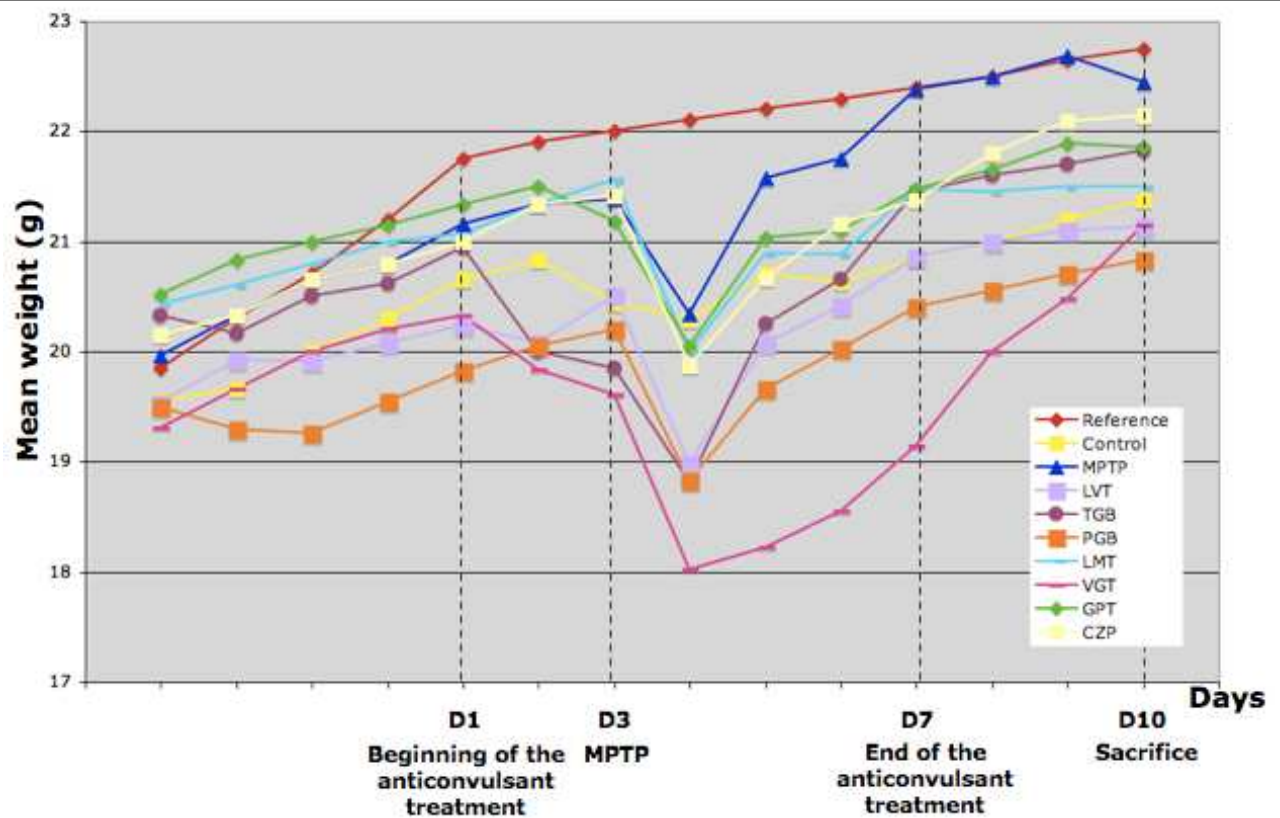
FIGURE LEGENDS

Figure 1:

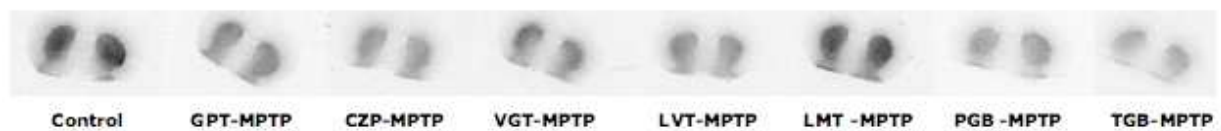
Effect of the anticonvulsant compared to the control and MPTP intoxicated mice groups (n=6 in each group - C57/Bl6 strain). **(A)** Mice growth curves during MPTP intoxication and anticonvulsant treatments. The mean weight *per* group is indicated at each time point. **(B)** Representative striatum autoradiographies of each mice group showing a macroscopically apparent preservation of the basal level in the LMT-MPTP group. Scale bar = 200 μ m **(C)** Effect of each anticonvulsant as a percentage of the control group.

Figure 2:

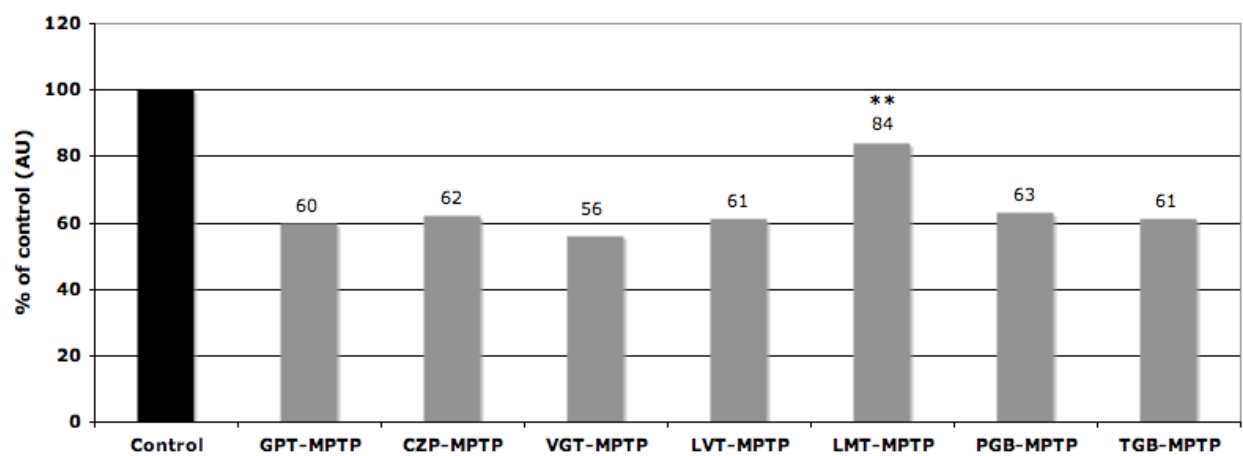
DAT density in control and MPTP intoxicated mice groups compared with the LMT treated groups, with different dosages (n=6 in each group - C57/Bl6 strain). **(A)** Representative striatum autoradiographies of each mice group showing a macroscopically apparent preservation of the basal level in the LMT20-MPTP and the LMT40-MPTP groups. Scale bar = 200 μ m. Mean values $\pm$ S.D. are expressed in Bq/mg. **(B)** Noteworthy, DAT density is reduced in the MPTP group versus control level (* : $p=0,007/0.014$)) and apparently normal in the LMT20-MPTP and LMT40-MPTP groups (** : respectively $p=0,028/0.055$ and $p=0,004 /0.008$ versus MPTP level).



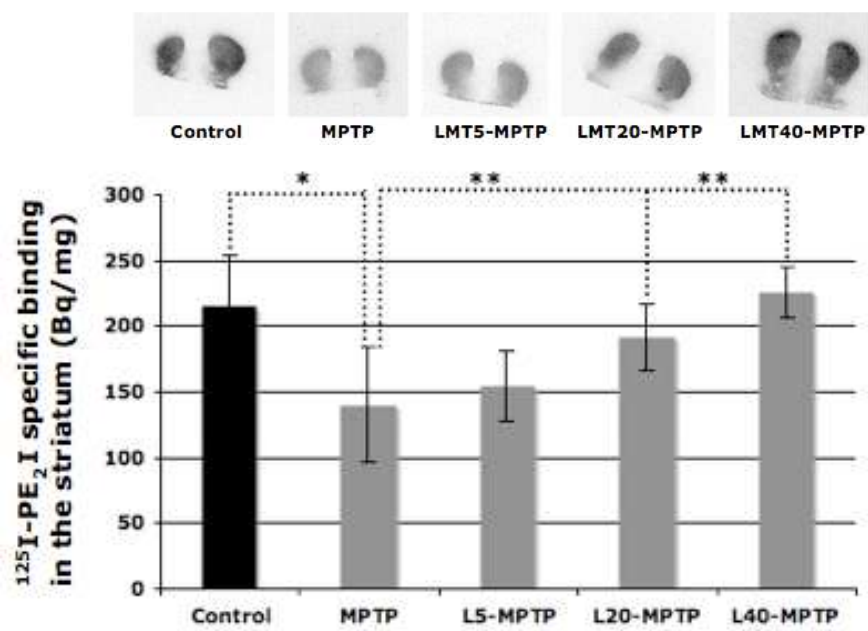
A



B



C



REFERENCES

1. Saudubray J-M, C.C., *Clinical phenotypes: diagnosis/algorithms*. In: *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D ed, ed. McGraw-Hill. 2001, New York. pp 327-400.
2. Groenendaal, F., M.J. Benders, and L.S. de Vries, *Pre-wallerian degeneration in the neonatal brain following perinatal cerebral hypoxia-ischemia demonstrated with MRI*. *Semin Perinatol*, 2006. 30(3): p. 146-50.
3. Okun, J.G., et al., *Neurodegeneration in methylmalonic aciduria involves inhibition of complex II and the tricarboxylic acid cycle, and synergistically acting excitotoxicity*. *J Biol Chem*, 2002. 277(17): p. 14674-80.
4. Cavanagh, J.B. and B.N. Harding, *Pathogenic factors underlying the lesions in Leigh's disease. Tissue responses to cellular energy deprivation and their clinico-pathological consequences*. *Brain*, 1994. 117 (Pt 6): p. 1357-76.
5. Sie, L.T., et al., *MR patterns of hypoxic-ischemic brain damage after prenatal, perinatal or postnatal asphyxia*. *Neuropediatrics*, 2000. 31(3): p. 128-36.
6. Browne, S.E., et al., *Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia*. *Ann Neurol*, 1997. 41(5): p. 646-53.
7. Beal, M.F., *Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases*. *Trends Neurosci*, 2000. 23(7): p. 298-304.
8. Schulz, J.B., et al., *Neuroprotective strategies for treatment of lesions produced by mitochondrial toxins: implications for neurodegenerative diseases*. *Neuroscience*, 1996. 71(4): p. 1043-8.
9. Przedborski, S., et al., *The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism*. *Restor Neurol Neurosci*, 2000. 16(2): p. 135-142.
10. Lagrue, E., et al., *MPTP intoxication in mice: a useful model of Leigh syndrome to study mitochondrial diseases in childhood*. *Metab Brain Dis*, 2008, in press.
11. Matthews, R.T., et al., *Creatine and cyclocreatine attenuate MPTP neurotoxicity*. *Exp Neurol*, 1999. 157(1): p. 142-9.
12. Srivastava, R., et al., *Blockade of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) nigral toxicity in the rat by prior decortication or MK-801 treatment: a stereological estimate of neuronal loss*. *Neurobiol Aging*, 1993. 14(4): p. 295-301.
13. Alexi, T., et al., *Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases*. *Prog Neurobiol*, 2000. 60(5): p. 409-70.
14. Obrenovitch, T.P. and J. Urenjak, *Glutamate release inhibitors: a critical assessment of their action mechanism*. *Amino Acids*, 1998. 14(1-3): p. 143-50.
15. Williams, A.J., et al., *Evaluation of gabapentin and ethosuximide for treatment of acute nonconvulsive seizures following ischemic brain injury in rats*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006. 318(3): p. 947-55.
16. Andre, V., et al., *Vigabatrin protects against hippocampal damage but is not antiepileptogenic in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy*. *Epilepsy Res*, 2001. 47(1-2): p. 99-117.
17. Iqbal, S., et al., *Neuroprotective effect of tiagabine in transient forebrain global ischemia: an in vivo microdialysis, behavioral, and histological study*. *Brain Res*, 2002. 946(2): p. 162-70.
18. Gibbs, J.E., M.C. Walker, and H.R. Cock, *Levetiracetam: antiepileptic properties and protective effects on mitochondrial dysfunction in experimental status epilepticus*. *Epilepsia*, 2006. 47(3): p. 469-78.
19. Jones-Humble, S.A., P.F. Morgan, and B.R. Cooper, *The novel anticonvulsant lamotrigine prevents dopamine depletion in C57 black mice in the MPTP animal model of Parkinson's disease*. *Life Sci*, 1994. 54(4): p. 245-52.
20. Ferger, B., et al., *Effects of nicotine on hydroxyl free radical formation in vitro and on MPTP-induced neurotoxicity in vivo*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1998. 358(3): p. 351-9.
21. D'Astous, M., M. Morissette, and T. Di Paolo, *Effect of estrogen receptor agonists treatment in MPTP mice: evidence of neuroprotection by an ER alpha agonist*. *Neuropharmacology*, 2004. 47(8): p. 1180-8.

22. Kilbourn, M.R., K. Kuszpit, and P. Sherman, *Rapid and differential losses of in vivo dopamine transporter (DAT) and vesicular monoamine transporter (VMAT2) radioligand binding in MPTP-treated mice*. Synapse, 2000. 35(4): p. 250-5.
23. Araki, T., et al., *Biochemical and immunohistological changes in the brain of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mouse*. Eur J Pharm Sci, 2001. 12(3): p. 231-8.
24. Lagrue, E., et al., *Lamotrigine is neuroprotective in the energy deficiency model of MPTP intoxicated mice*. Pediatr Res, 2007. 62(1): p. 14-9.
25. Serteser, M., et al., *Lipid peroxidation in rat brain during focal cerebral ischemia: prevention of malondialdehyde and lipid conjugated diene production by a novel antiepileptic, lamotrigine*. Neurotoxicology, 2002. 23(1): p. 111-9.
26. von Wegerer, J., et al., *A calcium antagonistic effect of the new antiepileptic drug lamotrigine*. Eur Neuropsychopharmacol, 1997. 7(2): p. 77-81.
27. Li, X., G.N. Bijur, and R.S. Jope, *Glycogen synthase kinase-3beta, mood stabilizers, and neuroprotection*. Bipolar Disord, 2002. 4(2): p. 137-44.
28. Lee, W.T., Y.Z. Shen, and C. Chang, *Neuroprotective effect of lamotrigine and MK-801 on rat brain lesions induced by 3-nitropropionic acid: evaluation by magnetic resonance imaging and in vivo proton magnetic resonance spectroscopy*. Neuroscience, 2000. 95(1): p. 89-95.

D. Article en préparation : Article 4: *Surface expression of Glut1, Pit1 and Pit2*

in normal and MPTP mouse brain as monitored by new metabolic markers.

L'article 4 est issu d'une collaboration avec l'équipe de Marc Sitbon dans le cadre d'un contrat d'interface INSERM-CHU dans l'unité de Neuropédiatrie dirigée par le Pr Castelnau au CHRU de Tours. L'équipe de Marc Sitbon a mis évidence que l'enveloppe du rétrovirus HTLV se liait au transporteur de glucose ubiquitaire GLUT-1 (Manel et al, 2003) et qu'un dérivé de l'enveloppe du virus HTLV étiqueté permettait de détecter la présence de ce transporteur membranaire à la surface de cellules (Kim et al, 2003) aussi bien en suspension cellulaire (par cytométrie de flux) que sur culture ou sur tissu (par immunofluorescence). Sachant que les protéines d'enveloppe de la plupart des rétrovirus gamma et delta constituent des transporteurs de nutriments chez l'homme, il a été développé selon le même principe des ligands qui permettent de détecter le transporteur du phosphate inorganique de type 1 et 2 ou le transporteur des acides aminés neutres par exemple. La mise en évidence de transporteurs de nutriments à la surface des cellules permettrait donc d'en établir un «phénotype métabolique» particulier à un instant donné. Ces nouveaux outils permettent d'envisager la possibilité de mieux préciser le métabolisme neuronal dans diverses situations normales et pathologiques.

Ainsi, nous avons souhaité déterminer si l'intoxication par le MPTP modifie l'expression du transporteur du glucose par utilisation du ligand à notre disposition. Notre hypothèse était que l'expression de GLUT-1 serait logiquement augmentée dans le striatum et la SN des souris après intoxication par le MPTP. L'inhibition de la phosphorylation oxydative constitue en effet selon la littérature un signal d'augmentation d'expression de GLUT-1 de même que la diminution de la glycémie (von der Crone et al, 2000), l'augmentation du TNF α (McGowan et al, 1997), la libération de neurotrophines (Boado, 2001) et l'hypoxie-ischémie (Vannucci et al, 1996).

Pour le moment, cette étude n'a pas permis à ce jour de confirmer notre hypothèse de départ. Une expression faible et diffuse du transporteur du glucose a été mise en évidence dans le striatum et la SN sans modification visible du profil d'expression après administration du MPTP. Nous avons par ailleurs caractérisé un marquage cellulaire dans le cortex (la nature neuronale de ces cellules doit être confirmée par la réalisation d'un co-marquage avec un anticorps neuronal), ainsi qu'un marquage des oligodendrocytes de la substance blanche.

Au total, l'utilisation de nouveaux marqueurs rétroviraux semble constituer un outil prometteur d'évaluation du statut métabolique cellulaire. L'application de cette technique dans le cadre de notre modèle MPTP nécessite d'être perfectionnée afin d'obtenir une localisation plus précise des structures constitutives du réseau nigro-strié. Un manuscrit à ce sujet est en préparation.

Surface expression of Glut1, Pit1 and Pit2 in normal and MPTP mouse brain as monitored by new metabolic markers

E. Lagrue^{1,2,3}; H. Abe⁴; L. Madakasira⁴; J. Touhami⁴; S. Chalon^{1,2};

M. Sitbon⁴; P. Castelnau^{1,2,3*}

¹ UMRS INSERM U 930, CNRS ERL 3106, Imagerie et cerveau », Tours, France

² Université François Rabelais de Tours, Tours, France

³ CHRU de Tours, Pôle de Pédiatrie, Hôpital Clocheville, Tours, France

⁴ Université Montpellier 2 Université Montpellier 1 CNRS, Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, UMR5535, IFR122, Montpellier, France

*** Corresponding author:**

Pr Pierre Castelnau, MD, PhD

Neuropédiatrie et UMRS 930 CNRS ERL 3106 « Imagerie et cerveau »

Laboratoire de Biophysique Médicale et Pharmaceutique

31 Avenue Monge, 37200 Tours, France

Phone: +33-(0)2 47367243

Fax: +33-(0)2 47367224

E-mail: castelnau@med.univ-tours.fr

ABBREVIATIONS:

ARBD	Amphotropic murine leukemia virus-RBD
BBB	Blood-brain barrier
CC	Corpus callosum
Env	Envelope glycoprotein receptor
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
GFP	Green fluorescent protein
GLUT-1	Glucose transporter type 1
GRBD	Gibbon ape leukemia virus-RBD
HTLV	Human T-cell leukemia virus
H ₂ RBD	HTLV-2-RBD
LS	Leigh syndrome
MLV	Murine leukemia retrovirus
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine
PBS	Phosphate Buffer Saline
Pit	Inorganic phosphate transporter
RBD	Receptor binding domain
RC	Respiratory chain
rFc	Fc region of rabbit IgG
RT	Room temperature
SN	Substantia nigra
SU	Extracellular surface component

INTRODUCTION:

Nutrient transporters are key molecules that regulate cell growth and survival by controlling intracellular levels of nutrients. Their expression varies within several pathophysiological states, indirectly reflecting these nutrients metabolism. Among all the nutrients, facilitative glucose transport is mediated by one of the members of the glucose transporter (GLUT) family. GLUT-1, the most expressed isoform, is the primary glucose transporter across the blood-brain barrier (BBB) in human. GLUT-3 is expressed in neurons and GLUT-5 in the microglia, the rest of the transporter family (GLUT-2, 4, 7) being detected at lower levels and confined to more discrete regions of the brain (Dwyer et al, 2002). GLUT-1 is also responsible for the mitochondrial import of vitamin C in the erythrocytes (KC S et al, 2005) and the uptake of some neuro active drugs through the BBB (Guo et al, 2005). GLUT-1 expression is modulated in animal models by glucose deprivation (von der Crone et al, 2000), hypoxia (Boado and Pardridge, 2002), hypoxia-ischemia (Vannucci et al, 1996), thermal injury (Gamelli et al, 1994), and mitochondrial inhibitors (Ebert et al, 1995). In human pathological conditions, GLUT-1 expression is decreased in the brain of patients with Alzheimer's disease (Liu et al, 2008) and Huntington's disease (Gamberino et Brennan, 1994) and over expressed in numerous tumors (Younes et al, 1996).

GLUT1 has been shown to be the Human T-cell leukemia virus (HTLV) envelope (Env) receptor (Manel et al, 2003). HTLV-2 Env receptor-binding domain (RBD) have then been expressed in and secreted from eukaryotic cells in functional soluble amino terminal-tagged fusion proteins (H₂RBD). The H₂RBD therefore constitutes a natural extracellular ligand available for the evaluation of GLUT-1 surface expression and intracellular trafficking in various tissues (Kim et al, 2004).

Based on the same scheme, since many nutrient transporters are receptors for gamma and delta retroviruses, immunoadhesins from several retroviral envelope glycoproteins were

derived to serve as new tools for the detection and the study of their cognate transporters. For example, the gibbon ape leukemia virus-RBD (GRBD) was derived as the inorganic phosphate transporter type 1 (Pit1), the amphotropic murine leukemia virus-RBD (ARBD) as the Na-dependent phosphate transporter 2 (Pit2), the feline leukemia type C virus-RBD as the heme exporter, the murine leukemia virus RD114-RBD as the neutral amino acid transporter ASCT2.

As said earlier, all these nutrient transporters can be used as metabolic markers in order to assess a cellular “metabolic phenotype” under various conditions. This work aimed at evaluating the GLUT-1, Pit1 and Pit2 surface expression in the brain of normal and 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mice. We previously proved the MPTP mouse model to be a reliable Leigh Syndrome (LS) model (Lagrue et al, 2007). LS is the most frequent mitochondrial disorder in childhood. LS diagnostic criteria include a progressive neurological disease with motor and intellectual developmental delay, hypotonia, movement disorders, brainstem and/or basal ganglia degeneration and often increased lactate levels in blood and /or cerebrospinal fluid (Bernier et al, 2002). LS always arises from a deficiency in energy production in the mitochondria, secondary to an alteration or deficiency of the pyruvate deshydrogenase complex, the pyruvate carboxylase or a respiratory chain (RC) complex. Deficiencies of a RC complex are frequently due to mutations in genes coding for proteins of the mitochondrial RC complex I or IV (Malfatti et al, 2007; Lebon et al, 2007).

We intended to establish the distinctive distribution of GLUT-1, Pit1 and Pit2 in several regions of the brain in young mice (frontal cortex, corpus callosum, hippocampus, striatum, substantia nigra (SN)) using these new metabolic markers. We also aimed to determine if the energetic depletion secondary to the mitochondrial dysfunction elicited by the MPTP intoxication modulates the expression of GLUT-1 in our LS model.

METHODS :

Generation of H₂RBD, GRBD and ARBD fusion proteins

H₂RBD, GRBD and ARBD fusion proteins were generated as described in previous works (Kinet et al, 2007; Kim et al, 2003). The construct of a pCSI expression vector encoding the amino terminal 215 amino acids of the extracellular surface component (SU) region of HTLV Env comprising the signal peptide and the SU RBD fused to a carboxy-terminal rabbit immunoglobulin Fc (rFc) tag was generated and is herein referred to as HRBD. A similar construct comprising the N-terminal 379 amino acids of the MLV Env SU and fused to the carboxy-terminal rFc tag was also generated and is herein referred to as ARBD.

HRBD, ARBD, and GRBD proteins were produced by transfecting 293 T cells with the appropriate constructs or with the empty control vector using the calcium phosphate method (Manel et al, 2003). After transfection, cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and fresh medium without PBS was added. Media containing the various soluble RBDs were harvested 2 days later and clarified by filtration (0.45 µm) to remove cell debris. The supernatants were concentrated 12-fold using an iCon Concentrator 20 ml/9K spin column (Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA). HRBD and mock-transfected supernatants were frozen at -20°C until use.

Animals

All experiments were performed on consanguineous male C57/BL6N@Rj mice (5 weeks old, average weight: 19 ± 1 g (CERJ, Le Genest St Isle, France) with 6 mice per group. This strain is highly susceptible to MPTP neurotoxicity. All mice experiments were carried out in compliance with appropriate European Community Commission directive guidelines (86/609/EEC). The mice were kept under environmentally controlled conditions (room

temperature (RT) = $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, humidity = $40.3 \pm 7.1\%$) on a 12-hour light/dark cycle with food and water *ad libitum*.

MPTP intoxication

The mice (n = 6 per group) were intoxicated with 4 administrations of MPTP (12.5 mg/kg) ip at 1-hour intervals on a single day. MPTP (Sigma, France) was dissolved in 0.9% sodium chloride to a final concentration of 2.5 mg/ml (100 μL injection per 20 g body weight). The control mice (n = 6 per group) were injected 4 times with saline.

Immunofluorescence

For H₂RBD, GRBD and ARBD incubation, we used cryosections from mice sacrificed by cervical dislocation 7 days after MPTP intoxication. The brains were rapidly removed and frozen in isopentane (-35°C). Twenty- μm coronal sections were cut with a cryostat microtome (Reichert-Jung Cryocut CM3000 Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France), collected on Super Frost Plus slides (Menzel Gläser, Braunschweig, Germany), and stored at -80°C . After fixation with 100% ethanol at room temperature (RT), the sections were blocked with normal goat serum and endogenous biotin blocking reagent (Biotin blocking system, Dako, Via Real, CA, USA) prior to the incubation with either HRBD (ligand for GLUT-1), GRBD (ligand for Pit1) or ARBD (ligand for Pit2). The sections were incubated with the aforementioned probes for 30 minutes at 37°C . The sections were further incubated with biotinylated anti-rabbit IgG (dilution 1/200) (Vectastain Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for one hour at RT, followed by incubation with streptavidine-Alexa 488 (10 $\mu\text{g/ml}$) 30 minutes at RT, Hoechst 33342 (1 mM) (labelling for cell nucleus) and cell Trace BODIPYBODIPY TR methyl ester (5 $\mu\text{g/ml}$) (labelling for intracellular membranes) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 10 minutes at RT.

Deconvolution parameters

Brain sections were scanned with an Axio Imager Z1 upright microscope (Zeiss, Le Pecq, France). The excitation / emission filter sets specific for each of the fluorescent antibodies were as follows: 360 nm excitation filter and 470 nm emission filter for DAPI (nucleus), 473 nm excitation filter and 525 nm emission filter for GFP, 480 nm excitation filter and 527 nm emission filter for FITC (cell membranes). Image scans for each probe were acquired in z-series at a step-size of 3 μm with a specimen magnification 200x. Deconvolution was performed through Huygens professional software (Montpellier RIO imaging facility) with 0% background offset in order to avoid artificially decreased signals. An image projection was produced by stacking each of the individual z sections of all 3 fluorescent probes into one image, resulting in a three-dimensional end product and an overlay of all colours (Image J software, (Rasband, 2008)) Maximum intensity projection method was used with the same display range for each colour for all the images.

RESULTS :

GLUT-1, Pit1 and Pit2 distribution in the cortex

GLUT-1 staining in the cortex was irregular within layer I to IV. Layer I exhibited a low cellular density. All the neuronal cells in this layer were stained. Layer II/III displayed a higher cellular density with all the neurons being stained in their cytoplasm. However, the staining intensity was different from one cell to another. Two distinct cellular populations with a cytoplasmic staining were identified in layer IV. The morphologic aspect of these cells identified them as stellate interneurons and large pyramidal cells.

PiT1 staining in the cortex also differed within layer I to IV. Stained neurons were only detected in layer II/III. They were medium-sized with a cytoplasmic and homogeneous staining. PiT2 staining was different from GLUT-1 and Pit1 staining. The staining was

detected in layer I to IV and was exclusively peripheral with a “rosette like” aspect. The staining intensity was brighter in layer II/III. Representative microphotographs of GLUT-1, Pit1 and Pit2 immunostaining in the cortex are shown in Fig. 1.

GLUT-1, Pit1 and Pit2 distribution in the corpus callosum

Few GLUT-1-stained cells were seen in the corpus callosum (CC) with a weak staining compared to the cortex and striatum. No Pit2 staining was observed in the CC. Concerning these two markers, perivascular cells were strongly labelled.

Pit1-stained cells were present in the CC. Pit1 staining exhibited a linear pattern within the CC with stained cells following the myelinated fibre bundles identifying them as oligodendrocytes. Representative microphotographs of GLUT-1, Pit1 and Pit2 immunostaining in the corpus callosum are shown in Fig. 2.

GLUT-1, Pit1 and Pit2 distribution in the hippocampal dentate gyrus

The three layers (granular layer, molecular layer, polymorph / hilar layer) were differentially stained. In the granular layer, GLUT-1 staining was lacking whereas Pit1 staining was intermediate and Pit2 staining was intense and homogeneous. The polymorph and molecular layers were uniformly stained with GLUT-1 and Pit2 at a low level without any cellular signal. On the contrary, Pit1 staining exhibited a cellular pattern in these layers with all the cellular bodies stained. Representative microphotographs of GLUT-1, Pit1 and Pit2 immunostaining in the hippocampal dentate gyrus are shown in Fig. 3.

GLUT-1, Pit1 and Pit2 distribution in the striatum

GLUT-1 and Pit1 staining in the striatum was weak and homogeneous. Pit1 was also detected in few cellular bodies (4-5 cells in each striatum) and some staining was cell-independent.

Pit2 staining was different with a “rosette like” pattern similar to the cortex in addition to the diffuse and intense staining in all this structure. Noteworthy, the white matter tracts were not stained with any of the three markers. Representative microphotographs of GLUT-1, Pit1 and Pit2 immunostaining in the striatum are shown in Fig. 4.

GLUT-1, Pit1 and Pit2 distribution in the substantia nigra

No cellular GLUT-1 staining was detected in the SN, the structure being weakly and diffusely stained. Pit1 staining exhibited a reticular pattern with cellular bodies intensely stained. Pit2 staining was comparable to the patterns observed in the cortex and the striatum with a “rosette like” aspect.

As observed previously, the cerebral peduncle (white matter) did not show any GLUT-1 or Pit2 staining, whereas several oligodendrocytes were detected through Pit1 staining. Representative microphotographs of GLUT-1, Pit1 and Pit2 immunostaining in the SN are shown in Fig. 5.

MPTP intoxication

GLUT-1, Pit1 and Pit2 expression were not modulated in the cortex, the CC, the hippocampal dentate gyrus and the striatum after MPTP administration. In the SN pars reticulata, GLUT-1 staining and Pit2 staining were unchanged: GLUT-1 staining remained weak and diffuse and Pit2 staining still exhibited a “rosette like” aspect. On the contrary, Pit1 expression pattern in the SN of MPTP-mice was different from the one seen in non intoxicated mice. The reticular pattern noticed in normal mice was no more detected though numerous stained cells were still remaining. Representative microphotographs of Pit1 immunostaining in the SN of normal and MPTP-treated mice are shown in Fig. 6.

REFERENCES :

- Bernier FP, Boneh A, Dennett X, Chow CW, Cleary MA, Thorburn DR. Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology*. 2002 Nov 12; 59(9):1406-11.
- Boado RJ, Pardridge WM. Glucose deprivation and hypoxia increase the expression of the GLUT1 glucose transporter via a specific mRNA cis-acting regulatory element. *J Neurochem*. 2002 Feb; 80(3):552-4.
- Dwyer DS, Vannucci SJ, Simpson IA. Expression, regulation, and functional role of glucose transporters (GLUTs) in brain. *Int Rev Neurobiol*. 2002; 51:159-88.
- Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *J Biol Chem*. 1995 Dec 8; 270(49):29083-9.
- Gamberino WC, Brennan WA Jr. Glucose transporter isoform expression in Huntington's disease brain. *J Neurochem*. 1994 Oct; 63(4):1392-7.
- Gamelli RL, Liu H, He LK, Hofmann CA. Alterations of glucose transporter mRNA and protein levels in brain following thermal injury and sepsis in mice. *Shock*. 1994 Jun; 1(6):395-400.
- Guo X, Geng M, Du G. Glucose transporter 1, distribution in the brain and in neural disorders: its relationship with transport of neuroactive drugs through the blood-brain barrier. *Biochem Genet*. 2005 Apr; 43(3-4):175-87.
- KC S, Cárcamo JM, Golde DW. Vitamin C enters mitochondria via facilitative glucose transporter 1 (Glut1) and confers mitochondrial protection against oxidative injury. *FASEB J*. 2005 Oct; 19(12):1657-67.
- Kim FJ, Manel N, Garrido EN, Valle C, Sitbon M, Battini JL. HTLV-1 and -2 envelope SU subdomains and critical determinants in receptor binding. *Retrovirology*. 2004 Dec 2; 1:41.
- Kinet S, Swainson L, Lavanya M, Mongellaz C, Montel-Hagen A, Craveiro M, Manel N, Battini JL, Sitbon M, Taylor N. Isolated receptor binding domains of HTLV-1 and HTLV-2 envelopes bind Glut-1 on activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Retrovirology*. 2007 May 15; 4:31.

- Lagrué E, Chalon S, Bodard S, Saliba E, Gressens P, Castelnau P. Lamotrigine is neuroprotective in the energy deficiency model of MPTP intoxicated mice. *Pediatr Res.* 2007 Jul; 62(1):14-9.
- Lebon S, Minai L, Chretien D, Corcos J, Serre V, Kadhon N, Steffann J, Pauchard JY, Munnich A, Bonnefont JP, Rötig A. A novel mutation of the NDUFS7 gene leads to activation of a cryptic exon and impaired assembly of mitochondrial complex I in a patient with Leigh syndrome. *Mol Genet Metab.* 2007 Sep-Oct; 92(1-2):104-8.
- Liu Y, Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX. Decreased glucose transporters correlate to abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer disease. *FEBS Lett.* 2008 Jan 23; 582(2):359-64.
- Manel N, Kim FJ, Kinet S, Taylor N, Sitbon M, Battini JL. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell.* 2003 Nov 14; 115(4):449-59.
- Malfatti E, Bugiani M, Invernizzi F, de Souza CF, Farina L, Carrara F, Lamantea E, Antozzi C, Confalonieri P, Sanseverino MT, Giugliani R, Uziel G, Zeviani M. Novel mutations of ND genes in complex I deficiency associated with mitochondrial encephalopathy. *Brain.* 2007 Jul; 130(Pt 7):1894-904.
- Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2008.
- Vannucci SJ, Seaman LB, Vannucci RC. Effects of hypoxia-ischemia on GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in immature rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996 Jan; 16(1):77-81.
- Von der Crone S, Deppe C, Barthel A, Sasson S, Joost HG, Schürmann A. Glucose deprivation induces Akt-dependent synthesis and incorporation of GLUT1, but not of GLUT4, into the plasma membrane of 3T3-L1 adipocytes. *Eur J Cell Biol.* 2000 Dec; 79(12):943-9.
- Younes M, Lechago LV, Somoano JR, Mosharaf M, Lechago J. Wide expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in human cancers. *Cancer Res.* 1996 Mar 1; 56(5):1164-7.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Representative microphotographs of GLUT-1(photograph 1), Pit1 (photograph 2) and PiT2 (photograph 3) immunostaining in the cortex. A: specific staining / GFP, B: Cell Trace Bodipy (membrane lipids), C: Hoechst (nuclei), D: GFP + Hoechst, E: GFP + Cell Trace Bodipy, E: Hoechst + Cell Trace Bodipy. Scale bar: 100 μm (photograph 1), 75 μm (photographs 2 and 3).

Concerning GLUT-1 staining, layer I to IV were distinguishable depending on the cellular density. Layer IV included two cellular populations with cytoplasmic staining (first population: stellate interneurons, second population: large pyramidal neurons). Cells in layer I and II/III also exhibited a cytoplasmic staining pattern (Photographs 1). Pit1 staining was only detected in layer II/III within medium-sized cells that were homogeneously stained in their cytoplasm (Photographs 2). Pit2 staining exhibited a “rosette like” aspect predominantly located in layer II/III (Photographs 3).

Figure 2: Representative microphotographs of GLUT-1(photograph 1), Pit1 (photograph 2) and PiT2 (photograph 3) staining in the corpus callosum. A: specific staining / GFP, B: Cell Trace Bodipy (membrane lipids), C: Hoechst (nuclei), D: GFP + Hoechst, E: GFP + Cell Trace Bodipy, E: Hoechst + Cell Trace Bodipy. Scale bar: 125 μm (photograph 1 and 3), 200 μm (photographs 2).

Few GLUT-1-stained cells were seen in the corpus callosum with a weak staining compared to the cortex and striatum. Pit2 staining was only detected in perivascular cells (see arrows photograph 2A and 2D). Pit1 staining exhibited a linear pattern within the CC with stained oligodendrocytes following the myelinated fibre bundles.

Figure 3: Representative microphotographs of GLUT-1(photograph 1), Pit1 (photograph 2) and PiT2 (photograph 3) staining in the hippocampal dentate gyrus. A: specific staining / GFP, B: Cell Trace Bodipy (membrane lipids), C: Hoechst (nuclei), D: GFP + Hoechst, E: GFP + Cell Trace Bodipy, E: Hoechst + Cell Trace Bodipy. Scale bar: 100 μm . Gr: granular layer, Po: polymorph layer, Mo: molecular layer.

In the granular layer, GLUT-1 staining was lacking whereas PiT1 staining was intermediate and Pit2 staining was intense and homogeneous. The polymorph and molecular layers were uniformly stained with GLUT-1 and Pit2 at a low level without any cellular signal. On the

contrary, Pit1 staining exhibited a cellular pattern in these layers with all the cellular bodies stained.

Figure 4: Representative microphotographs of GLUT-1(photograph 1), Pit1 (photograph 2) and Pit2 (photograph 3) staining in the striatum. A: specific staining / GFP, B: Cell Trace Bodipy (membrane lipids), C: Hoechst (nuclei), D: GFP + Hoechst, E: GFP + Cell Trace Bodipy, E: Hoechst + Cell Trace Bodipy. Scale bar: 75 μ m.

GLUT-1 and Pit1 staining in the striatum was weak and homogeneous. Pit1 was also detected in few cellular bodies (4-5 cells in each striatum) (see arrows photograph 2D) and some staining was cell-independent. Pit2 staining was different with a “rosette like” pattern similar to the cortex in addition to the diffuse and intense staining in all this structure. Noteworthy, the white matter tracts were not stained with any of the three markers.

Figure 5: Representative microphotographs of GLUT-1(photograph 1), Pit1 (photograph 2) and Pit2 (photograph 3) staining in the substantia nigra. A: specific staining / GFP, B: Cell Trace Bodipy (membrane lipids), C: Hoechst (nuclei), D: GFP + Hoechst, E: GFP + Cell Trace Bodipy, E: Hoechst + Cell Trace Bodipy. Scale bar: 100 μ m.

No cellular GLUT-1 staining was detected in the SN, the structure being weakly and diffusely stained. Pit1 staining exhibited a reticular pattern with cellular bodies intensely stained. Pit2 staining was comparable to the patterns observed in the cortex and the striatum with a “rosette like” aspect.

Figure 6: Representative microphotographs of Pit1 immunostaining in the substantia nigra of normal (photograph 1) and MPTP-treated mice (photograph 2). A: specific staining / GFP, B: Cell Trace Bodipy (membrane lipids), C: Hoechst (nuclei), D: GFP + Hoechst, E: GFP + Cell Trace Bodipy, E: Hoechst + Cell Trace Bodipy. Scale bar: 100 μ m.

Pit1 expression pattern in the SN of MPTP-mice was different from the one seen in non intoxicated mice. The reticular pattern noticed in normal mice was no more detected though numerous stained cells were still remaining.

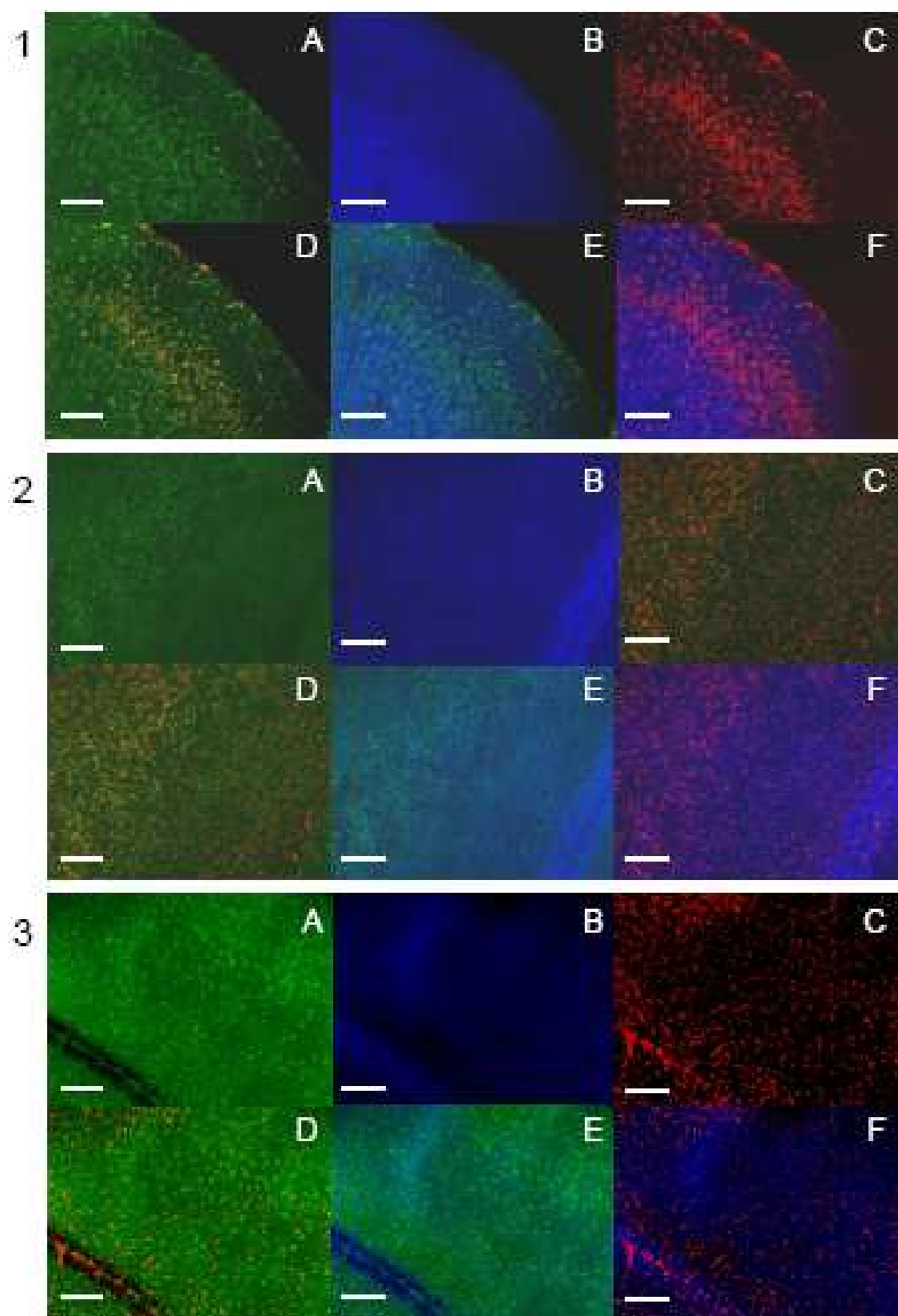


Figure 1

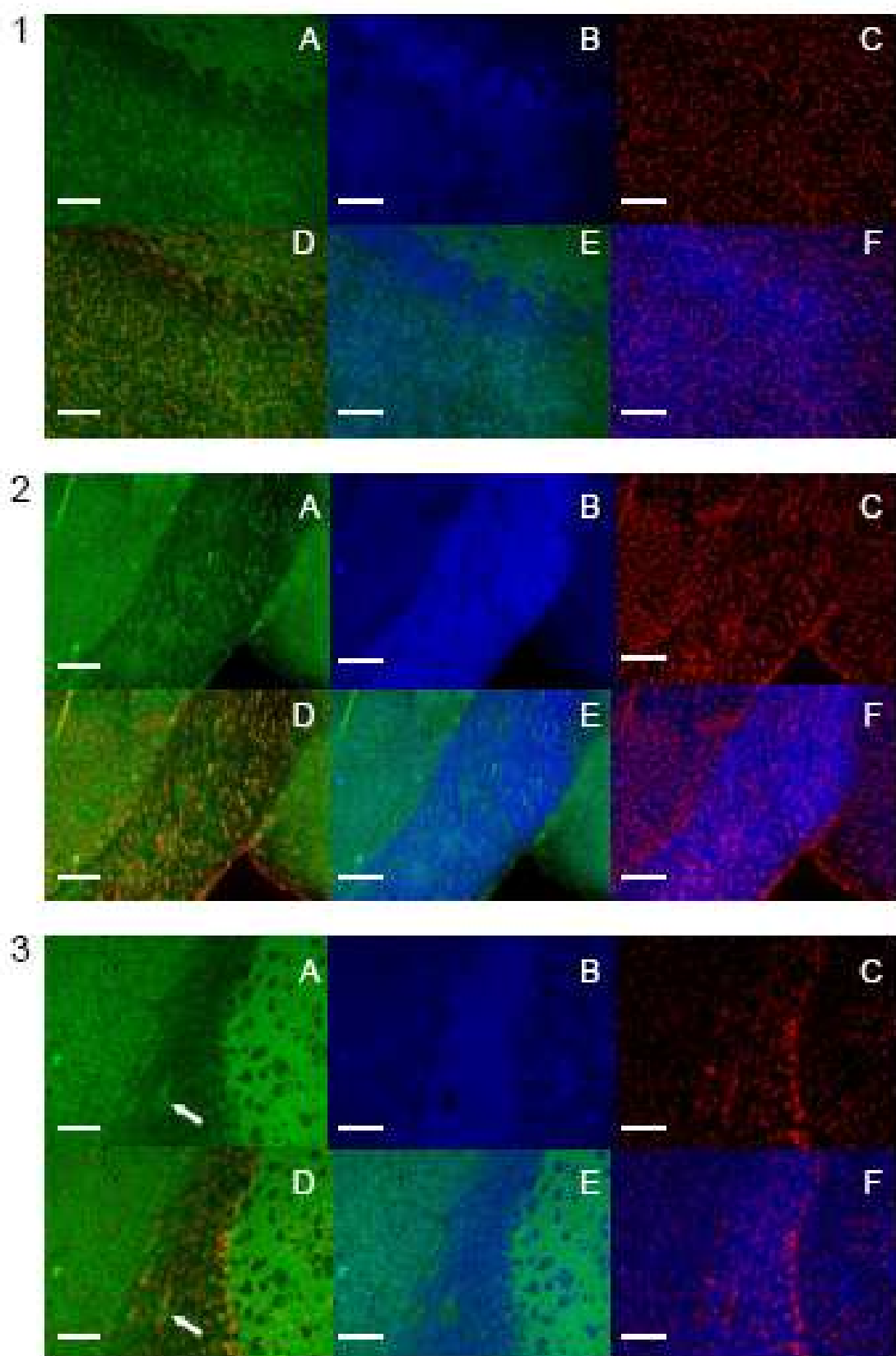


Figure 2

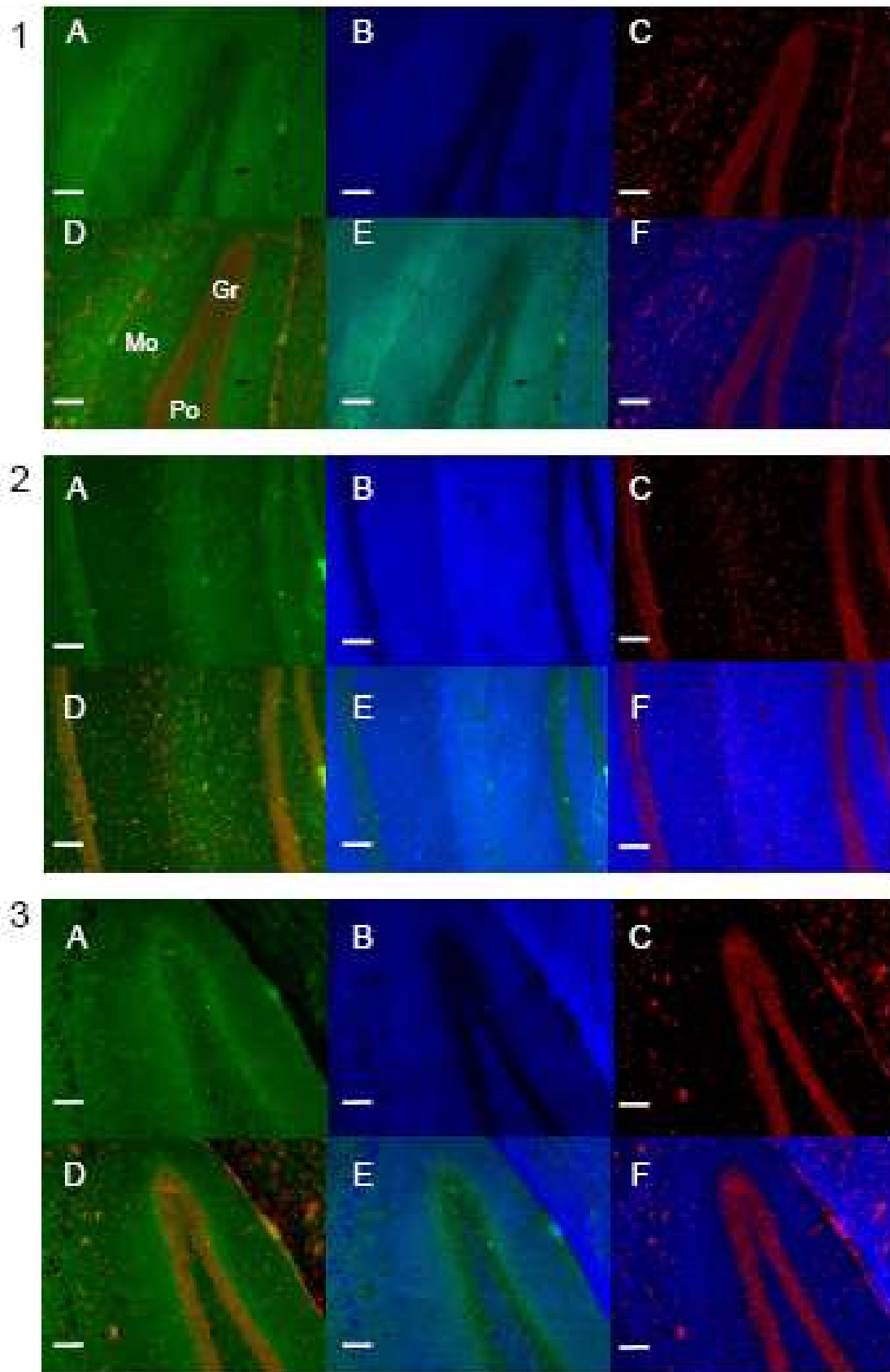


Figure 3

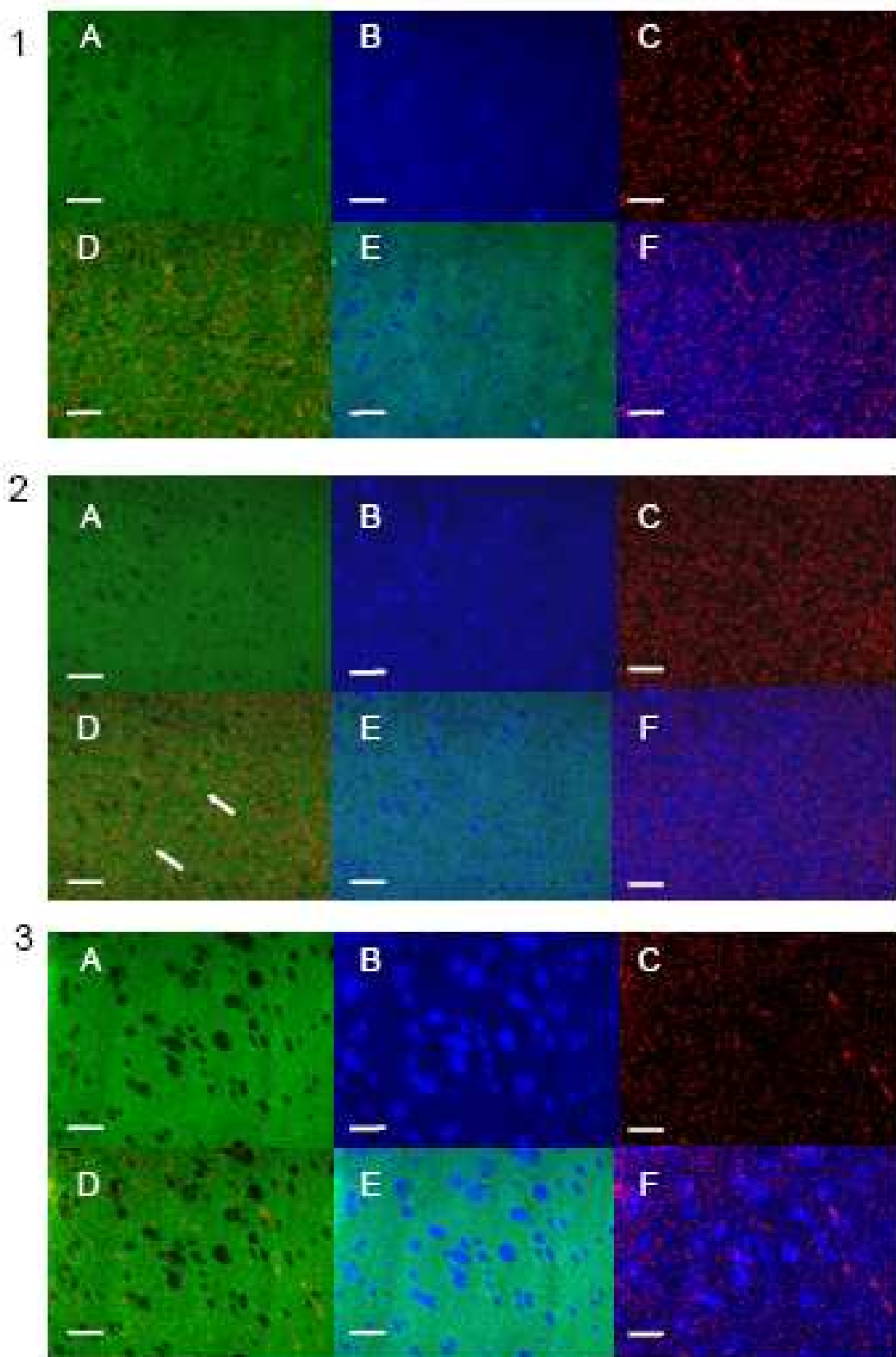


Figure 4

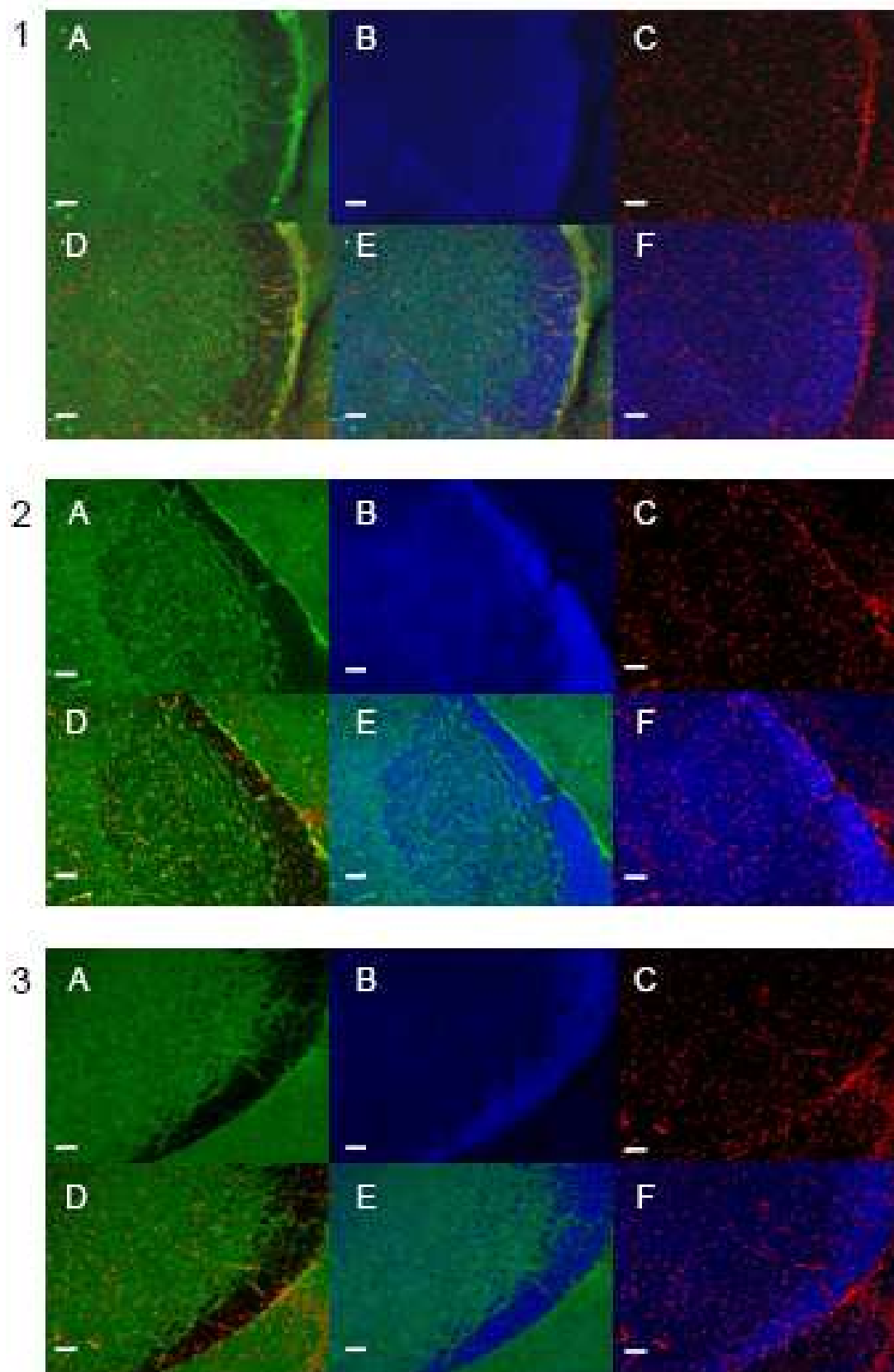


Figure 5

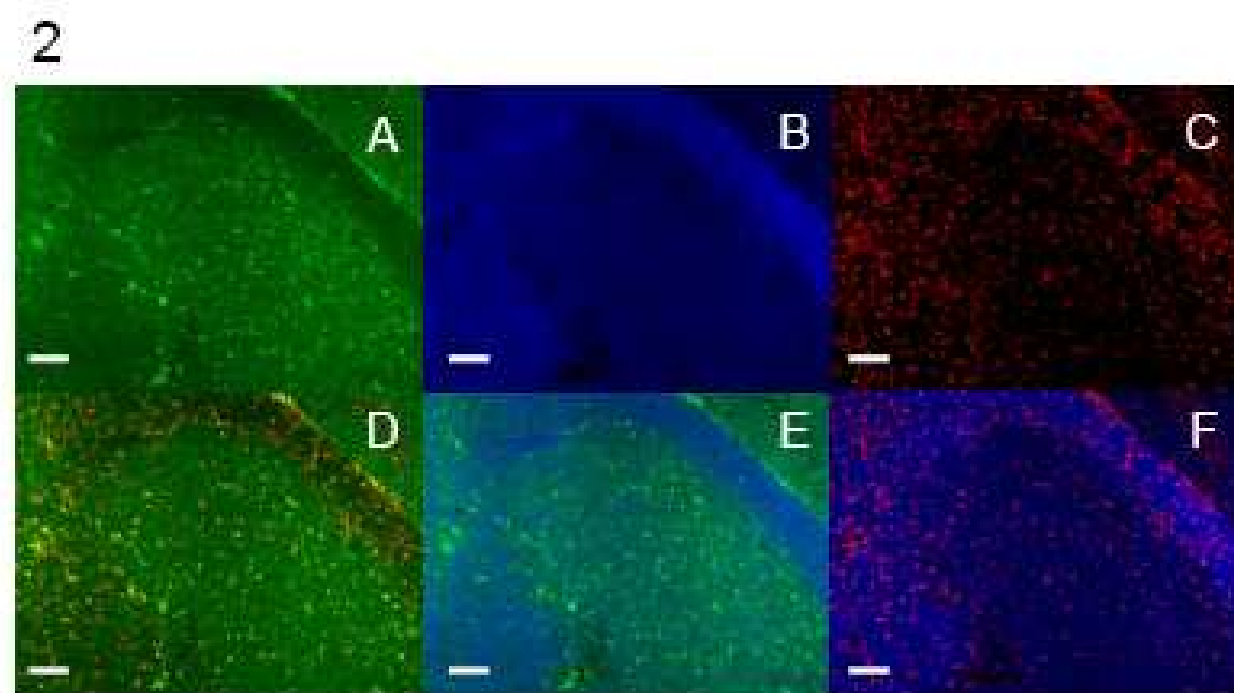
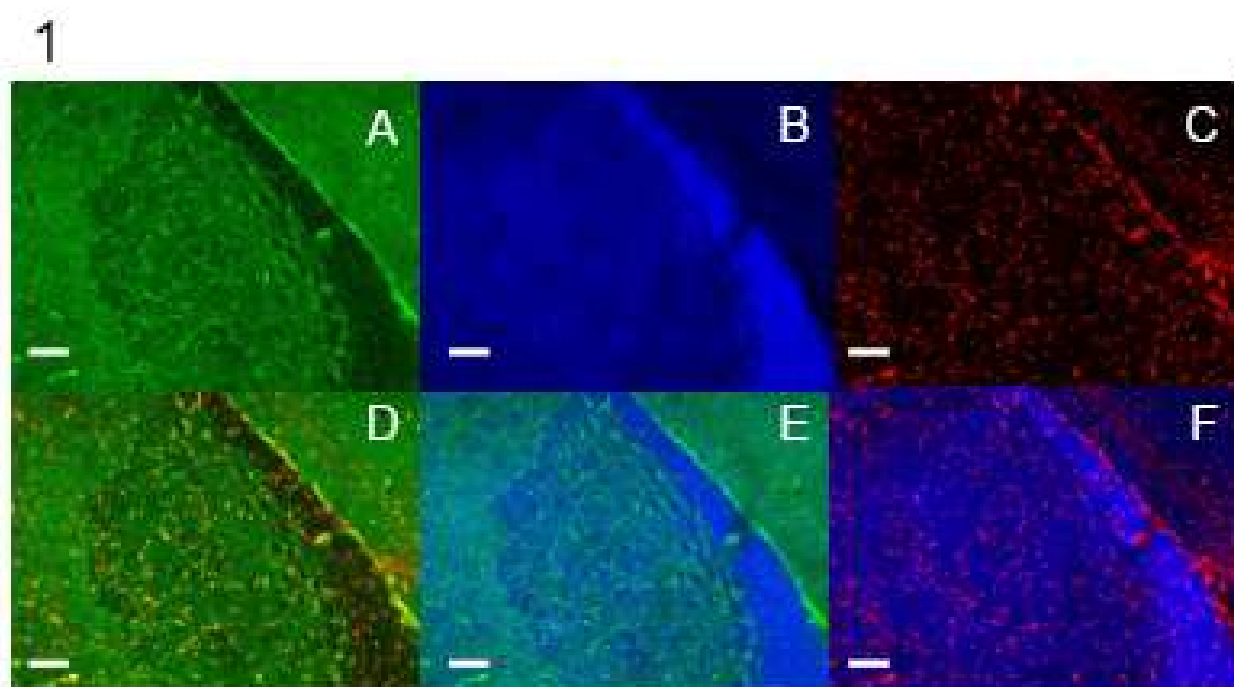


Figure 6

III. DISCUSSION

A. Intoxication par le MPTP chez la souris : validation du modèle murin de syndrome de Leigh

1. Intérêt et originalité du modèle au regard des autres modèles de maladies mitochondriales

Nous avons donc généré un modèle de maladie mitochondriale chez l'enfant et plus précisément de SL. Ce modèle présente l'originalité de recourir à un toxique utilisé depuis longtemps pour développer des modèles animaux de maladie de Parkinson, mais ici mis en œuvre pour ces propriétés d'inhibiteur spécifique de la CR mitochondriale. En comparaison des autres modèles de maladies mitochondriales développés, notre modèle présente plusieurs avantages :

- 1) L'utilisation du MPTP, sous réserve des précautions inhérentes à sa toxicité, est relativement simple.
- 2) Le MPTP déclenche chez la souris une dégénérescence du réseau nigro-strié reproductible d'un animal à l'autre (Jackson-Lewis et Przedborski, 2007).
- 3) La défaillance énergétique est plus profonde qu'après intoxication par la roténone (Schmidt et al, 2006).
- 4) Notre modèle permet de combiner l'évaluation simultanée de plusieurs molécules à potentiel neuroprotecteur avec l'utilisation d'un modèle rongeur plus proche de la physiologie humaine que les modèles utilisant la levure *Sacharomyces cerevisiae* (Witt et Flower, 2006), le nématode *Cenorhabditis elegans* (Braungart et al, 2004), l'amibe *Dictyostelium discoideum* (Barth et al, 2007) ou encore la drosophile (Jacobs et al, 1994). Le recours à ces organismes permet un screening de plusieurs centaines de molécules simultanément, mais au détriment du recours à un modèle cellulaire relativement frustré.

5) Ce modèle pharmacologique simple permet de s'affranchir de techniques lourdes de génétique, telles que la production de souris knock-out (Tyynismaa et Soumalainen, 2009 ; Ohsawa et al, 2008).

2. Limites du modèle :

i. Phénotype des souris MPTP

Ce modèle présente cependant également plusieurs limites :

1) La première limite est que les rongeurs restent une espèce plus éloignée de l'homme que les mammifères supérieurs, notamment en matière d'architecture cérébrale. Il semblerait donc intéressant de tester ultérieurement chez les primates non humains puis chez l'humain une molécule qui serait neuroprotectrice dans le modèle MPTP chez la souris tel que la lamotrigine.

2) La deuxième limite est que le MPTP nécessite sur le plan pharmacologique la présence de MAO-B pour être transformé en son métabolite actif le MPP⁺. La MAO-B n'est présente chez la souris à un taux significatif qu'à partir d'environ 4 semaines post natal (Desai et al, 1996). Le modèle d'intoxication par le MPTP ne peut donc être utilisé que pour générer un modèle de maladie mitochondriale chez l'adolescent et l'adulte jeune, mais moins aisément chez le petit enfant ou le nourrisson. Pour étudier ces stades, il faut recourir à l'injection intracrânienne de MPP⁺ qui évite l'étape de transformation par la MAO-B.

3) La troisième limite est que les souris intoxiquées par le MPTP ne présentent pas de phénotype moteur évident à la différence de ce qui est observé chez les primates non humains. L'évaluation des altérations motrices secondaires au MPTP chez les rongeurs nécessite donc la mise en œuvre de tests comportementaux par utilisation d'un rotarod (Rozas et al, 1998), de poutres (Quinn et al, 2007) ou encore par des mesures automatisées de déambulation en champ libre (Quinn et al, 2006; Stefanova et al, 2003).

4) Une autre limite est que les lésions post MPTP tendent à récupérer spontanément au cours des semaines suivant l'administration (Jackson-Lewis et Przedborski, 2007). Il est donc nécessaire dans l'avenir de développer des techniques d'étude *in vivo* afin de pouvoir comparer l'évolution d'animaux témoins et intoxiqués sur une période prolongée et ainsi prouver le caractère durable de l'effet neuroprotecteur d'une molécule.

ii. Mécanisme de mort cellulaire après intoxication mitochondriale

Une autre limitation du modèle est le paradigme d'intoxication choisi. Nous avons eu recours au protocole subaigu (4 injections ip sur une journée à 2 heures d'intervalle) puisque nous voulions générer un modèle de défaillance énergétique mitochondriale. L'inhibition du complexe I post MPTP *in vivo* chez la souris n'est en effet démontrée dans la littérature que dans le protocole aigu (injection unique ip) (Mizuno et al, 1998 ; Sriram et al, 1997). Nous l'avons également mise en évidence dans le protocole subaigu comme démontré dans l'article 1, mais nous ne l'avons pas caractérisée dans le protocole chronique (une injection quotidienne ip durant 5 jours) (résultats non publiés). Dans ces trois schémas d'intoxication, la mort cellulaire survient soit par nécrose (protocole d'intoxication aigu et subaigu), soit par apoptose (protocole d'intoxication chronique). Notre schéma d'intoxication subaigu qui permet de valider l'inhibition du complexe I repose donc sur une mort cellulaire par nécrose. Or il a été prouvé que l'apoptose est la modalité majeure de mort cellulaire lors d'un déficit en complexe I dans des modèles animaux knock-out (Marella et al, 2007 ; Qi et al, 2004).

Le schéma d'intoxication a également un impact direct sur le caractère neuroprotecteur d'une molécule. Anderson et al ont ainsi montré que la modification des schémas d'intoxication, des paramètres d'évaluation ou encore des délais entre l'intoxication et le sacrifice peut modifier totalement les résultats expérimentaux. Ces auteurs conseillent donc de tester une même

molécule sous plusieurs conditions afin de valider au mieux un éventuel caractère neuroprotecteur (Anderson et al, 2006).

Au total, le modèle d'agression énergétique des NGC par le MPTP chez la souris nous semble constituer un modèle valable de SL. Ce modèle permet l'étude du potentiel neuroprotecteur de différentes molécules de manière relativement simple et rend ainsi possible la sélection de molécules prometteuses à tester ultérieurement chez le primate.

B. Neuroprotection par les antiépileptiques dans le modèle murin de syndrome de Leigh

1. Molécules à action neuroprotectrice prouvée chez l'animal et l'homme

Nous avons donc recherché un potentiel effet neuroprotecteur des antiépileptiques dans le modèle MPTP chez la souris. L'étude de la littérature met en évidence un grand nombre de molécules neuroprotectrices dans divers modèles animaux. Quelques exemples classés en fonction de la maladie étudiée et de l'axe de neuroprotection principal supposé sont récapitulés dans le tableau 2, page XX. Ces données amènent à deux constatations :

- 1) Plusieurs molécules (mélatonine, mémantine, FGF, érythropoïétine) ont prouvé leur efficacité dans différents modèles animaux. Ceci est sous tendu par le fait que les voies de neuro dégénérescence sont communes aux différentes maladies neurodégénératives comme précédemment évoqué.
- 2) La tendance actuelle est de s'orienter vers des molécules à effet multiples (« multifunctional neuroprotective drugs ») afin d'agir sur un maximum, si ce n'est l'ensemble, des voies pathogènes impliquées. Les antiépileptiques semblent pouvoir constituer une de ces classes de drogue « multifonctionnelles ».

Une fois extrapolé à l'humain, seuls quelques composés ont prouvé une action bénéfique : la sélégiline (inhibiteur de la MAO-B) et la mémantine ont prouvé un effet neuroprotecteur

traduit par une amélioration de la mémoire chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Filip et Kolibas, 1999 ; Lipton, 2007). D'autres composés (créatine et rasagiline pour la maladie d'Alzheimer, inhibiteurs des canaux sodiques pour la sclérose en plaques) sont actuellement en cours d'évaluation (Schapira, 2008 ; Waxman, 2008).

Voie utilisée	Maladie	Molécule testée	Référence
Canaux ioniques ATP-dépendants	Parkinson	iptakalim	Hu et al, 2005
	Hypoxie-ischémie	glibenclamide	Nistico et al, 2007
		antagonistes des iGluR	Schurr, 2004
Stress oxydatif	Parkinson	pramipexole	Le et al, 2000
		métallothionéines	Ebadi et Sharma, 2006
		mélatonine	Mayo et al, 2005
	Chyan et al, 1999		
	Alzheimer		
	Huntington	mithramycine	Ferrante et al, 2004
	Hypoxie-ischémie	ebselen	Yagamata et al, 2008
	Traumatisme crânien (TC)	antagonistes NMDA	Wood et al, 1997
resvératrol		Ates et al, 2007	
Excitotoxicité	SLA	lithium / valproate	Feng et al, 2008
	Hypoxie-ischémie	mémantine	Garcia de Arriba et al, 2006
			Sonkusare et al, 2005
	Alzheimer	nicotine	Picciotto et Zoli, 2008
		antagoniste des mGluR	Bruno et al, 2001
			Zhong et al, 2005
	Parkinson	antagonistes A2AR	Kalda et al, 2006
	Huntington		Minghetti et al, 2007
Apoptose	Hypoxie-ischémie	surexpression FLIP(L)	Taoufik et al, 2007
	AVC	humanin	Hashimoto et al, 2001
	Alzheimer		Xu et al, 2006
		Bclw	Zhu et al, 2004
		œstrogènes	Yao et al, 2007
	Parkinson	apomorphine	Kyriazis, 2003
		transfection gène ICP10PK	Wales et al, 2008
		KO MAPKAP kinase 2	Thomas et al, 2008
		leptine	Weng et al, 2007
	Huntington	lithium	Senatorov et al, 2004
TC	flavopiridol	Di Giovanni, 2005	

Neurogenèse	SLA	greffe de cellules souches	Corti et al, 2007
		IGF1	Vincent et al, 2004
	Parkinson	GDNF	Deierborg et al, 2008
	Alzheimer	FGF	Thorns et Masliah, 1999
	Huntington		Jin et al, 2005
	TC		Alzheimer et al, 2002
Inflammation	Hypoxie-ischémie	indomethacine	Chechneva et al, 2006
		inhibition NF-κB	Nijboer et al, 2008
		érythropoïétine	Paschos et al, 2008
	Parkinson		Xue et al, 2007
	TC		Xiong et al, 2008
		antagonistes PPAR	Kapadia et al, 2008
	Alzheimer	IFN γ	Baron et al, 2008
		cannabinoïdes	Ramirez et al, 2005
		statines	Stepien et al, 2005
	Sclérose en plaques	stimulation récepteurs cannabinoïdes CB2	Docagne et al, 2008
Mitochondrie Energie	Huntington	inhibiteurs de l’histone déacétylase	Oliveira et al, 2006
	Parkinson	coenzyme Q10	Beal, 2003
	Alzheimer	inhibiteurs de la MAO-B	Youdim et al, 2001
	TC		Huang et al, 1999
		découpleurs mitochondriaux	Pandya et al, 2007
	SLA	lithium	Fornai et al, 2008
		régime cétogène	Zhao et al, 2006
	Hypoxie-ischémie	peptide CART	Mao et al, 2007
Modalités multiples	SLA	riluzole	Noh et al, 2000
	l’ensemble des maladies	minocycline	Kim et Suh, 2009
	Parkinson	greffe de cellules souches	Yasuhara et al, 2006
		activine	Kupersmidt et al, 2007
	Sclérose en plaques	acétate de glatiramer	Arnon et Aharoni, 2007
	Alzheimer	polyphénols, curcumin	Mandel et al, 2007
		ladostigil	Youdim et al, 2006

Tableau 2 : Molécules à action neuroprotectrice prouvée chez l'animal

2. Effet neuroprotecteur de la lamotrigine

i. Effet neuroprotecteur chez l'animal et l'homme

Parmi l'ensemble des antiépileptiques évalués, seule la lamotrigine a prouvé un effet neuroprotecteur chez l'animal. Il est important de noter que cette molécule a également prouvé son efficacité dans les modèles animaux suivants :

- Modèle d'excitotoxicité par le kaïnate sur coupe d'hippocampe de rat (Calabresi et al, 2003 ; Longo et al, 1995) et état de mal convulsif induit par le kaïnate chez le rat (Maj et al, 1998)
- Modèle d'hypoxie-ischémie chez la gerbille (Shuaib et al, 1995 ; Wiard et al, 1995) et le rat (Papazisis et al, 2008) et modèle d'ischémie de neurones striataux de rat en culture (Calabresi et al, 2003)
- Modèle d'ischémie-reperfusion chez le rat (Crumrine et al, 1997)
- Modèle d'intoxication mitochondriale par la roténone (Kim et al, 2007), le 3-NP (Lee et al, 2000) ou le malonate (Connop et al, 1997)

Dans l'ensemble de ces modèles, les auteurs retiennent comme mode d'action neuroprotecteur principal l'inhibition présynaptique de la libération de glutamate secondaire à l'inhibition des canaux sodium voltage-dépendants.

Dans les cas d'essai de neuroprotection chez l'homme, les résultats sont plus mitigés. Bien que la lamotrigine ait prouvé son efficacité dans le modèle de maladie de Parkinson par intoxication au MPTP chez la souris, il n'a pas été mis en évidence d'effet antiparkinsonien chez l'homme lors d'une étude randomisée en double aveugle avec cross over (Shinotoh et al, 1997). Dans le cas du modèle de maladie de Huntington, il n'a été caractérisé chez l'homme qu'une diminution de la chorée et une amélioration symptomatique selon l'autoévaluation des patients inclus (Kremer et al, 1999). Il est à noter que l'étude du modèle de maladie de

Huntington par intoxication au 3-NP chez le rat avait amené des résultats contradictoires : Lee et al ont prouvé un effet neuroprotecteur (Lee et al, 2000) à la différence de Wu et al (Wu et al, 2006). Enfin, la lamotrigine n'a pas permis de retarder l'évolution de la sclérose latérale amyotrophique dans deux études (Ryberg et al, 2003 ; Eisen et al, 1993).

ii. Voies de neuroprotection possibles

Plusieurs voies semblent impliquées dans l'effet neuroprotecteur de la lamotrigine chez l'animal. La lamotrigine présente la particularité d'agir simultanément sur six voies délétères :

- 1) Elle diminue le stress oxydatif (Eren et al, 2007 ; Tufan et al, 2008),
- 2) Elle augmente le taux de GABA (Cunningham et al, 2000)
- 3) Elle inhibe les canaux sodium voltage-dépendants (Kuo et al, 1997 ; Zona et al, 1997 ; Xie et al, 1995). Il est intéressant de noter que le blocage des canaux sodium voltage-dépendants, en plus de permettre une épargne d'ATP pour les neurones en état de stress énergétique, modulerait l'action de la microglie dont l'implication dans la neurodégénérescence est aujourd'hui clairement établie (Black et al, 2008).
- 4) Elle inhibe les canaux potassium voltage-dépendants (Grunze et al, 1998)
- 5) Elle stimule la neurogenèse par augmentation de la production de BDNF (Chang et al, 2008)
- 6) Elle exercerait un effet inhibiteur direct sur la formation du pore mitochondrial ce qui semblerait pouvoir expliquer son effet neuroprotecteur dans les modèles d'intoxication mitochondrial par le MPTP (Jones-Humble et al, 1994 ; Lagrue et al, 2007), par la roténone (Kim et al, 2007 ; Costa et al, 2008) ou encore par le 3-NP (Lee et al, 2000).

Concernant les autres antiépileptiques, l'étude de la littérature permet de distinguer trois groupes selon le mécanisme d'action des différentes molécules. Le lévétiracétam doit être

séparé en raison de son mode d'action spécifique : le lévétiracétam inhibe la libération présynaptique des neurotransmetteurs (Yang et al, 2007).

Un premier groupe est constitué des molécules qui permettent un rééquilibrage de la balance GABA-glutamate afin de lutter contre l'excitotoxicité : vigabatrin, gabapentine, tiagabine, prégabaline, clonazépam. Ces molécules ont un mode d'action potentiellement neuroprotecteur univoque et n'ont pas prouvé d'effet bénéfique en dehors de modèles animaux d'ischémie basés essentiellement sur la réponse glutamatergique (Traa et al, 2008 ; Iqbal et al, 2002 ; Abel et al, 1992). Nous n'avons par ailleurs pas prouvé d'effet neuroprotecteur dans le modèle MPTP tel qu'explicité dans l'article 3. Il convient de noter que ces molécules n'agissent pas sur les canaux sodium et calcium en dehors du cas particulier de la gabapentine et de la prégabaline qui exerceraient leur effet antalgique par association exclusive à la sous unité $\alpha 2\delta$ du canal calcium voltage-dépendant de type P/Q (Bian et al, 2006). Cette absence d'inhibition des canaux sodium pourrait expliquer cet échec.

Un deuxième groupe est représenté par la carbamazépine, le topiramate et la phénytoïne. Ces molécules rééquilibrent également la balance GABA-glutamate, mais exercent de plus un effet inhibiteur sur les canaux sodium voltage-dépendants (Rush et al, 1997 ; Xie et al, 1995). La carbamazépine a prouvé un effet bénéfique après intoxication à la roténone in vitro (Costa et al, 2008) mais pas après MPTP (Laguer et al, 2007 ; Jones-Humble et al, 1994). Le topiramate n'a pas prouvé d'effet bénéfique après MPTP (Laguer et al, 2007) et n'a pas été testé dans les modèles 3-NP et roténone. La phénytoïne est quand à elle incompatible pharmacologiquement avec le modèle MPTP et n'a pas été testée dans les modèles 3-NP et roténone. Ces éléments soulignent le fait que l'inhibition des canaux sodium voltage-dépendants ne semblent pas promouvoir une neuroprotection à elle seule. Une action

simultanée sur les différentes voies de neuroprotection tel que réalisé par la lamotrigine semble donc nécessaire.

Une troisième catégorie de molécules comprenant la lamotrigine, le riluzole et le valproate de sodium semble pouvoir présenter ces propriétés combinées. Le riluzole :

- 1) Diminue le stress oxydatif (Storch et al, 2000) par effet sur la protéine kinase C (Noh et al, 2000)
- 2) Diminue l'apoptose par modulation de l'interféron endogène de type 1 (Achour et al, 2009) et induction du heat shock factor 1 (Yang et al, 2008)
- 3) Stimule la neurogenèse par induction du BDNF (Katoh-Semba et al, 2002)
- 4) Inhibe fortement les canaux sodium voltage-dépendants (Stefani et al, 1997)

Le riluzole a montré un effet bénéfique à plusieurs reprises dans le modèle MPTP (Diguët et al, 2005 ; Obinu et al, 2002 ; Araki et al, 2001) mais cet effet n'a pas été retrouvé en clinique chez les patients atteints de syndrome parkinsonien plus (Bensimon et al, 2009). Le riluzole est également neuroprotecteur en modèle 3-NP (Guyot et al, 1997) et malonate (Kaal et al, 2000) et après lésion ischémique de la moelle épinière chez le rat (Lang-Lazdunski et al, 2000). Enfin le riluzole est la seule thérapeutique efficace dans la sclérose latérale amyotrophique chez l'homme (Miller et al, 2007) même si l'augmentation de la durée de vie n'est que d'environ trois mois. Il est à noter que plusieurs propriétés potentiellement neuroprotectrices sont partagées par le riluzole et la lamotrigine. Ces propriétés de diminution de l'excitotoxicité, d'augmentation du GABA et de promotion de la neurogenèse par augmentation du BDNF associées à l'inhibition des canaux sodium voltage-dépendants pourrait donc expliquer la neuroprotection apportée par ces molécules.

La dernière molécule à effet pléiotrope, le valproate de sodium exerce également des effets neuroprotecteurs potentiels multiples :

- 1) Il diminue le stress oxydatif (Andreazza et al, 2008)
- 2) Il diminue l'apoptose par inhibition de la glycogène synthétase kinase 3 (Kim et al, 2005), up régulation de Bcl2 (Creson et al, 2009) et induction de la heat shock protein 70 (Pan et al, 2005)
- 3) Il stimule la neurogenèse GABA (Laeng et al, 2004)
- 4) Il inhibe les canaux sodium et calcium voltage-dépendants (Albus et Williamson, 1998 ; Kito et al, 1994)

Le valproate de sodium présente un effet bénéfique après intoxication par le malonate (Morland et al, 2004) et en association au lithium dans un modèle souris de sclérose latérale amyotrophique (Feng et al, 2008). Il n'a pas été testé dans les modèles 3-NP et roténone. Nous l'avons testé sans succès dans le modèle MPTP (Lagruet et al, 2007). Les raisons de cet échec sont possiblement la pharmacocinétique particulière de ce produit chez la souris qui élimine rapidement le valproate, ou encore l'interaction faible mais existante avec le cytochrome P450 2D6 qui empêcherait la détoxification en nor-MPTP et aggraverait donc la toxicité du MPTP (Coleman et al, 2006 ; Wen et al, 2001). La recherche d'un effet neuroprotecteur du valproate de sodium dans le modèle MPTP à plus forte dose nous paraîtrait à envisager. Il nous paraîtrait d'autre part utile de vérifier l'absence d'altération du complexe I après administration de valproate de sodium. Il est en effet connu de longue date que l'administration de ce médicament chez les patients atteints de maladie mitochondriale peut accélérer leur détérioration neurologique et entraîner une défaillance hépatique, mais cet effet semble lié à une altération du complexe IV et non du complexe I (Ponchaut et al, 1992). Cet élément justifierait donc d'être vérifié plus en détail.

En conclusion, seules des molécules à effet pléiotrope telles que la lamotrigine, le valproate de sodium ou le riluzole semble pouvoir exercer un effet neuroprotecteur chez l'animal, mais la transposition en pratique clinique reste encore délicate.

Cette neuroprotection ne peut se concevoir aujourd'hui qu'en tenant compte de l'environnement neuronal constitué principalement par les astrocytes et les cellules microgliales. Ces deux populations gliales jouent en effet un rôle majeur dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives. Cet aspect va être développé dans la dernière partie de notre discussion.

C. Coopération neurones-glie et métabolisme énergétique

1. Coopération neurones-glie

i. Rôle des astrocytes

a. Astrocytes et neurodégénérescence

Les astrocytes sont impliqués, avec les cellules microgliales, dans les lésions neuronales secondaires à la défaillance énergétique par l'intermédiaire de l'excitotoxicité glutamatergique et du stress oxydatif. Le $\text{TNF}\alpha$ produit par les cellules microgliales activées par les neurones en apoptose (cf paragraphe III.C.1.ii.) inhibe en effet la recapture du glutamate par les astrocytes par down regulation du transporteur du glutamate GLT1 (Zhou et Crews, 2005). Les astrocytes produisent par ailleurs du NO qui s'associe aux radicaux libres pour former du peroxynitrite qui lèse les neurones, mais également les astrocytes eux même. L'exposition des astrocytes au NO déclenche une up régulation du métabolisme du glutathion qui limite rapidement le stock de cette molécule responsable de la détoxification du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Heales et al, 2004). Cette carence aggrave donc le stress oxydatif. Ceci souligne les relations étroites entre neurones et astrocytes.

b. Astrocytes et métabolisme énergétique

Les astrocytes n'exercent pas seulement un rôle délétère, ils sont également responsables du soutien métabolique et trophique des neurones auxquels ils fournissent du lactate et différentes neurotrophines. La notion longtemps définitive que le glucose constituerait le seul composé énergétique utilisable par les neurones a été battue en brèche par la découverte que ces cellules peuvent également métaboliser le lactate produit par les astrocytes en cas d'activité métabolique neuronale intense. Mc Ilwain fut le premier durant les années 1950 à émettre l'hypothèse d'une collaboration métabolique neurono-gliale (Mc Ilwain, 1951). Cette théorie a depuis été prouvée principalement par Pellerin et Magistretti et est aujourd'hui communément dénommée sous le terme de « glutamate-stimulated astrocyte-neuron lactate shuttle ». En cas de fonctionnement synaptique soutenu, le glutamate libéré dans la fente synaptique est recapté par les astrocytes associé à des ions sodium. Ces ions sodium sont relargués dans l'espace péri cellulaire en échange de potassium par la Na^+/K^+ ATPase avec transformation d'ATP en ADP. L'ADP est retransformé en ATP par la phosphoglycérate kinase avec production de lactate. Le lactate est transféré de l'astrocyte au neurone par les transporteurs de monocarboxylates MCT. Il est alors métabolisé en pyruvate qui est pris en charge dans le cycle des acides tricarboxyliques afin de générer de l'ATP. Ce phénomène permet de coupler l'activité excitatrice de la synapse et la production d'ATP (Pellerin et al, 2007 ; Pellerin et Magistretti, 1996 ; Pellerin et Magistretti, 1994).

Cet élément souligne l'importance des astrocytes dans la résistance à l'agression énergétique et le fait que cette population pourrait constituer une cible de neuroprotection. Il a ainsi été prouvé que l'augmentation de la population d'astrocytes en co-culture neurones-astrocytes protège les neurones de la déplétion en ATP secondaire au MPTP (Smeyne et al, 2005).

c. Astrocytes et neuroprotection

Comme évoqué antérieurement, les astrocytes exercent un rôle neuroprotecteur en plus de leur rôle métabolique lors d'une agression énergétique. Les astrocytes sécrètent en effet différentes substances neurotrophiques après lésion neuronale, parmi lesquelles les principales sont le TGF β et la fractalkine (Streit et al, 2005). Ce mécanisme de neuroprotection met en jeu les relations astrocytes-microglie : la microglie activée libère de l'interleukine-1 (IL-1) qui stimule la production de FGF β et de GDNF par les astrocytes (Morale et al, 2006).

ii. Rôle de la microglie

a. Microglie et neurodégénérescence

La microglie, qui représente 10% des cellules non neuronales du cerveau, joue également un rôle majeur dans la neurodégénérescence. La reconnaissance de résidus phosphatidyl sérine au niveau de la membrane cellulaire des neurones en apoptose déclenche une activation microgliale et la production de NO, d'IL-1 β et de prostaglandine E2 en particulier (Minghetti et al, 2005). Ces composés sont à l'origine de lésions neuronales par stress oxydatif. Le rôle majeur de la microglie est connu dans la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, la maladie d'Huntington et la sclérose latérale amyotrophique (Shin et al, 2007 ; Block et Hong, 2005). Takeuchi et al ont montré le rôle central du TNF α dans l'activation microgliale et l'excitotoxicité glutamatergique : le TNF α libéré par la microglie stimule de manière autocrine la libération de glutamate par up regulation de la glutaminase (Takeuchi et al, 2006). Il s'y associe l'inhibition de la recapture du glutamate par les astrocytes déjà évoquée antérieurement (Zou et Crews, 2005), ces deux actions combinées créant une surcharge glutamatergique délétère pour les neurones. Le blocage de l'activation microgliale semble donc constituer un axe de neuroprotection intéressant. Il a ainsi été prouvé que l'inhibition de la microglie par la minocycline protège les neurones de l'action du MPTP (Wu et al, 2002). Il

est également démontré que la microglie exprime différents canaux sodiques et que l'activité de ces canaux régule le fonctionnement microglial (Black et al, 2008). Les inhibiteurs des canaux sodiques tels que la lamotrigine, la phénytoïne ou le riluzole pourrait donc exercer en partie leur effet neuroprotecteur par une modulation de l'activité microgliale. La phénytoïne réduit ainsi l'activation microgliale dans un modèle de sclérose en plaques (Craner et al, 2005).

b. Microglie et neuroprotection

Le rôle de la microglie ne se limite néanmoins pas, comme pour les astrocytes, à un effet inflammatoire délétère. Les cellules microgliales sécrètent en effet elles aussi des facteurs neurotrophiques tels que la MAP kinase, NFκB ou encore l'IL-1 qui stimule la libération de neurotrophines par les astrocytes comme vu antérieurement. Une éventuelle action sur les cellules microgliales devrait donc inhiber le relargage de cytokines et de glutamate sans altérer la sécrétion de neurotrophines.

2. Evaluation du statut énergétique cellulaire par l'intermédiaire de récepteurs rétroviraux

Notre étude étant centrée sur la sensibilité des NGC au stress énergétique, nous avons souhaité mieux caractériser le métabolisme du glucose et du phosphate (qui entre dans la composition de l'ATP) au sein de cette structure. Nous avons pour cela tenté d'évaluer l'expression du transporteur du glucose de type 1 (GLUT-1) et des transporteurs du phosphate inorganique de type 1 (Pit1) et de type 2 (Pit2) dans le striatum et la substance noire de souris témoins et intoxiquées par le MPTP. Les transporteurs de nutriments constituent en effet des molécules cibles qui participent à la régulation de la croissance et à la survie des cellules en contrôlant le niveau intracellulaire de nutriments. Nous avons donc réalisé un marquage par

immunofluorescence de GLUT-1, Pit1 et Pit2 en utilisant des ligands extracellulaires spécifiques dérivés de gamma et delta rétrovirus.

GLUT-1 est le principal transporteur du glucose au niveau cérébral. Son expression est connue pour être modulée in vitro par la déprivation en glucose (von der Crone et al, 2000), l'hypoxie-ischémie (Vannucci et al, 1996) ou encore par les toxiques mitochondriaux (Ebert et al, 1995). Notre hypothèse était que l'expression de GLUT-1 serait up régulée après stress énergétique. Nous avons mis en évidence une expression faible et diffuse du GLUT-1 dans le striatum et la SN, avec présence de quelques corps cellulaires plus spécifiquement marqués dans le cas du striatum. Ces résultats nous ont permis de valider l'utilisation de ces traceurs innovants in vivo chez la souris. Nous n'avons par contre pas retrouvé de modification de l'expression de surface de GLUT-1 après intoxication au MPTP. Ceci nécessite en effet des études quantitatives plus poussées et cet échec semble probablement lié en partie à des difficultés de localisation de la SN qui devrait pouvoir être résolu par la réalisation de co-marquages GLUT-1-TH.

Nous avons lors de la même étude déterminé la distribution de GLUT-1 dans le cortex, le corps calleux, l'hippocampe et le cervelet. Nous avons caractérisé un marquage d'aspect neuronal dans le cortex et un marquage des cellules de Purkinje du cervelet, ce qui est en opposition avec la notion communément admise que le transporteur du glucose neuronal est le GLUT-3 (Simpson et al, 2008). Nous envisageons de réaliser des co-marquages GLUT-1-NeuN pour confirmer ces résultats. Le mode de production du ligand H₂RBD spécifique du GLUT-1 rend en effet impossible toute réaction croisée avec GLUT-3 (Manel et al, 2003). Il convient de noter que les anticorps utilisés pour les marquages immunohistochimiques chez la souris ou le rat reconnaissent l'extrémité N-terminale du récepteur, à la différence de notre ligand spécifique de l'extrémité C-terminale. L'utilisation de ces anticorps met en évidence une expression de GLUT-1 dans le cortex de la souris de type vasculaire au niveau de la

BHEet non cellulaire probablement neuronale comme dans notre cas (Choeiri et al, 2002). La spécificité des anticorps pour l'extrémité N-terminale pourrait expliquer l'absence de détection d'une expression de GLUT-1 de faible niveau dans les neurones en comparaison d'une forte expression de GLUT-3.

Nous avons également retrouvé une expression de GLUT-1 par les oligodendrocytes de la substance blanche au niveau du corps calleux, des faisceaux du striatum et des pédoncules cérébraux. Ceci est en accord avec la littérature (Maher et al, 1994).

Concernant l'expression des transporteurs du phosphore, nous avons mis en évidence une modification qualitative de l'expression de Pit1 dans la SN. L'aspect réticulé du marquage Pit1 chez les souris témoins n'a en effet pas été retrouvé chez les souris intoxiquées par le MPTP. L'expression des transporteurs du phosphate inorganique dans le striatum et la substance noire n'étant pas connue, l'interprétation de ces résultats reste difficile et nécessite des études complémentaires.

Ainsi, l'évaluation du statut énergétique des noyaux gris centraux par utilisation de ligands dérivés de delta et gamma rétrovirus nous semble prometteuse. Ces ligands pourraient en effet permettre d'établir un « phénotype métabolique » cellulaire sous des conditions physiopathologiques variées. Nous poursuivons actuellement ces recherches au sein de notre laboratoire.

IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

A. Conclusions

Ce travail nous a donc permis de valider l'utilisation du modèle d'intoxication par le MPTP chez la souris comme modèle de SL de l'enfant. Une fois entériné ce pré-requis nécessaire, nous avons par la suite pu évaluer le caractère neuroprotecteur des antiépileptiques qui constituent pour nous une classe thérapeutique de choix en raison de leurs propriétés complémentaires. Nous avons ainsi prouvé que la lamotrigine est neuroprotectrice dans notre modèle, les autres antiépileptiques n'ayant pas montré d'effet bénéfique.

Nos données viennent s'ajouter à celles déjà recueillies par des techniques d'imagerie. L'ensemble de ces recherches a pour but de développer à long terme un traitement curatif pour les maladies mitochondriales de l'enfant qui restent à ce jour incurables.

B. Perspectives

Afin de poursuivre et compléter ce travail, nous envisageons de mettre en œuvre divers axes de recherche :

Un premier axe concerne la poursuite de l'étude de l'effet neuroprotecteur de la lamotrigine, cet axe se divisant en trois parties :

- 1) Dans le but d'une utilisation ultérieure de cette molécule en pratique clinique, plusieurs étapes de validation s'avèrent nécessaires : nous souhaitons donc vérifier par microTEP chez la souris que la lamotrigine présente bien un effet neuroprotecteur stable dans le temps et qu'elle ne retarde pas simplement l'expression de la neurotoxicité du MPTP. Nous souhaitons également tester la lamotrigine en modèle MPTP chez le primate dont la physiologie est plus proche de la physiologie humaine.
- 2) Afin de mieux déterminer les mécanismes par lesquels la lamotrigine exerce son effet neuroprotecteur, nous envisageons d'évaluer le stress oxydatif et l'activation

microgliale sous lamotrigine, ainsi que de doser le complexe I de la CR mitochondriale en présence de ce médicament.

3) Nous souhaitons enfin rechercher un éventuel effet synergique bénéfique de l'association de la lamotrigine à d'autres molécules agissant sur des voies non ciblées par la lamotrigine telle que la chélation du fer. D'autres molécules candidates sont à l'étude dans le cadre du Réseau National constitué par les équipes impliquées dans la prise en charge des affections mitochondriales (Réseau Carammel) avec notamment les centres de Paris (Necker, A.Munich), Poitiers (M.Jaber), Angers (D.Bonneau) et Bordeaux (D.Lacombe).

Un deuxième axe concerne l'utilisation du valproate de sodium chez les enfants atteints de maladie mitochondriale. Nous souhaiterions en effet vérifier l'absence d'inhibition du complexe I lors de l'administration de valproate de sodium. Ceci pourrait avoir des débouchés en pratique clinique humaine.

Un troisième et dernier axe concerne l'étude de la distribution des transporteurs de nutriments GLUT-1, Pit1 et Pit2 dans le cerveau de souris avant et après intoxication par le MPTP. Nous espérons pouvoir réaliser des co-marquages GLUT-1–NeuN dans le cortex de souris témoins afin de valider l'expression neuronale de GLUT-1, ainsi que des co-marquages GLUT-1–TH dans le striatum et la SN afin d'affiner nos résultats concernant l'expression de GLUT-1 dans le réseau nigro-strié. Cette approche pourrait permettre de développer de nouveaux outils pour caractériser in situ le statut énergétique neuronal.

En conclusion, il convient de ne pas oublier que ce travail se fonde sur notre pratique clinique quotidienne au côté de nos petits patients dont l'amélioration du pronostic et de la qualité de vie reste notre préoccupation première et guide ces recherches.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achour A, M'bika JP, Biquard JM. Enhanced endogenous type I interferon cell-driven survival and inhibition of spontaneous apoptosis by Riluzole. *Virology*. 2009 Feb 3. [Epub ahead of print].
- Afifi AK. The basal ganglia: a neural network with more than motor function. *Semin Pediatr Neurol*. 2003, 10 (1): 3-10.
- Albus H, Williamson R. Electrophysiologic analysis of the actions of valproate on pyramidal neurons in the rat hippocampal slice. *Epilepsia*. 1998, 39 (2): 124-139.
- Ali SF, David SN, Newport GD, Cadet JL, Slikker W Jr. MPTP-induced oxidative stress and neurotoxicity are age-dependent: evidence from measures of reactive oxygen species and striatal dopamine levels. *Synapse*. 1994, 18(1):27-34.
- Alzheimer C, Werner S. Fibroblast growth factors and neuroprotection. *Adv Exp Med Biol*. 2002, 513: 335-351.
- Anderson DW, Bradbury KA, Schneider JS. Neuroprotection in Parkinson models varies with toxin administration protocol. *Eur J Neurosci*. 2006, 24 (11): 3174-3182.
- Andreazza AC, Kauer-Sant'Anna M, Frey BN, Stertz L, Zanotto C, Ribeiro L, Giasson K, Valvassori SS, Réus GZ, Salvador M, Quevedo J, Gonçalves CA, Kapczinski F. Effects of mood stabilizers on DNA damage in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci*. 2008, 33 (6): 516-524.
- Ara J, Przedborski S, Naini AB, Jackson-Lewis V, Trifiletti RR, Horwitz J, Ischiropoulos H.. Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998, 95 (13): 7659-7663.
- Araki T, Kumagai T, Tanaka K, Matsubara M, Kato H, Itoyama Y, Imai Y. Neuroprotective effect of riluzole in MPTP-treated mice. *Brain Res*. 2001, 918 (1-2): 176-181.
- Arnon R, Aharoni R. Neurogenesis and neuroprotection in the CNS--fundamental elements in the effect of Glatiramer acetate on treatment of autoimmune neurological disorders. *Mol Neurobiol*. 2007, 36 (3): 245-253.
- Ates O, Cayli SR, Gurses I, Turkoz Y, Tarim O, Cakir CO, Kocak A. Comparative neuroprotective effect of sodium channel blockers after experimental spinal cord injury. *J Clin Neurosci*. 2007, 14 (7): 658-665.
- Ates O, Cayli S, Altinoz E, Gurses I, Yucel N, Sener M, Kocak A, Yologlu S. Neuroprotection by resveratrol against traumatic brain injury in rats. *Mol Cell Biochem*. 2007, 294 (1-2): 137-144.
- Barth C, Le P, Fisher PR. Mitochondrial biology and disease in Dictyostelium. *Int Rev Cytol*. 2007, 263: 207-252.
- Baron R, Nemirovsky A, Harpaz I, Cohen H, Owens T, Monsonego A. IFN-gamma enhances neurogenesis in wild-type mice and in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J*. 2008, 22 (8): 2843-2852.
- Battino D, Croci D, Granata T, Estienne M, Pisani F, Avanzini G. Lamotrigine plasma concentrations in children and adults: influence of age and associated therapy. *Ther Drug Monit*. 1997, 19 (6): 620-627.
- Baydas G, Sonkaya E, Tuzcu M, Yasar A, Donder E. Novel role for gabapentin in neuroprotection of central nervous system in streptozotocine-induced diabetic rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2005, 26 (4): 417-422.
- Beal MF. Bioenergetic approaches for neuroprotection in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2003, 53 Suppl 3: S39-47; discussion S47-8.
- Beal MF. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol*. 1995, 38 (3): 357-366.

- Beers DR, Henkel JS, Zhao W, Wang J, Appel SH. CD4⁺ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008, 105 (40): 15558-15563.
- Bensimon G, Ludolph A, Agid Y, Vidailhet M, Payan C, Leigh PN; NNIPPS Study Group. Riluzole treatment, survival and diagnostic criteria in Parkinson plus disorders: the NNIPPS study. *Brain*. 2009, 132 (Pt 1): 156-171.
- Bernier FP, Boneh A, Dennett X, Chow CW, Cleary MA, Thorburn DR. Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology*. 2002, 59 (9): 1406-1411.
- Berg J. Chapter 18: Oxidative Phosphorylation. In Berg J, Timoczko J, Stryer L (6th ed). *Biochemistry*. New-York: WH Freeman, 2006, 1050 p.
- Bezard E, Gross CE, Fournier MC, Dovero S, Bloch B, Jaber M. Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter. *Exp Neurol*. 1999, 155 (2): 268-273.
- Bian F, Li Z, Offord J, Davis MD, McCormick J, Taylor CP, Walker LC. Calcium channel alpha2-delta type 1 subunit is the major binding protein for pregabalin in neocortex, hippocampus, amygdala, and spinal cord: an ex vivo autoradiographic study in alpha2-delta type 1 genetically modified mice. *Brain Res*. 2006, 1075 (1): 68-80.
- Black JA, Liu S, Waxman SG. Sodium channel activity modulates multiple functions in microglia. *Glia*. 2008 Dec 29. [Epub ahead of print].
- Block ML, Hong JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol*. 2005, 76 (2): 77-98.
- Boado RJ. Amplification of blood-brain barrier GLUT1 glucose transporter gene expression by brain-derived peptides. *Neurosci Res*. 2001, 40 (4): 337-342.
- Bonsi P, Cuomo D, Martella G, Sciamanna G, Tolu M, Calabresi P, Bernardi G, Pisani A. Mitochondrial toxins in Basal Ganglia disorders: from animal models to therapeutic strategies. *Curr Neuroparmacol*. 2006, 4 (1): 69-75.
- Bootsma HP, Ricker L, Diepman L, Gehring J, Hulsman J, Lambrechts D, Leenen L, Majoie M, Schellekens A, de Krom M, Aldenkamp AP. Long-term effects of levetiracetam and topiramate in clinical practice: A head-to-head comparison. *Seizure*. 2008, 17 (1): 19-26.
- Boyd JD, Jang H, Shepherd KR, Faherty C, Slack S, Jiao Y, Smeyne RJ. Response to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) differs in mouse strains and reveals a divergence in JNK signaling and COX-2 induction prior to loss of neurons in the substantia nigra pars compacta. *Brain Res*. 2007, 1175: 107-116.
- Braungart E, Gerlach M, Riederer P, Baumeister R, Hoener MC. Caenorhabditis elegans MPP⁺ model of Parkinson's disease for high-throughput drug screenings. *Neurodegener Dis*. 2004, 1 (4-5): 175-183.
- Brini M. Ca(2⁺) signalling in mitochondria: mechanism and role in physiology and pathology. *Cell Calcium*. 2003, 34 (4-5): 399-405.
- Bruno V, Battaglia G, Copani A, D'Onofrio M, Di Iorio P, De Blasi A, Melchiorri D, Flor PJ, Nicoletti F. Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001, 21 (9): 1013-1033.
- Calabresi P, Centonze D, Cupini LM, Costa C, Pisani F, Bernardi G. Ionotropic glutamate receptors: still a target for neuroprotection in brain ischemia? Insights from in vitro studies. *Neurobiol Dis*. 2003, 12 (1): 82-88.
- Calabresi P, Marti M, Picconi B, Saulle E, Costa C, Centonze D, Pisani F, Bernardi G. Lamotrigine and remacemide protect striatal neurons against in vitro ischemia: an electrophysiological study. *Exp Neurol*. 2003, 182 (2): 461-469.

- Cassarino DS, Bennett JP Jr. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Res Brain Res Rev.* 1999, 29 (1): 1-25.
- Castro-Gago M, Blanco-Barca MO, Campos-González Y, Arenas-Barbero J, Pintos-Martínez E, Eirís-Puñal J. Epidemiology of pediatric mitochondrial respiratory chain disorders in northwest Spain. *Pediatr Neurol.* 2006, 34 (3): 204-211.
- Cha BH, Silveira DC, Liu X, Hu Y, Holmes GL. Effect of topiramate following recurrent and prolonged seizures during early development. *Epilepsy Res.* 2002, 51 (3): 217-232.
- Chang DT, Rintoul GL, Pandipati S, Reynolds IJ. Mutant huntingtin aggregates impair mitochondrial movement and trafficking in cortical neurons. *Neurobiol Dis.* 2006, 22 (2): 388-400.
- Chang YC, Rapoport SI, Rao JS. Chronic Administration of Mood Stabilizers Upregulates BDNF and Bcl-2 Expression Levels in Rat Frontal Cortex. *Neurochem Res.* 2008 Aug 22. [Epub ahead of print]
- Chechneva O, Dinkel K, Cavaliere F, Martinez-Sanchez M, Reymann KG. Anti-inflammatory treatment in oxygen-glucose-deprived hippocampal slice cultures is neuroprotective and associated with reduced cell proliferation and intact neurogenesis. *Neurobiol Dis.* 2006 Aug;23(2):247-259.
- Cheng YD, Al-Khoury L, Zivin JA. Neuroprotection for ischemic stroke: two decades of success and failure. *NeuroRx.* 2004, 1 (1): 36-45.
- Chiueh CC, Rauhala P. Free radicals and MPTP-induced selective destruction of substantia nigra compacta neurons. *Adv Pharmacol.* 1998, 42: 796-800.
- Choeiri C, Staines W, Messier C. Immunohistochemical localization and quantification of glucose transporters in the mouse brain. *Neuroscience.* 2002, 111 (1): 19-34.
- Choo YS, Johnson GV, MacDonald M, Detloff PJ, Lesort M. Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Hum Mol Genet.* 2004, 13 (14): 1407-1420.
- Chyan YJ, Poeggeler B, Omar RA, Chain DG, Frangione B, Ghiso J, Pappolla MA. Potent neuroprotective properties against the Alzheimer beta-amyloid by an endogenous melatonin-related indole structure, indole-3-propionic acid. *J Biol Chem.* 1999, 274 (31): 21937-21942.
- Cleeter MW, Cooper JM, Schapira AH. Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement. *J Neurochem.* 1992, 58 (2):786-789.
- Cleren C, Yang L, Lorenzo B, Calingasan NY, Schomer A, Sireci A, Wille EJ, Beal MF. Therapeutic effects of coenzyme Q10 (CoQ10) and reduced CoQ10 in the MPTP model of Parkinsonism. *J Neurochem.* 2008, 104 (6): 1613-1621.
- Coleman T, Ellis SW, Martin IJ, Lennard MS, Tucker GT. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) is N-demethylated by cytochromes P450 2D6, 1A2 and 3A4--implications for susceptibility to Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996, 277 (2): 685-690.
- Connop BP, Boegman RJ, Beninger RJ, Jhamandas K. Malonate-induced degeneration of basal forebrain cholinergic neurons: attenuation by lamotrigine, MK-801, and 7-nitroindazole. *J Neurochem.* 1997, 68 (3): 1191-1199.

- Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, Del Bo R, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Salani S, Fortunato F, Strazzer S, Bresolin N, Comi GP. Neural stem cells LewisX+ CXCR4+ modify disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis model. *Brain*. 2007, 130 (Pt 5): 1289-1305.
- Costa C, Belcastro V, Tozzi A, Di Filippo M, Tantucci M, Siliquini S, Autuori A, Picconi B, Spillantini MG, Fedele E, Pittaluga A, Raiteri M, Calabresi P. Electrophysiology and pharmacology of striatal neuronal dysfunction induced by mitochondrial complex I inhibition. *J Neurosci*. 2008, 28 (32): 8040-8052.
- Costa C, Martella G, Picconi B, Prosperetti C, Pisani A, Di Filippo M, Pisani F, Bernardi G, Calabresi P. Multiple mechanisms underlying the neuroprotective effects of antiepileptic drugs against in vitro ischemia. *Stroke*. 2006, 37 (5): 1319-1326.
- Craner MJ, Damarjian TG, Liu S, Hains BC, Lo AC, Black JA, Newcombe J, Cuzner ML, Waxman SG. Sodium channels contribute to microglia/macrophage activation and function in EAE and MS. *Glia*. 2005, 49 (2): 220-229.
- Creson TK, Yuan P, Manji HK, Chen G. Evidence for involvement of ERK, PI3K, and RSK in induction of Bcl-2 by valproate. *J Mol Neurosci*. 2009, 37 (2): 123-134.
- Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*. 1999, 341 (Pt 2): 233-249.
- Crumrine RC, Bergstrand K, Cooper AT, Faison WL, Cooper BR. Lamotrigine protects hippocampal CA1 neurons from ischemic damage after cardiac arrest. *Stroke*. 1997, 28 (11): 2230-2236; discussion 2237. Czapinski P, Blaszczyk B, Czuczwar SJ. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Curr Top Med Chem*. 2005, 5 (1): 3-14.
- Crumrine RC, Bergstrand K, Cooper AT, Faison WL, Cooper BR. Lamotrigine protects hippocampal CA1 neurons from ischemic damage after cardiac arrest. *Stroke*. 1997, 28 (11): 2230-6; discussion 2237.
- Cunningham MO, Jones RS. The anticonvulsant, lamotrigine decreases spontaneous glutamate release but increases spontaneous GABA release in the rat entorhinal cortex in vitro. *Neuropharmacology*. 2000, 39 (11): 2139-2146.
- Darios F, Muriel MP, Khondiker ME, Brice A, Ruberg M. Neurotoxic calcium transfer from endoplasmic reticulum to mitochondria is regulated by cyclin-dependent kinase 5-dependent phosphorylation of tau. *J Neurosci*. 2005, 25 (16): 4158-4168.
- Deierborg T, Soulet D, Roybon L, Hall V, Brundin P. Emerging restorative treatments for Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 2008, 85 (4): 407-432.
- Desai VG, Feuers RJ, Hart RW, Ali SF. MPP(+)-induced neurotoxicity in mouse is age-dependent: evidenced by the selective inhibition of complexes of electron transport. *Brain Res*. 1996, 715 (1-2): 1-8.
- Di Giovanni S, Movsesyan V, Ahmed F, Cernak I, Schinelli S, Stoica B, Faden AI. Cell cycle inhibition provides neuroprotection and reduces glial proliferation and scar formation after traumatic brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005, 102 (23): 8333-8338.
- Diguet E, Fernagut PO, Scherfler C, Wenning G, Tison F. Effects of riluzole on combined MPTP + 3-nitropropionic acid-induced mild to moderate striatonigral degeneration in mice. *J Neural Transm*. 2005, 112 (5): 613-631.
- Docagne F, Mestre L, Loría F, Hernangómez M, Correa F, Guaza C. Therapeutic potential of CB2 targeting in multiple sclerosis. *Expert Opin Ther Targets*. 2008, 12 (2): 185-195.
- Eberhardt O, Schulz JB. Apoptotic mechanisms and antiapoptotic therapy in the MPTP model of Parkinson's disease. *Toxicol Lett*. 2003, 139 (2-3): 135-151.

- Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *J Biol Chem*. 1995, 70 (49): 29083-29089.
- Eisen A, Stewart H, Schulzer M, Cameron D. Anti-glutamate therapy in amyotrophic lateral sclerosis: a trial using lamotrigine. *Can J Neurol Sci*. 1993, 20 (4): 297-301.
- Eisenberg E, River Y, Shifrin A, Krivoy N. Antiepileptic drugs in the treatment of neuropathic pain. *Drugs*. 2007, 67 (9): 1265-1289.
- Eren I, Naziroğlu M, Demirdaş A. Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. *Neurochem Res*. 2007, 32 (7): 1188-1195.
- Eslamboli A. Marmoset monkey models of Parkinson's disease: which model, when and why? *Brain Res Bull*. 2005, 68 (3): 140-149.
- Esposito E, Di Matteo V, Benigno A, Pierucci M, Crescimanno G, Di Giovanni G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2007, 205 (2): 295-312.
- Exner N, Treske B, Paquet D, Holmström K, Schiesling C, Gispert S, Carballo-Carbajal I, Berg D, Hoepken HH, Gasser T, Krüger R, Winklhofer KF, Vogel F, Reichert AS, Auburger G, Kahle PJ, Schmid B, Haass C. Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *J Neurosci*. 2007, 27 (45): 12413-12418.
- Feng HL, Leng Y, Ma CH, Zhang J, Ren M, Chuang DM. Combined lithium and valproate treatment delays disease onset, reduces neurological deficits and prolongs survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Neuroscience*. 2008, 155 (3): 567-572.
- Fernandes HB, Baimbridge KG, Church J, Hayden MR, Raymond LA. Mitochondrial sensitivity and altered calcium handling underlie enhanced NMDA-induced apoptosis in YAC128 model of Huntington's disease. *J Neurosci*. 2007, (50): 13614-13623.
- Ferrante RJ, Ryu H, Kibilus JK, D'Mello S, Sugars KL, Lee J, Lu P, Smith K, Browne S, Beal MF, Kristal BS, Stavrovskaya IG, Hewett S, Rubinsztein DC, Langley B, Ratan RR. Chemotherapy for the brain: the antitumor antibiotic mithramycin prolongs survival in a mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci*. 2004, 24 (46): 10335-10342.
- Filip V, Kolibás E. Selegiline in the treatment of Alzheimer's disease: a long-term randomized placebo-controlled trial. Czech and Slovak Senile Dementia of Alzheimer Type Study Group. *J Psychiatry Neurosci*. 1999, 24 (3): 234-243.
- Fornai F, Longone P, Cafaro L, Kastsuchenka O, Ferrucci M, Manca ML, Lazzeri G, Spalloni A, Bellio N, Lenzi P, Modugno N, Siciliano G, Isidoro C, Murri L, Ruggieri S, Paparelli A. Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008, 105 (6): 2052-2057.
- Frediani F. Anticonvulsant drugs in primary headaches prophylaxis. *Neurol Sci*. 2004, 25 S3: S161-S166.
- French JA, Kugler AR, Robbins JL, Knapp LE, Garofalo EA. Dose-response trial of pregabalin adjunctive therapy in patients with partial seizures. *Neurology*. 2003, 60 (10): 1631-1637.
- French JA, Kanner AM, Bautista J, et al. Efficacy and tolerability of the new antiepileptic drugs I: treatment of new onset epilepsy: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee and Quality Standards Subcommittee of the American

- Academy of Neurology and the American Epilepsy Society. *Neurology*. 2003, 60 (10): 1631-1637.
- Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med*. 2003, 348 (14): 1365-1375.
- Frima N, Grünewald RA. A double-blind, placebo-controlled, crossover trial of topiramate in essential tremor. *Clin Neuropharmacol*. 2006, 29 (2): 94-96.
- Garcia de Arriba S, Wegner F, Grüner K, Verdaguer E, Pallas M, Camins A, Wagner A, Wohlfahrt K, Allgaier C. Different capacities of various NMDA receptor antagonists to prevent ischemia-induced neurodegeneration in human cultured NT2 neurons. *Neurochem Int*. 2006, 49 (5): 466-474.
- Giros B, El Mestikawy S, Godinot N, Zheng K, Han, H, Yang-Feng T, Caron MG. Cloning, pharmacological characterization, and chromosome assignment of the human dopamine transporter. *Mol Pharmacol*. 1992, 42 (3): 383-390.
- Ghosh A, Roy A, Liu X, Kordower JH, Mufson EJ, Hartley DM, Ghosh S, Mosley RL, Gendelman HE, Pahan K. Selective inhibition of NF-kappaB activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007, 104 (47): 18754-18759.
- Graybiel AM, Aosaki T, Flaherty AW, Kimura M. The basal ganglia and adaptive motor control. *Science*. 1994, 265 (5180): 1826-1831.
- Grünblatt E, Mandel S, Youdim MB. Neuroprotective strategies in Parkinson's disease using the models of 6-hydroxydopamine and MPTP. *Ann N Y Acad Sci*. 2000, 899: 262-273.
- Grunze H, Greene RW, Möller HJ, Meyer T, Walden J. Lamotrigine may limit pathological excitation in the hippocampus by modulating a transient potassium outward current. *Brain Res*. 1998, 791 (1-2): 330-334.
- Hamani C, Lozano AM. Physiology and pathophysiology of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2003, 991: 15-21.
- Hanon E, Klitgaard H. Neuroprotective properties of the novel antiepileptic drug levetiracetam in the middle cerebral artery occlusion model of focal cerebral ischemia. *Seizure*. 2001, 10 (4): 287-293.
- Hashimoto M, Rockenstein E, Crews L, Masliah E. Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neuromolecular Med*. 2003, 4 (1-2): 21-36.
- Hashimoto Y, Ito Y, Niikura T, Shao Z, Hata M, Oyama F, Nishimoto I. Mechanisms of neuroprotection by a novel rescue factor humanin from Swedish mutant amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001, 283 (2): 460-468.
- Heales SJ, Lam AA, Duncan AJ, Land JM. Neurodegeneration or neuroprotection: the pivotal role of astrocytes. *Neurochem Res*. 2004, 29 (3): 513-519.
- Hill MD. Stroke: the dashed hopes of neuroprotection. *Lancet Neurol*. 2007, 6 (1): 2-3.
- Hill MP, Bezard E, McGuire SG, Crossman AR, Brotchie JM, Michel A, Grimée R, Klitgaard H. Novel antiepileptic drug levetiracetam decreases dyskinesia elicited by L-dopa and ropinirole in the MPTP-lesioned marmoset. *Mov Disord*. 2003, 18 (11): 1301-1305.
- Hosak L, Libiger J. Antiepileptic drugs in schizophrenia: a review. *Eur Psychiatr*. 2002, 17 (7): 371-378.
- Hu LF, Wang S, Shi XR, Yao HH, Sun YH, Ding JH, Liu SY, Hu G. ATP-sensitive potassium channel opener iptakalim protected against the cytotoxicity of MPP⁺ on

- SH-SY5Y cells by decreasing extracellular glutamate level. *J Neurochem.* 2005, 94 (6): 1570-1579.
- Huang W, Chen Y, Shohami E, Weinstock M. Neuroprotective effect of rasagiline, a selective monoamine oxidase-B inhibitor, against closed head injury in the mouse. *Eur J Pharmacol.* 1999, 366 (2-3): 127-135.
- Hwang H, Kim KJ. New antiepileptic drugs in pediatric epilepsy. *Brain Dev.* 2008, 30 (9): 549-555.
- Iqbal S, Baziany A, Gordon S, Wright S, Hussain M, Miyashita H, Shuaib A, Hasan Rajput A. Neuroprotective effect of tiagabine in transient forebrain global ischemia: an in vivo microdialysis, behavioral, and histological study. *Brain Res.* 2002, 946 (2): 162-170.
- Irwin I, Finnegan KT, Delanney LE, Di Monte D, Langston JW. The relationships between aging, monoamine oxidase, striatal dopamine and the effects of MPTP in C57BL/6 mice: a critical reassessment. *Brain Res.* 1992, 572 (1-2): 224-231.
- Jackson-Lewis V, Przedborski S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nat Protoc.* 2007, 2(1): 141-151.
- Jacobs HT, Fernández-Ayala DJ, Manjiry S, Kemppainen E, Toivonen JM, O'Dell KM. Mitochondrial disease in flies. *Biochim Biophys Acta.* 2004, 1659 (2-3): 190-196.
- Jacobson J, Duchen MR. Mitochondrial oxidative stress and cell death in astrocytes--requirement for stored Ca²⁺ and sustained opening of the permeability transition pore. *J Cell Sci.* 2002, 115(Pt 6): 1175-1188.
- Jacobson J, Duchen MR, Hothersall J, Clark JB, Heales SJ. Induction of mitochondrial oxidative stress in astrocytes by nitric oxide precedes disruption of energy metabolism. *J Neurochem.* 2005, 95 (2): 388-395.
- Jin K, LaFevre-Bernt M, Sun Y, Chen S, Gafni J, Crippen D, Logvinova A, Ross CA, Greenberg DA, Ellerby LM. FGF-2 promotes neurogenesis and neuroprotection and prolongs survival in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005, 102 (50): 18189-18194.
- Johannessen Landmark C. Antiepileptic drugs in non-epilepsy disorders: relations between mechanisms of action and clinical efficacy. *CNS Drugs.* 2008, 22 (1): 27-47.
- Jones L, Fischer I, Levitt P. Nonuniform alteration of dendritic development in the cerebral cortex following prenatal cocaine exposure. *Cereb Cortex.* 1996, 6 (3): 432-445.
- Jones-Humble SA, Morgan PF, Cooper BR. The novel anticonvulsant lamotrigine prevents dopamine depletion in C57 black mice in the MPTP animal model of Parkinson's disease. *Life Sci.* 1994, 54 (4): 245-252.
- Juhaszova M, Wang S, Zorov DB, Nuss HB, Gleichmann M, Mattson MP, Sollott SJ. The identity and regulation of the mitochondrial permeability transition pore: where the known meets the unknown. *Ann N Y Acad Sci.* 2008, 1123: 197-212.
- Kaal EC, Vlug AS, Versleijen MW, Kuilman M, Joosten EA, Bär PR. Chronic mitochondrial inhibition induces selective motoneuron death in vitro: a new model for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 2000, 74 (3): 1158-1165.
- Kalda A, Yu L, Oztas E, Chen JF. Novel neuroprotection by caffeine and adenosine A(2A) receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 2006, 248 (1-2): 9-15.
- Kapadia R, Yi JH, Vemuganti R. Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR-gamma agonists. *Front Biosci.* 2008, 13: 1813-1826.

- Kapatos G, Zigmond M. Dopamine biosynthesis from L-tyrosine and L-phenylalanine in rat brain synaptosomes: preferential use of newly accumulated precursors. *J Neurochem.* 1977, 28 (5): 1109-1119.
- Kapoor R. Sodium channel blockers and neuroprotection in multiple sclerosis using lamotrigine. *J Neurol Sci.* 2008, 274 (1-2): 54-56.
- Katoh-Semba R, Asano T, Ueda H, Morishita R, Takeuchi IK, Inaguma Y, Kato K. Riluzole enhances expression of brain-derived neurotrophic factor with consequent proliferation of granule precursor cells in the rat hippocampus. *FASEB J.* 2002, 16 (10): 1328-1330.
- Kelly RB. Storage and release of neurotransmitters. *Cell.* 1993, 72 S: 43-53.
- Kim AJ, Shi Y, Austin RC, Werstuck GH. Valproate protects cells from ER stress-induced lipid accumulation and apoptosis by inhibiting glycogen synthase kinase-3. *J Cell Sci.* 2005, 118 (Pt 1): 89-99.
- Kim HS, Suh YH. Minocycline and neurodegenerative diseases. *Behav Brain Res.* 2009, 196 (2): 168-179.
- Kim YJ, Ko HH, Han ES, Lee CS. Lamotrigine inhibition of rotenone- or 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced mitochondrial damage and cell death. *Brain Res Bull.* 2007, 71 (6): 633-640.
- Kito M, Maehara M, Watanabe K. Antiepileptic drugs--calcium current interaction in cultured human neuroblastoma cells. *Seizure.* 1994, 3 (2): 141-149.
- Kuo CC. A common anticonvulsant binding site for phenytoin, carbamazepine, and lamotrigine in neuronal Na⁺ channels. *Mol Pharmacol.* 1998, 54 (4): 712-721.
- Kuo CC, Lu L. Characterization of lamotrigine inhibition of Na⁺ channels in rat hippocampal neurones. *Br J Pharmacol.* 1997, 121 (6): 1231-1238.
- Kyriazis M. Neuroprotective, anti-apoptotic effects of apomorphine. *J Anti Aging Med.* 2003, 6 (1): 21-28.
- Kölker S, Schwab M, Hörster F, Sauer S, Hinz A, Wolf NI, Mayatepek E, Hoffmann GF, Smeitink JA, Okun JG. Methylmalonic acid, a biochemical hallmark of methylmalonic acidurias but no inhibitor of mitochondrial respiratory chain. *J Biol Chem.* 2003, 278 (48): 47388-47393.
- Kremer B, Clark CM, Almqvist EW, Raymond LA, Graf P, Jacova C, Mezei M, Hardy MA, Snow B, Martin W, Hayden MR. Influence of lamotrigine on progression of early Huntington disease: a randomized clinical trial. *Neurology.* 1999, 53 (5): 1000-1011.
- Kupersmidt L, Amit T, Bar-Am O, Youdim MB, Blumenfeld Z. The neuroprotective effect of Activin A and B: implication for neurodegenerative diseases. *J Neurochem.* 2007, 103 (3): 962-971.
- Kurian MA, Morgan NV, MacPherson L, Foster K, Peake D, Gupta R, Philip SG, Hendriksz C, Morton JE, Kingston HM, Rosser EM, Wassmer E, Gissen P, Maher ER. Phenotypic spectrum of neurodegeneration associated with mutations in the PLA2G6 gene (PLAN). *Neurology.* 2008, 70 (18): 1623-1629.
- Laeng P, Pitts RL, Lemire AL, Drabik CE, Weiner A, Tang H, Thyagarajan R, Mallon BS, Altar CA. The mood stabilizer valproic acid stimulates GABA neurogenesis from rat forebrain stem cells. *J Neurochem.* 2004, 91 (1): 238-251.
- Laguerre E, Chalon S, Bodard S, Saliba E, Gressens P, Castelnau P. Lamotrigine is neuroprotective in the energy deficiency model of MPTP intoxicated mice. *Pediatr Res.* 2007, 62 (1): 14-19.
- Lan J, Jiang DH. Desferrioxamine and vitamin E protect against iron and MPTP-induced neurodegeneration in mice. *J Neural Transm.* 1997, 104 (4-5): 469-481.

- Lang-Lazdunski L, Heurteaux C, Mignon A, Mantz J, Widmann C, Desmonts J, Lazdunski M. Ischemic spinal cord injury induced by aortic cross-clamping: prevention by riluzole. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2000, 18 (2): 174-181.
- Lange KW, Riederer P. Glutamatergic drugs in Parkinson's disease. *Life Sci*. 1994, 55 (25-26): 2067-2075.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*. 1983, 219 (4587): 979-980.
- Le WD, Jankovic J, Xie W, Appel SH. Antioxidant property of pramipexole independent of dopamine receptor activation in neuroprotection. *J Neural Transm*. 2000, 107 (10): 1165-1173.
- Lebon S, Minai L, Chretien D, Corcos J, Serre V, Kadhon N, Steffann J, Pauchard JY, Munnich A, Bonnefont JP, Rötig A. A novel mutation of the NDUFS7 gene leads to activation of a cryptic exon and impaired assembly of mitochondrial complex I in a patient with Leigh syndrome. *Mol Genet Metab*. 2007, 92 (1-2): 104-108.
- Lee WT, Shen YZ, Chang C. Neuroprotective effect of lamotrigine and MK-801 on rat brain lesions induced by 3-nitropropionic acid: evaluation by magnetic resonance imaging and in vivo proton magnetic resonance spectroscopy. *Neuroscience*. 2000, 95 (1): 89-95.
- Leviel V. The reverse transport of DA, what physiological significance? *Neurochem Int*. 2001, 38 (2): 83-106.
- Levitt P, Harvey JA, Friedman E, Simansky K, Murphy EH. New evidences for neurotransmitter influence on brain development. *Trends Neurosci*. 1997, 20 (6): 269-274.
- Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. 2008, 27 (48): 6194-6206.
- Li X, Bijur GN, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3beta, mood stabilizers, and neuroprotection. *Bipolar Disord*. 2002, 4 (2): 137-144.
- Lindvall O, Björklund A, Skagerberg G. Selective histochemical demonstration of dopamine terminal systems in rat di- and telencephalon: new evidence for dopaminergic innervation of hypothalamic neurosecretory nuclei. *Brain Res*. 1984, 306 (1-2): 19-30.
- Lipton SA. Pathologically-activated therapeutics for neuroprotection: mechanism of NMDA receptor block by memantine and S-nitrosylation. *Curr Drug Targets*. 2007, 8 (5): 621-632.
- Longo R, Domenici MR, Scotti de Carolis A, Sagratella S. Felbamate selectively blocks in vitro hippocampal kainate-induced irreversible electrical changes. *Life Sci*. 1995, 56 (21): PL409-414.
- Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA. Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J*. 1994, 8 (13): 1003-1011.
- Maj R, Fariello RG, Ukmar G, Varasi M, Pevarello P, McArthur RA, Salvati P. PNU-151774E protects against kainate-induced status epilepticus and hippocampal lesions in the rat. *Eur J Pharmacol*. 1998, 359 (1): 27-32.
- Makkonen I, Riikonen R, Kokki H, Airaksinen MM, Kuikka JT. Serotonin and dopamine transporter binding in children with autism determined by SPECT. *Dev Med Child Neurol*. 2008, 50(8): 593-597.
- Malfatti E, Bugiani M, Invernizzi F, de Souza CF, Farina L, Carrara F, Lamantea E, Antozzi C, Confalonieri P, Sanseverino MT, Giugliani R, Uziel G, Zeviani M. Novel mutations

- of ND genes in complex I deficiency associated with mitochondrial encephalopathy. *Brain*. 2007, 130 (Pt 7): 1894-1904.
- Mandavilli BS, Ali SF, Van Houten B. DNA damage in brain mitochondria caused by aging and MPTP treatment. *Brain Res*. 2000, 885 (1): 45-52.
- Mandel S, Amit T, Bar-Am O, Youdim MB. Iron dysregulation in Alzheimer's disease: multimodal brain permeable iron chelating drugs, possessing neuroprotective-neurorescue and amyloid precursor protein-processing regulatory activities as therapeutic agents. *Prog Neurobiol*. 2007, 82 (6): 348-360.
- Mandel S, Grünblatt E, Riederer P, Gerlach M, Levites Y, Youdim MB. Neuroprotective strategies in Parkinson's disease: an update on progress. *CNS Drugs*. 2003, 17 (10): 729-762.
- Manel N, Kim FJ, Kinet S, Taylor N, Sitbon M, Battini JL. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell*. 2003, 115 (4): 449-459.
- Mao P, Ardeshiri A, Jacks R, Yang S, Hurn PD, Alkayed NJ. Mitochondrial mechanism of neuroprotection by CART. *Eur J Neurosci*. 2007, 26 (3): 624-632.
- Maracchioni A, Totaro A, Angelini DF, Di Penta A, Bernardi G, Carri MT, Achsel T. Mitochondrial damage modulates alternative splicing in neuronal cells: implications for neurodegeneration. *J Neurochem*. 2007, 100 (1): 142-153.
- Marella M, Seo BB, Nakamaru-Ogiso E, Greenamyre JT, Matsuno-Yagi A, Yagi T. Protection by the NDI1 gene against neurodegeneration in a rotenone rat model of Parkinson's disease. *PLoS ONE*. 2008, 3 (1): e1433.
- Mather M, Rottenberg H. Aging enhances the activation of the permeability transition pore in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000, 273 (2): 603-608.
- Matthews RT, Klivenyi P, Mueller G, Yang L, Wermer M, Thomas CE, Beal MF. Novel free radical spin traps protect against malonate and MPTP neurotoxicity. *Exp Neurol*. 1999, 157 (1): 120-126.
- Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron*. 2008, 60 (5): 748-766.
- Maurer I, Zierz S, Möller HJ. A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. *Neurobiol Aging*. 2000, 21 (3): 455-462.
- Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Antolín I, Rodríguez C, Reiter RJ. Melatonin and Parkinson's disease. *Endocrine*. 2005, 27 (2): 169-178.
- McGowan KM, Police S, Winslow JB, Pekala PH. Tumor necrosis factor-alpha regulation of glucose transporter (GLUT1) mRNA turnover. Contribution of the 3'-untranslated region of the GLUT1 message. *J Biol Chem*. 1997, 272 (2): 1331-1337.
- Mc Ilwain H. Metabolic response in vitro to electrical stimulation of sections of mammalian brain. *Biochem J*. 1951, 49 (3): 382-393.
- Melamed E, Martinovits G, Pikarsky E, Rosenthal J, Uzzan A. Diphenylhydantoin and phenobarbital suppress the dopaminergic neurotoxicity of MPTP in mice. *Eur J Pharmacol*. 1986, 128 (3): 255-257.
- Miletich RS, Bankiewicz KS, Quarantelli M, Plunkett RJ, Frank J, Kopin IJ, Di Chiro G. MRI detects acute degeneration of the nigrostriatal dopamine system after MPTP exposure in hemiparkinsonian monkeys. *Ann Neurol*. 1994, 35 (6): 689-697.
- Miller RG, Mitchell JD, Lyon M, Moore DH. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev*. 2007, (1): CD001447.

- Minghetti L, Greco A, Potenza RL, Pezzola A, Blum D, Bantubungi K, Popoli P. Effects of the adenosine A2A receptor antagonist SCH 58621 on cyclooxygenase-2 expression, glial activation, and brain-derived neurotrophic factor availability in a rat model of striatal neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007, 66 (5): 363-371.
- Minghetti L, Ajmone-Cat MA, De Berardinis MA, De Simone R. Microglial activation in chronic neurodegenerative diseases: roles of apoptotic neurons and chronic stimulation. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005, 48 (2): 251-256.
- Mitchell IJ, Carroll CB. Reversal of parkinsonian symptoms in primates by antagonism of excitatory amino acid transmission: potential mechanisms of action. *Neurosci Biobehav Rev*. 1997, 21 (4): 469-475.
- Mizuno Y, Suzuki K, Sone N, Saitoh T. Inhibition of mitochondrial respiration by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in mouse brain in vivo. *Neurosci Lett*. 1988, 91 (3): 349-353.
- Mizuno Y, Sone N, Saitoh T. Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion on activities of the enzymes in the electron transport system in mouse brain. *J Neurochem*. 1987, 48 (6): 1787-1793.
- Mora F, Segovia G, Del Arco A. Glutamate-dopamine-GABA interactions in the aging basal ganglia. *Brain Res Rev*. 2008, 58 (2): 340-353.
- Morale MC, Serra PA, L'episcopo F, Tirolo C, Caniglia S, Testa N, Gennuso F, Giaquinta G, Rocchitta G, Desole MS, Miele E, Marchetti B. Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration. *Neuroscience*. 2006, 138 (3): 869-878.
- Morland C, Boldingh KA, Iversen EG, Hassel B. Valproate is neuroprotective against malonate toxicity in rat striatum: an association with augmentation of high-affinity glutamate uptake. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004, 24 (11): 1226-1234.
- Mosconi L, Tsui WH, Herholz K, Pupi A, Drzezga A, Lucignani G, Reiman EM, Holthoff V, Kalbe E, Sorbi S, Diehl-Schmid J, Perneczky R, Clerici F, Caselli R, Beuthien-Baumann B, Kurz A, Minoshima S, de Leon MJ. Multicenter standardized 18F-FDG PET diagnosis of mild cognitive impairment, Alzheimer's disease, and other dementias. *J Nucl Med*. 2008, 49 (3): 390-398.
- Murphy AN, Fiskum G, Beal MF. Mitochondria in neurodegeneration: bioenergetic function in cell life and death. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999, 19 (3): 231-245.
- Murray RM, Lappin J, Di Forti M. Schizophrenia: from developmental deviance to dopamine dysregulation. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2008, 18 Suppl 3: S129-S134.
- Nagatsu T, Sawada M. Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines. *Curr Pharm Des*. 2005, 11 (8): 999-1016.
- Nicholls DG, Vesce S, Kirk L, Chalmers S. Interactions between mitochondrial bioenergetics and cytoplasmic calcium in cultured cerebellar granule cells. *Cell Calcium*. 2003, 34 (4-5): 407-424.
- Nijboer CH, Heijnen CJ, Groenendaal F, May MJ, van Bel F, Kavelaars A. Strong neuroprotection by inhibition of NF-kappaB after neonatal hypoxia-ischemia involves apoptotic mechanisms but is independent of cytokines. *Stroke*. 2008, 39 (7): 2129-2137.
- Nisticò R, Piccirilli S, Sebastianelli L, Nisticò G, Bernardi G, Mercuri NB. The blockade of K(+)-ATP channels has neuroprotective effects in an in vitro model of brain ischemia. *Int Rev Neurobiol*. 2007, 82: 383-395.

- Noh KM, Hwang JY, Shin HC, Koh JY. A novel neuroprotective mechanism of riluzole: direct inhibition of protein kinase C. *Neurobiol Dis.* 2000, 7 (4): 375-383.
- Obinu MC, Reibaud M, Blanchard V, Moussaoui S, Imperato A. Neuroprotective effect of riluzole in a primate model of Parkinson's disease: behavioral and histological evidence. *Mov Disord.* 2002, 17 (1): 13-19.
- Ohsawa I, Nishimaki K, Murakami Y, Suzuki Y, Ishikawa M, Ohta S. Age-dependent neurodegeneration accompanying memory loss in transgenic mice defective in mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 activity. *J Neurosci.* 2008, 28 (24): 6239-6249.
- Oliveira JM, Chen S, Almeida S, Riley R, Gonçalves J, Oliveira CR, Hayden MR, Nicholls DG, Ellerby LM, Rego AC. Mitochondrial-dependent Ca²⁺ handling in Huntington's disease striatal cells: effect of histone deacetylase inhibitors. *J Neurosci.* 2006, 26 (43): 11174-11186.
- Palacino JJ, Sagi D, Goldberg MS, Krauss S, Motz C, Wacker M, Klose J, Shen J. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem.* 2004, 279 (18): 18614-18622.
- Palmer GC. Neuroprotection by NMDA receptor antagonists in a variety of neuropathologies. *Curr Drug Targets.* 2001, 2 (3): 241-271.
- Pan T, Li X, Xie W, Jankovic J, Le W. Valproic acid-mediated Hsp70 induction and anti-apoptotic neuroprotection in SH-SY5Y cells. *FEBS Lett.* 2005, 579 (30): 6716-6720.
- Pandya JD, Pauly JR, Nukala VN, Sebastian AH, Day KM, Korde AS, Maragos WF, Hall ED, Sullivan PG. Post-Injury Administration of Mitochondrial Uncouplers Increases Tissue Sparing and Improves Behavioral Outcome following Traumatic Brain Injury in Rodents. *J Neurotrauma.* 2007, 24 (5): 798-811.
- Panov AV, Gutekunst CA, Leavitt BR, Hayden MR, Burke JR, Strittmatter WJ, Greenamyre JT. Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci.* 2002, 5 (8): 731-736.
- Paschos N, Lykissas MG, Beris AE. The role of erythropoietin as an inhibitor of tissue ischemia. *Int J Biol Sci.* 2008, 4 (3): 161-168.
- Pavone A, Cardile V. An in vitro study of new antiepileptic drugs and astrocytes. *Epilepsia.* 2003, 44 Suppl 10: 34-39.
- Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, Serres S, Merle M, Costalat R, Magistretti PJ. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia.* 2007, 55 (12): 1251-1262.
- Pellerin L, Magistretti PJ. Excitatory amino acids stimulate aerobic glycolysis in astrocytes via an activation of the Na⁺/K⁺ ATPase. *Dev Neurosci.* 1996, 18 (5-6): 336-342.
- Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994, 91 (22): 10625-10629.
- Piao YS, Tang GC, Yang H, Lu DH. Clinico-neuropathological study of a Chinese case of familial adult Leigh syndrome. *Neuropathology.* 2006, 26 (3): 218-221.
- Picciotto MR, Zoli M. Neuroprotection via nAChRs: the role of nAChRs in neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's disease. *Front Biosci.* 2008, 13: 492-504.

- Ponchaut S, van Hoof F, Veitch K. Cytochrome aa3 depletion is the cause of the deficient mitochondrial respiration induced by chronic valproate administration. *Biochem Pharmacol.* 1992, 43 (3): 644-647.
- Przedborski S, Jackson-Lewis V, Djaldetti R, Liberatore G, Vila M, Vukosavic S, Almer G. The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism. *Restor Neurol Neurosci.* 2000, 16 (2): 135-142.
- Qi X, Lewin AS, Sun L, Hauswirth WW, Guy J. SOD2 gene transfer protects against optic neuropathy induced by deficiency of complex I. *Ann Neurol.* 2004, 56 (2): 182-191.
- Quinn LP, Stean TO, Chapman H, Brown M, Vidgeon-Hart M, Upton N, Billinton A, Virley DJ. Further validation of LABORAS using various dopaminergic manipulations in mice including MPTP-induced nigro-striatal degeneration. *J Neurosci Methods.* 2006, 156 (1-2): 218-227.
- Quinn LP, Perren MJ, Brackenborough KT, Woodhams PL, Vidgeon-Hart M, Chapman H, Pangalos MN, Upton N, Virley DJ. A beam-walking apparatus to assess behavioural impairments in MPTP-treated mice: pharmacological validation with R-(-)-deprenyl. *J Neurosci Methods.* 2007 Aug 15;164(1):43-9.
- Ragsdale DS, Avoli M. Sodium channels as molecular targets for antiepileptic drugs. *Brain Res Brain Res Rev.* 1998, 26 (1): 16-28.
- Ramírez BG, Blázquez C, Gómez del Pulgar T, Guzmán M, de Ceballos ML. Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci.* 2005, 25 (8): 1904-1913.
- Ramirez AD, Liu X, Menniti FS. Repeated estradiol treatment prevents MPTP-induced dopamine depletion in male mice. *Neuroendocrinology.* 2003, 77 (4): 223-231.
- Rego AC, Oliveira CR. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem Res.* 2003, 28 (10): 1563-1574.
- Reimers A, Skogvoll E, Sund JK, Spigset O. Lamotrigine in children and adolescents: the impact of age on its serum concentrations and on the extent of drug interactions. *Eur J Clin Pharmacol.* 2007, 63 (7): 687-692.
- Rush AM, Elliott JR. Phenytoin and carbamazepine: differential inhibition of sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *Neurosci Lett.* 1997, 226 (2): 95-98.
- Ryberg H, Askmark H, Persson LI. A double-blind randomized clinical trial in amyotrophic lateral sclerosis using lamotrigine: effects on CSF glutamate, aspartate, branched-chain amino acid levels and clinical parameters. *Acta Neurol Scand.* 2003, 108 (1): 1-8.
- Rozas G, López-Martín E, Guerra MJ, Labandeira-García JL. The overall rod performance test in the MPTP-treated-mouse model of Parkinsonism. *J Neurosci Methods.* 1998, 83 (2): 165-175.
- Sabers A, Gram L. Newer anticonvulsants: comparative review of drug interactions and adverse effects. *Drugs.* 2000, 60 (1): 23-33.
- Saudubray JM, Charpentier C. Clinical phenotypes: diagnosis / algorithms. In Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D. "*The metabolic and molecular bases of inherited diseases*". Eds Mc Graw Hill 1995 p327-p400.
- Schapira AH. Progress in neuroprotection in Parkinson's disease. *Eur J Neurol.* 2008, 15 Suppl 1: 5-13.

- Schapira AH. Neuroprotection and dopamine agonists. *Neurology*. 2002, 58 (4 Suppl 1): S9-S18.
- Schapira AH. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. *Biochim Biophys Acta*. 1998, 1366 (1-2): 225-233.
- Schiff M, Miné M, Brivet M, Marsac C, Elmaleh-Bergés M, Evrard P, Ogier de Baulny H. Leigh's disease due to a new mutation in the PDHX gene. *Ann Neurol*. 2006, 59 (4): 709-714. Erratum in: *Ann Neurol*. 2006, 59 (6): 990.
- Schmidt WJ, Alam M. Controversies on new animal models of Parkinson's disease pro and con: the rotenone model of Parkinson's disease (PD). *J Neural Transm Suppl*. 2006, (70): 273-276.
- Schulz JB, Matthews RT, Klockgether T, Dichgans J, Beal MF. The role of mitochondrial dysfunction and neuronal nitric oxide in animal models of neurodegenerative diseases. *Mol Cell Biochem*. 1997, 174 (1-2): 193-197.
- Schurr A. Neuroprotection against ischemic/hypoxic brain damage: blockers of ionotropic glutamate receptor and voltage sensitive calcium channels. *Curr Drug Targets*. 2004, 5 (7): 603-618.
- Senatorov VV, Ren M, Kanai H, Wei H, Chuang DM. Short-term lithium treatment promotes neuronal survival and proliferation in rat striatum infused with quinolinic acid, an excitotoxic model of Huntington's disease. *Mol Psychiatry*. 2004, 9 (4): 371-385.
- Sfaello I, Baud O, Arzimanoglou A, Gressens P. Topiramate prevents excitotoxic damage in the newborn rodent brain. *Neurobiol Dis*. 2005, 20 (3): 837-848.
- Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, Hurley RL, Witters LA, DePinho RA, Cantley LC. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004, 101 (10): 3329-3335.
- Shechter T, Shorer Z, Kramer U, Lerman-Sagie T, Ronen E, Rotem R, Gorodischer R. Adverse reactions of Topiramate and Lamotrigine in children. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2005, 14 (3): 187-192.
- Shin JY, Fang ZH, Yu ZX, Wang CE, Li SH, Li XJ. Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. *J Cell Biol*. 2005, 171 (6): 1001-1012.
- Shinotoh H, Vingerhoets FJ, Lee CS, Uitti RJ, Schulzer M, Calne DB, Tsui J. Lamotrigine trial in idiopathic parkinsonism: a double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Neurology*. 1997, 48 (5): 1282-1285.
- Shuaib A, Mahmood RH, Wishart T, Kanthan R, Murabit MA, Ijaz S, Miyashita H, Howlett W. Neuroprotective effects of lamotrigine in global ischemia in gerbils. A histological, in vivo microdialysis and behavioral study. *Brain Res*. 1995, 702 (1-2): 199-206.
- Siegel G. Section 6: Inherited and neurodegenerative diseases, in: Siegel G, Albers RW, Brady S, Price D (7th ed), *Basic Neurochemistry*. New-York: Academic Press, 2005, 992p.
- Simpson IA, Dwyer D, Malide D, Moley KH, Travis A, Vannucci SJ. The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008, 295 (2): E242-E253.
- Smeyne M, Jiao Y, Shepherd KR, Smeyne RJ. Glia cell number modulates sensitivity to MPTP in mice. *Glia*. 2005, 52 (2): 144-152.
- Smidt MP, Smits SM, Burbach JP. Molecular mechanisms underlying midbrain dopamine neuron development and function. *Eur J Pharmacol*. 2003, 480 (1-3): 75-88.

- Soliman Y, Jackson T, Mazzio E, Soliman KF. The effects of piroxicam in the attenuation of MPP+/MPTP toxicity in vitro and in vivo. *Neurochem Res*. 2009, 34 (2): 304-310.
- Squier TC, Bigelow DJ. Protein oxidation and age-dependent alterations in calcium homeostasis. *Front Biosci*. 2000, 5: D504-D526.
- Sriram K, Pai KS, Boyd MR, Ravindranath V. Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: in vitro and in vivo studies in mice. *Brain Res*. 1997 Feb, 749 (1): 44-52.
- Stefani A, Spadoni F, Bernardi G. Differential inhibition by riluzole, lamotrigine, and phenytoin of sodium and calcium currents in cortical neurons: implications for neuroprotective strategies. *Exp Neurol*. 1997, 147 (1): 115-122.
- Stefanova N, Puschban Z, Fernagut PO, Brouillet E, Tison F, Reindl M, Jellinger KA, Poewe W, Wenning GK. Neuropathological and behavioral changes induced by various treatment paradigms with MPTP and 3-nitropropionic acid in mice: towards a model of striatonigral degeneration (multiple system atrophy). *Acta Neuropathol*. 2003, 106 (2): 157-166.
- Stepień K, Tomaszewski M, Czuczwar SJ. Neuroprotective properties of statins. *Pharmacol Rep*. 2005, 57 (5): 561-569.
- Storch A, Burkhardt K, Ludolph AC, Schwarz J. Protective effects of riluzole on dopamine neurons: involvement of oxidative stress and cellular energy metabolism. *J Neurochem*. 2000, 75 (6): 2259-2269.
- Strauss KA, Morton DH. Type I glutaric aciduria, part 2: a model of acute striatal necrosis. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2003, 121C (1): 53-70.
- Streit WJ. Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005, 48 (2): 234-239.
- Sugama S, Yang L, Cho BP, DeGiorgio LA, Lorenzl S, Albers DS, Beal MF, Volpe BT, Joh TH. Age-related microglial activation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurodegeneration in C57BL/6 mice. *Brain Res*. 2003 Feb 28;964(2):288-94.
- Swerdlow RH, Parks JK, Miller SW, Tuttle JB, Trimmer PA, Sheehan JP, Bennett JP Jr, Davis RE, Parker WD Jr. Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 1996, 40 (4): 663-671.
- Takeuchi H, Jin S, Wang J, Zhang G, Kawanokuchi J, Kuno R, Sonobe Y, Mizuno T, Suzumura A. Tumor necrosis factor- α induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J Biol Chem*. 2006, 281 (30): 21362-21368.
- Tallian KB, Nahata MC, Lo W, Tsao CY. Pharmacokinetics of gabapentin in paediatric patients with uncontrolled seizures. *J Clin Pharm Ther*. 2004, 29 (6): 511-555.
- Taoufik E, Valable S, Müller GJ, Roberts ML, Divoux D, Tinel A, Voulgari-Kokota A, Tseveleki V, Altruda F, Lassmann H, Petit E, Probert L. FLIP(L) protects neurons against in vivo ischemia and in vitro glucose deprivation-induced cell death. *J Neurosci*. 2007, 27 (25): 6633-6646.
- Thomas M, Hayflick SJ, Jankovic J. Clinical heterogeneity of neurodegeneration with brain iron accumulation (Hallervorden-Spatz syndrome) and pantothenate kinase-associated neurodegeneration. *Mov Disord*. 2004, 19 (1): 36-42.
- Thomas T, Timmer M, Cesnulevicius K, Hitti E, Kotlyarov A, Gaestel M. MAPKAP kinase 2-deficiency prevents neurons from cell death by reducing neuroinflammation--

- relevance in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2008, 105 (5): 2039-2052.
- Thorns V, Masliah E. Evidence for neuroprotective effects of acidic fibroblast growth factor in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1999, 58 (3): 296-306.
- Toublanc N, Sargentini-Maier ML, Lacroix B, Jacqmin P, Stockis A. Retrospective population pharmacokinetic analysis of levetiracetam in children and adolescents with epilepsy: dosing recommendations. *Clin Pharmacokinet*. 2008, 47 (5): 333-341.
- Tripp G, Wickens JR. Research review: dopamine transfer deficit: a neurobiological theory of altered reinforcement mechanisms in ADHD. *J Child Psychol Psychiatry*. 2008, 49 (7): 691-704.
- Tufan K, Oztanir N, Ofluoglu E, Ozogul C, Uzum N, Dursun A, Pasaoglu H, Pasaoglu A. Ultrastructure protection and attenuation of lipid peroxidation after blockade of presynaptic release of glutamate by lamotrigine in experimental spinal cord injury. *Neurosurg Focus*. 2008, 25 (5): E6.
- Tyynismaa H, Suomalainen A. Mouse models of mitochondrial DNA defects and their relevance for human disease. *EMBO Rep*. 2009, 10 (2): 137-143.
- Tzatsos A, Tschlis PN. Energy depletion inhibits phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling and induces apoptosis via AMP-activated protein kinase-dependent phosphorylation of IRS-1 at Ser-794. *J Biol Chem*. 2007, 282 (25): 18069-18082.
- Upadhy SC, Boyd MR, Ravindranath V. Characterization and localization of cytochrome P450 mediated metabolism of MPTP to nor-MPTP in mouse brain: relevance to Parkinson's disease. *Neurotox Res*. 2001, 3 (4): 369-380.
- Urenjak J, Obrenovitch TP. Neuroprotection--rationale for pharmacological modulation of Na(+)-channels. *Amino Acids*. 1998, 14 (1-3): 151-158.
- Vanhatalo S, Nousiainen I, Eriksson K, Rantala H, Vainionpää L, Mustonen K, Aärimaa T, Alen R, Aine MR, Byring R, Hirvasniemi A, Nuutila A, Walden T, Ritanen-Mohammed UM, Karttunen-Lewandowski P, Pohjola LM, Kaksonen S, Jurvelin P, Granström ML. Visual field constriction in 91 Finnish children treated with vigabatrin. *Epilepsia*. 2002, 43 (7): 748-756.
- Van Loo G, Schotte P, van Gurp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carrillo A, Vandekerckhove J, Declercq W, Beyaert R, Vandenabeele P. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ*. 2001, 8 (12): 1136-1142.
- van Vliet SA, Blezer EL, Jongsma MJ, Vanwersch RA, Olivier B, Philippens IH. Exploring the neuroprotective effects of modafinil in a marmoset Parkinson model with immunohistochemistry, magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Brain Res*. 2008, 1189: 219-228.
- Vannucci SJ, Reinhart R, Maher F, Bondy CA, Lee WH, Vannucci RC, Simpson IA. Alterations in GLUT1 and GLUT3 glucose transporter gene expression following unilateral hypoxia-ischemia in the immature rat brain. *Brain Res Dev Brain Res*. 1998, 107 (2): 255-264.
- Vincent AM, Mobley BC, Hiller A, Feldman EL. IGF-I prevents glutamate-induced motor neuron programmed cell death. *Neurobiol Dis*. 2004, 16 (2): 407-416.
- Virmani A, Gaetani F, Binienda Z. Effects of metabolic modifiers such as carnitines, coenzyme Q10, and PUFAs against different forms of neurotoxic insults: metabolic inhibitors, MPTP, and methamphetamine. *Ann N Y Acad Sci*. 2005, 1053: 183-191.

- von der Crone S, Deppe C, Barthel A, Sasson S, Joost HG, Schürmann A. Glucose deprivation induces Akt-dependent synthesis and incorporation of GLUT1, but not of GLUT4, into the plasma membrane of 3T3-L1 adipocytes. *Eur J Cell Biol.* 2000, 79 (12): 943-949.
- Wales SQ, Laing JM, Chen L, Aurelian L. ICP10PK inhibits calpain-dependent release of apoptosis-inducing factor and programmed cell death in response to the toxin MPP+. *Gene Ther.* 2008, 15 (20): 1397-1409.
- Wang JF, Azzam JE, Young LT. Valproate inhibits oxidative damage to lipid and protein in primary cultured rat cerebrocortical cells. *Neuroscience.* 2003, 116 (2): 485-489.
- Waxman SG. Mechanisms of disease: sodium channels and neuroprotection in multiple sclerosis-current status. *Nat Clin Pract Neurol.* 2008, 4 (3): 159-169.
- Weisler RH, Cutler AJ, Ballenger JC, Post RM, Ketter TA. The use of antiepileptic drugs in bipolar disorders: a review based on evidence from controlled trials. *CNS Spectr.* 2006, 11 (10): 788-799.
- Wen X, Wang JS, Kivistö KT, Neuvonen PJ, Backman JT. In vitro evaluation of valproic acid as an inhibitor of human cytochrome P450 isoforms: preferential inhibition of cytochrome P450 2C9 (CYP2C9). *Br J Clin Pharmacol.* 2001, 52 (5): 547-553.
- Weng Z, Signore AP, Gao Y, Wang S, Zhang F, Hastings T, Yin XM, Chen J. Leptin protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death via mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem.* 2007, 282 (47): 34479-34491.
- Wiard RP, Dickerson MC, Beek O, Norton R, Cooper BR. Neuroprotective properties of the novel antiepileptic lamotrigine in a gerbil model of global cerebral ischemia. *Stroke.* 1995, 26 (3): 466-472.
- Witt SN, Flower TR. Alpha-Synuclein, oxidative stress and apoptosis from the perspective of a yeast model of Parkinson's disease. *FEMS Yeast Res.* 2006, 6 (8): 1107-1116.
- Wood PL, Hawkinson JE. N-methyl-D-aspartate antagonists for stroke and head trauma. *Expert Opin Investig Drugs.* 1997, 6 (4): 389-397.
- Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Tieu K, Teismann P, Vadseth C, Choi DK, Ischiropoulos H, Przedborski S. Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J Neurosci.* 2002, 22 (5): 1763-1771.
- Wu J, Tang T, Bezprozvanny I. Evaluation of clinically relevant glutamate pathway inhibitors in in vitro model of Huntington's disease. *Neurosci Lett.* 2006, 407 (3): 219-223.
- Xie X, Lancaster B, Peakman T, Garthwaite J. Interaction of the antiepileptic drug lamotrigine with recombinant rat brain type IIA Na⁺ channels and with native Na⁺ channels in rat hippocampal neurones. *Pflugers Arch.* 1995, 430 (3): 437-446.
- Xiong Y, Chopp M, Lee CP. Erythropoietin improves brain mitochondrial function in rats after traumatic brain injury. *Neurol Res.* 2008 Dec 18. [Epub ahead of print].
- Xu X, Chua CC, Gao J, Hamdy RC, Chua BH. Humanin is a novel neuroprotective agent against stroke. *Stroke.* 2006, 37 (10): 2613-2619.
- Xue YQ, Zhao LR, Guo WP, Duan WM. Intrastriatal administration of erythropoietin protects dopaminergic neurons and improves neurobehavioral outcome in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 2007, 146 (3): 1245-1258.
- Yamagata K, Ichinose S, Miyashita A, Tagami M. Protective effects of ebselen, a seleno-organic antioxidant on neurodegeneration induced by hypoxia and reperfusion in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Neuroscience.* 2008, 153 (2): 428-435.

- Yang J, Bridges K, Chen KY, Liu AY. Riluzole increases the amount of latent HSF1 for an amplified heat shock response and cytoprotection. *PLoS ONE*. 2008, 3 (8): e2864.
- Yang Y, Li Q, Wang CX, Jeerakathil T, Shuaib A. Dose-dependent neuroprotection with tiagabine in a focal cerebral ischemia model in rat. *Neuroreport*. 2000, 11 (10): 2307-2311.
- Yang Y, Shuaib A, Li Q, Siddiqui MM. Neuroprotection by delayed administration of topiramate in a rat model of middle cerebral artery embolization. *Brain Res*. 1998, 804 (2): 169-176.
- Yang YL, Sun F, Zhang Y, Qian N, Yuan Y, Wang ZX, Qi Y, Xiao JX, Wang XY, Qi ZY, Zhang YH, Jiang YW, Bao XH, Qin J, Wu XR. Clinical and laboratory survey of 65 Chinese patients with Leigh syndrome. *Chin Med J (Engl)*. 2006, 119 (5): 373-377.
- Yang XF, Weisenfeld A, Rothman SM. Prolonged exposure to levetiracetam reveals a presynaptic effect on neurotransmission. *Epilepsia*. 2007, 48 (10): 1861-1869.
- Yao M, Nguyen TV, Pike CJ. Estrogen regulates Bcl-w and Bim expression: role in protection against beta-amyloid peptide-induced neuronal death. *J Neurosci*. 2007; 27 (6): 1422-1433.
- Yasuda Y, Shimoda T, Uno K, Tateishi N, Furuya S, Yagi K, Suzuki K, Fujita S. The effects of MPTP on the activation of microglia/astrocytes and cytokine/chemokine levels in different mice strains. *J Neuroimmunol*. 2008 Sep 23. [Epub ahead of print]
- Yasuhara T, Matsukawa N, Hara K, Yu G, Xu L, Maki M, Kim SU, Borlongan CV. Transplantation of human neural stem cells exerts neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci*. 2006, 26 (48): 12497-12511.
- Yenari M, Kitagawa K, Lyden P, Perez-Pinzon M. Metabolic downregulation: a key to successful neuroprotection? *Stroke*. 2008, 39 (10): 2910-2917.
- Youdim MB, Amit T, Bar-Am O, Weinreb O, Yogev-Falach M. Implications of co-morbidity for etiology and treatment of neurodegenerative diseases with multifunctional neuroprotective-neurorescue drugs; ladostigil. *Neurotox Res*. 2006, 10 (3-4): 181-192.
- Youdim MB. What have we learnt from CDNA microarray gene expression studies about the role of iron in MPTP induced neurodegeneration and Parkinson's disease? *J Neural Transm Suppl*. 2003, (65):73-88.
- Youdim MB, Wadia A, Tatton W, Weinstock M. The anti-Parkinson drug rasagiline and its cholinesterase inhibitor derivatives exert neuroprotection unrelated to MAO inhibition in cell culture and in vivo. *Ann N Y Acad Sci*. 2001, 939: 450-458.
- Yu SW, Wang H, Dawson TM, Dawson VL. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and apoptosis inducing factor in neurotoxicity. *Neurobiol Dis*. 2003, 14 (3): 303-317.
- Zeng X, Chen J, Deng X, Liu Y, Rao MS, Cadet JL, Freed WJ. An in vitro model of human dopaminergic neurons derived from embryonic stem cells: MPP+ toxicity and GDNF neuroprotection. *Neuropsychopharmacology*. 2006, 31 (12): 2708-2715.
- Zhang Z, Andersen AH, Ai Y, Loveland A, Hardy PA, Gerhardt GA, Gash DM. Assessing nigrostriatal dysfunctions by pharmacological MRI in parkinsonian rhesus macaques. *Neuroimage*. 2006, 33 (2): 636-643.
- Zhao Z, Lange DJ, Voustantiounk A, MacGrogan D, Ho L, Suh J, Humala N, Thiyagarajan M, Wang J, Pasinetti GM. A ketogenic diet as a potential novel therapeutic intervention in amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Neurosci*. 2006, 7: 29.
- Zhong C, Zhao X, Sarva J, Kozikowski A, Neale JH, Lyeth BG. NAAG peptidase inhibitor reduces acute neuronal degeneration and astrocyte damage following lateral fluid percussion TBI in rats. *J Neurotrauma*. 2005, 22 (2): 266-276.

- Zhu X, Wang Y, Ogawa O, Lee HG, Raina AK, Siedlak SL, Harris PL, Fujioka H, Shimohama S, Tabaton M, Atwood CS, Petersen RB, Perry G, Smith MA. Neuroprotective properties of Bcl-w in Alzheimer disease. *J Neurochem*. 2004, 89 (5): 1233-1240.
- Zona C, Avoli M. Lamotrigine reduces voltage-gated sodium currents in rat central neurons in culture. *Epilepsia*. 1997, 38 (5): 522-555.
- Zou JY, Crews FT. TNF alpha potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NF kappa B inhibition. *Brain Res*. 2005, 1034 (1-2): 11-24.

Emmanuelle LAGRUE
VULNERABILITE ENERGETIQUE
ET NEUROPROTECTION
DES NOYAUX GRIS CENTRAUX

Résumé

Les noyaux gris centraux (NGC) une cible commune de nombreuses encéphalopathies métaboliques et dégénératives de l'enfant. Parmi l'ensemble des maladies avec altération des NGC, nous nous sommes intéressés aux maladies mitochondriales en raison de données de la littérature qui attestent du rôle central de la mitochondrie dans la neurodégénérescence. Nous avons centré notre étude sur le syndrome de Leigh (SL) qui constitue la maladie mitochondriale la plus fréquente chez l'enfant. Nous avons généré un modèle de SL de l'enfant chez la souris C57BL/6J à 35 jours de vie par utilisation du MPTP qui inhibe le complexe I mitochondrial. Nous avons ensuite recherché un éventuel effet neuroprotecteur des antiépileptiques dans ce modèle. Nous avons ainsi prouvé l'effet neuroprotecteur de la lamotrigine. Cet effet neuroprotecteur est probablement expliqué par la multiplicité des voies d'action de cette molécule : diminution du stress oxydatif, inhibition de la microglie, augmentation du GABA, inhibition des canaux sodium et potassium voltage-dépendants, stimulation de la production de BDNF et inhibition directe de la formation du pore mitochondrial.

Mots clefs : mitochondrie, neurodégénérescence, MPTP, ATP, antiépileptiques, lamotrigine

Résumé en anglais

The basal ganglia are affected in several metabolic and degenerative encephalopathies in childhood. Among all these encephalopathies, we focused on mitochondrial diseases given data from the literature which underline the mitochondrion pivotal role in neurodegeneration. We specifically centred our work on Leigh syndrome (LS), which represents one of the most frequent mitochondrial disorders in childhood. We first generated a childhood LS model in C57BL/6J mice (35 days old) through MPTP intoxication, which inhibits the mitochondrial complex I in the respiratory chain. We then evaluated the potential neuroprotective effect of anti convulsants (AC) in this model. We finally proved that lamotrigine is neuroprotective in our LS model. This neuroprotective effect might rely on lamotrigine multiple and synergistic actions: oxidative stress lowering, microglial inhibition, GABA increase, sodium and potassium voltage –dependent channels inhibition, BDNF up regulation, mitochondrial pore direct inhibition.

Keywords: mitochondrion, neurodegeneration, MPTP, ATP, anticonvulsants, lamotrigine