



UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

UMR Inserm U1253 « Imagerie et cerveau » iBrain, équipe 3



Steven VETEL

soutenue le : 11 décembre 2018

pour obtenir le grade de : Docteur de l'université de Tours

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Neuroinflammation et neuroprotection dans un modèle de maladie de Parkinson précoce (lésion à la 6-hydroxydopamine chez le rat)

THESE dirigée par :	
Mme Sylvie CHALON	Directeur de Recherche Inserm, Tours
RAPPORTEURS :	
Mme GAILLARD Afsaneh Mr ZIMMER Luc	Professeur des Universités, Université de Poitiers Professeur des Universités, Université de Lyon

JURY :

Mr BOTTLAENDER Michel Mme CHALON Sylvie Mme GAILLARD Afsaneh Mr TILLET Yves Mr VOURC'H Patrick Mr ZIMMER Luc Directeur de Recherche CEA, Gif-sur-Yvette Directeur de Recherche Inserm, Tours Professeur des Universités, Université de Poitiers Directeur de Recherche INRA, Nouzilly Professeur des Universités, Université de Tours Professeur des Universités, Université de Lyon A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce manuscrit

Remerciements

Il sera difficile pour moi de remercier tout le monde car c'est grâce à la contribution de nombreuses personnes que j'ai pu mener à bien ce travail de thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement ma directrice de thèse, Mme Sylvie Chalon. Je suis ravi d'avoir travaillé en votre compagnie car outre votre appui scientifique, vous avez toujours été là pour me soutenir et me conseiller pendant ces trois années de thèse.

Je tiens à remercier ma co-encadrante de thèse, Sophie Sérrière, pour sa gentillesse, sa disponibilité et ses conseils avisés. Merci pour ton accompagnement et ton soutien durant ces trois années.

Je tiens à remercier la directrice de l'UMR Inserm U1253 « Imagerie et cerveau », Mme Catherine Belzung, et le responsable de l'équipe 3 « Imagerie, Biomarqueurs et Thérapie », Mr Patrick Emond, pour m'avoir accueilli au sein de l'unité.

Je tiens également à remercier Mme Afsaneh Gaillard et Mr Luc Zimmer qui m'ont fait l'honneur d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse. Je remercie également l'ensemble des personnes qui ont accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Il m'est impossible d'oublier plusieurs personnes de l'équipe sans qui ce travail n'aurait jamais été mené à son terme. Claire, merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et tes précieux conseils (à quand notre prochain verre aux berthom?). Bobo, merci pour ton aide si précieuse en expérimentation animale, ton humour et ta bonne humeur (comment on appelle déjà les habitants du Népal ? Des népalais !!!!). Zuhal, merci pour ta gentillesse et tes conseils (grâce à toi, l'autoradiographie n'a plus de secret pour moi). Julie, merci pour ton aide et ta bonne humeur (c'est promis, je ne modifierai plus ton fond d'écran d'ordinateur). Laurent, merci pour ton écoute, tes petits schémas sur le cerveau m'ont permis d'y voir plus clair. Lydie, merci de ton aide si précieuse et pour m'avoir montré le chemin dans la jungle de la métabolomique.

Je tiens à remercier mes collègues thésards, Camille et Rudy, pour m'avoir accompagné dans le calme et le stress (quoi que...) pendant ces trois années de thèse. Grâce à vous, je pense être sur la bonne voie pour utiliser correctement un macbook. Je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Je remercie également Géraldine, Christelle et Valérie pour leur gentillesse.

Je tiens à remercier Mme Géraldine Dubreuil-Fabre et Mme Véronique Bozon pour m'avoir encadré tout au long de mon monitorat et pour m'avoir donné l'envie de poursuivre dans l'enseignement.

Je tiens à remercier ma famille et belle-famille pour le soutien et l'amour qu'elles m'ont apportés pendant ces trois années.

Pour terminer, je tiens tout particulièrement à remercier ma femme, Justyne, pour m'avoir soutenu et aidé dans tout ce que j'ai entrepris pendant cette thèse. Sans toi, je n'aurai pas trouvé la force et l'envie d'accomplir ce travail.

Résumé

Les stratégies thérapeutiques mises en place dans la maladie de Parkinson sont symptomatiques et ne permettent pas de ralentir la progression de la maladie, nécessitant le développement de nouvelles approches neuroprotectrices. La neuroinflammation joue un rôle majeur dans le processus neurodégénératif où elle se manifeste précocement par l'activation de cellules gliales (microglie et astrocytes). En s'appuyant sur l'utilisation de modèles animaux mimant les stades précoces de la maladie, l'élaboration de stratégies à visée antiinflammatoire constitue donc une approche thérapeutique prometteuse. Ce travail de thèse a consisté à mettre au point et à caractériser un modèle de lésion partielle à la 6hydroxydopamine chez le rat afin d'évaluer les effets d'une stratégie thérapeutique originale basée sur l'utilisation en combinaison d'un agoniste des récepteurs nicotiniques a7 et d'un agoniste des récepteurs σ 1. En utilisant différentes approches expérimentales, nous avons tout d'abord évalué le processus neurodégénératif et la neuroinflammation dans le modèle que nous avons mis en place. Nos résultats ont montré une dégénérescence partielle et reproductible des neurones dopaminergiques nigro-striataux associée à une importante neuroinflammation. Nos analyses métabolomiques ont également révélé plusieurs altérations spécifiques, apportant ainsi de nouvelles informations sur les mécanismes intervenant dans le processus neurodégénératif. En s'appuyant sur l'utilisation de la tomographie par émission de positrons, nous avons ensuite évalué longitudinalement le profil d'expression des récepteurs nicotiniques a7 dans les structures clés de la voie nigro-striée. Nos résultats ont montré des modifications transitoires de la densité de ces récepteurs pouvant être liées à des réponses microgliales biphasiques en association avec la cinétique de la dégénérescence neuronale. Ainsi, ces résultats renforcent l'idée de cibler spécifiquement les récepteurs nicotiniques α 7 dans l'atténuation des processus neuroinflammatoires. Nous avons enfin évalué les effets de notre stratégie thérapeutique dans le modèle et nos résultats ont permis de montrer que ce type de combinaison préserve partiellement l'intégrité des neurones dopaminergiques nigrostriataux et réduit les réactions gliales chez les animaux lésés. Bien qu'il soit nécessaire de confirmer et de compléter ces résultats avec d'autres analyses, ce type de combinaison pourrait constituer une nouvelle approche pharmacologique prometteuse dans le traitement de la maladie de Parkinson.

Mots clés : Maladie de Parkinson, 6-hydroxydopamine, neuroinflammation, récepteurs nicotiniques α 7, récepteurs σ 1.

Résumé en anglais

Currently, therapeutic strategies in Parkinson's disease are symptomatic and the progression of the disease is uncontrolled, requiring the development of new neuroprotective approaches. Neuroinflammation plays a major role in the neurodegenerative process where it occurs early through the activation of glial cells (microglia and astrocytes). Based on the use of animal models mimicking the early stages of the disease, the development of anti-inflammatory strategies is therefore a promising therapeutic approach. This thesis work consisted in the development and the characterisation of a partial 6-hydroxydopamine lesion model in rats in order to evaluate the effects of an original therapeutic strategy based on the combined use of a α 7 nicotinic receptors agonist and a σ 1 receptors agonist. Using different experimental approaches, we first evaluated the neurodegenerative and neuroinflammation processes in the model that we developed. Our results showed a partial and reproducible degeneration of nigro-striatal dopaminergic neurons associated with a marked neuroinflammation. Our metabolic analyses have also revealed several specific alterations, providing new informations on the mechanisms involved in the neurodegenerative process. Using positron emission tomography imaging, we then evaluated longitudinally the expression profile of α 7 nicotinic receptors in the key structures of the nigro-striatal pathway. Our results showed transient changes in the density of these receptors that may be linked to biphasic microglial responses in association with the kinetics of neuronal degeneration. Thus, these results reinforce the hypothesis of specifically targeting α 7 nicotinic receptors in order to reduce the neuroinflammatory processes. Finally, we evaluated the effects of our therapeutic strategy in the model and our results showed that this type of combination partially preserves the integrity of nigro-striatal dopaminergic neurons and reduces glial reactions in lesioned animals. Although it is necessary to confirm and extend these results, this type of combination could represent a promising new pharmacological approach in the treatment of Parkinson's disease.

Key words : Parkinson's disease, 6-hydroxydopamine, neuroinflammation, α 7 nicotinic receptors, σ 1 receptors.

Table des matières

Remerci	ements	2
Résumé		4
Table de	s matières	6
Liste des	s abréviations	10
Liste des	s tableaux	13
Liste des	s figures	14
Liste des	s annexes	18
Introduc	tion	19
Premièr	e partie Rappels bibliographiques	21
I- La ma	ladie de Parkinson : généralités	22
1- H	listorique	22
2- D	onnées épidémiologiques	22
3- E	tiologie	23
A.	Facteurs environnementaux	23
B.	Facteurs génétiques	24
4- S	ymptômes, diagnostic et évolution	25
A.	Symptômes	25
B.	Diagnostic	27
C.	Evolution	27
II- Physi	opathologie de la maladie de Parkinson	29
1- C	onsidérations biologiques et anatomiques	29
A.	Métabolisme de la dopamine	29
B.	Les voies dopaminergiques dans le système nerveux central	33
2- L	es ganglions de la base	34
A.	Organisation des circuits des ganglions de la base	34
B.	Circuits des ganglions de la base en condition physiologique	35
C.	Circuits des ganglions de la base dans la maladie de Parkinson	37
3- C	aractéristiques de la dégénérescence dopaminergique	38
A.	Données macroscopiques et microscopiques	38
B.	Processus intervenant dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques	39

III- Stra	III- Stratégies thérapeutiques pour la maladie de Parkinson		
1- I	es thérapies médicales	.43	
A.	La dopathérapie	.43	
B.	Les approches non-pharmacologiques alternatives	.45	
2- I	es thérapies chirurgicales	.45	
A.	La stimulation cérébrale profonde	. 46	
B.	La chirurgie lésionelle	. 46	
3- I	es thérapies expérimentales	. 46	
A.	La thérapie cellulaire	.47	
B.	La thérapie génique	. 49	
C.	Les nouvelles strategies thérapeutiques	. 51	
IV- Mo	dèles animaux dans l'étude de la maladie de Parkinson	. 52	
1- N	Aodèles génétiques	. 52	
2- I	es modèles toxiques	. 53	
A.	Intoxication au MPTP	. 53	
B.	Intoxication à la roténone	. 54	
C.	Intoxication au paraquat	. 54	
D.	Les modèles basés sur l'administration de dérivés de l'amphétamine	. 55	
3- N	Aodèle d'intoxication à la 6-OHDA	. 56	
A.	Généralités	. 56	
B.	Effets neurotoxiques de la 6-OHDA	. 57	
C.	Les différents modèles d'intoxication à la 6-OHDA	. 58	
V- Neu	oinflammation et maladie de Parkinson	. 63	
1- (Généralités	. 63	
A.	Le système immunitaire et l'inflammation	. 63	
B.	La neuroinflammation	. 64	
2- 1	Neuroinflammation et maladie de Parkinson	. 67	
A.	Neuroinflammation et dégénérescence des neurones dopaminergiques	. 67	
B.	Données chez l'Homme et chez l'animal	. 69	
3- I	a voie cholinergique anti-inflammatoire : une stratégie thérapeutique prometteuse.	. 71	
A.	Mise en évidence de la voie cholinergique anti-inflammatoire	. 71	
B.	Les récepteurs nicotiniques alpha 7	. 72	

C. La stimulation des récepteurs nicotiniques alpha 7 dans le traitement de la maladie
de Parkinson
D. Interaction des récepteurs nicotiniques alpha 7 avec d'autres types de récepteur
(exemple des récepteurs sigma-1)7
VI- Objectifs de la thèse
Deuxième partie Matériel et méthodes
I- Animaux et procédures expérimentales
1- Animaux
2- Procédures expérimentales
II- Lésion à la 6-OHDA
III- Traitement avec les agonistes et test des rotations induites par l'administration
d'amphétamine
1- Traitement avec les agonistes
2- Test des rotations induites par l'administration d'amphétamine
IV- Imagerie TEP
1- Principe général
2- Imagerie du DAT avec le [¹⁸ F]LBT-999 et des nAChR-α7 avec le [¹⁸ F]ASEM88
A. Préparation des radiotraceurs88
B. Biodistribution <i>ex vivo</i> cérébrale du [¹⁸ F]ASEM
C. Acquisitions et traitements des images TEP90
V- Métabolomique
1- Principe général
2- Préparation des échantillons
3- Analyse par CL-SMHR
4- Traitement ciblé des données
VI- Analyses sur coupes
1- Prélèvement des cerveaux
2- Autoradiographie sur coupes
A. Principe général
B. Autoradiographie sur coupes du DAT avec le [125I]PE2I et de la TSPO avec le
[³ H]DPA-714 et le [³ H]PK-1119590
3- Immunofluorescence sur coupes
A. Principe général

В	. Immunofluorescence de la TH, du CD11b et de la GFAP	98
С	Double immunomarquage CD11b/P2X7R	
VII-	Traitement statistique des données	
Troisi	ème partie Résultats	
I- Ré	ésultats de l'étude 1	104
1-	Test des rotations induites par l'administration d'amphétamine	
2-	Imagerie TEP du DAT avec le [¹⁸ F]LBT-999	104
3-	Analyses métabolomiques	
4-	Analyses sur coupes par autoradiographie et par immunofluorescence	
II- R	ésultats de l'étude 2	111
1-	Biodistribution cérébrale ex vivo du [¹⁸ F]ASEM	111
2-	Test des rotations induites par l'administration d'amphétamine	112
3-	Imagerie TEP des nAChR-α7 avec le [¹⁸ F]ASEM	112
4-	Analyses sur coupes par autoradiographie	
5-	Analyses sur coupes par immunofluorescence	113
III- F	Résultats de l'étude 3	117
1-	Test des rotations induites par l'administration d'amphétamine	117
2-	Analyses sur coupes par autoradiographie	
3-	Analyses sur coupes par immunofluorescence	
Quatr	ième partie Discussion	
I- Di	scussion de l'étude 1	
II- D	viscussion de l'étude 2	
III- I	Discussion de l'étude 3	134
Conclu	ision	
Biblio	graphie	140
Résum	ıé	
Résum	né en anglais	

Liste des abréviations

6-OHDA: 6-hydroxydopamine nAChRs : récepteurs nicotiniques nAChR-α7 : récepteurs nicotiniques alpha 7 σ1R : récepteurs sigma-1 AADC : aromatic amino acid decarboxylase AAV : adeno-associated virus ADN : acide désoxyribonucléique AMPc : adénosine monophosphate cyclique ARN : acide ribonucléique ATP : adénosine triphosphate ATV : aire tegmentaire ventrale BHE : barrière hémato-encéphalique CE : cervelet CLHP : chromatographie en phase liquide à haute performance COMT : catéchol-O-méthyltransférase CQ : contrôle qualité CSPis : cellules souches pluripotentes induites CV : coefficient de variation DAT : transporteur de la dopamine DOPAC : acide 3,4-dihydroxyphénylacétique ERO : espèces réactives de l'oxygène FMT : faisceau médian du télencéphale FNS : fixation non-spécifique FS : fixation spécifique FT : fixation totale GDNF : glial cell-derived neurotrophic factor GFAP : glial fibrillary acidic protein GPi : globus pallidum interne GPe : golbus pallidum externe HVA : acide homovanillique

IFN-γ : interféron-gamma

- IL-4 : interleukine-4
- IL-10 : interleukine-10
- jpl : jours post-lésion
- Ki : constante d'inhibition
- L-DOPA : L-dihydroxyphénylalanine
- LPS : lipopolysaccharide bactérien
- MA : maladie d'Alzheimer
- MAO : monamine oxydase
- MDMA : 3,4-méthylènedioxy-N-méthylamphétamine
- MLA : métyhyllycaconitine
- MP : maladie de Parkinson
- MPP⁺ : 1-méthyl-4-phénylpyridinium
- MPTP: 1-méthyl-4-phényl-1,2,4,6-tétrahydropyridine
- NEM : neurones épineux de taille moyenne
- NST : noyau sous-thalamique
- OPLS-DA : orthogonal partial least scare-discriminant analysis
- PLS-DA : partial least scare-discriminant analysis
- SCP : stimulation cérébrale profonde
- SN : substance noire
- SNpc : substance noire *pars compacta*
- SNpr : substance noire pars reticulata
- SNC : système nerveux central
- SNC : susbtance noire controlatérale
- SNI : substance noire ipsilatérale
- STC : striatum controlatéral
- STI : striatum ipsilatéral
- SUV : standard uptake value
- SUVr : standard uptake value ratio
- TDM : tomodensitométrie
- TEP : tomographie par emission de positrons
- TH : tyrosine hydroxylase
- TNF- α : tumor necrosis factor-alpha

TSPO : protéine translocatrice 18 kDa

VIP : variable in importance projection

VCAI : voie cholinergique anti-inflammatoire

VMAT2 : vesicular monoamine transporter 2

Liste des tableaux

Tableau I. Liste des gènes impliqués dans la MP (adapté de Deng et al., 2018) 2 2 2	25
Tableau II. Echelle de Hoehn et Yahr (modifiée de l'originale)2	28
Tableau III. Conditions expérimentales relatives à l'utilisation des différents radioligane utilisés dans le cadre des études d'autoradiographie	ls 17
Tableau IV. Caractéristiques des anticorps primaires et secondaires utilisés dans le cadre de analyses en immunofluorescence 10	es)0
Tableau V. Métabolites identifiés par les analyses multivariées et univariées dans le striatur et la SN présentant les critères suivants : un score VIP dans l'analyse multivariée > 0,50 un FC ratio (STI/STC et SNI/SNC) < 0,75 ou > 1,25 et une <i>p</i> -value < 0,05 10	m 0, 07

Tableau VI. Analyses des voies métaboliques significativement altérées dans le striatum... 107

Tableau VII. Analyses des voies métaboliques significativement altérées dans le SN 108

Liste des figures

Figure 10. Représentation schématique des mécanismes d'action des différentes neurotoxines autres que la 6-OHDA utilisées pour modéliser la MP chez l'animal (adapté de Zeng et al., 2018)
Figure 11. Représentation schématique des effets neurotoxiques de la 6-OHDA (adapté de Blum et al., 2001)
Figure 12. Représentation schématique des différentes localisations d'injection de la 6-OHDA chez le rat
Figure 13. Représentation schématique de la polarisation des cellules microgliales
Figure 14. Représentation schématique des différents mécanismes inflammatoires impliqués dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la MP (adapté de Wang et al., 2015)
Figure 15. Représentation schématique la voie cholinergique anti-inflammatoire (adapté de Pavlov et al., 2003)
Figure 16. Les nAChR-α7. (A) Représentation schématique de la structure des nAChR-α7 (d'après Quik et al., 2015). (B) Représentation schématique des voies de signalisation associées à l'activation des nAChR-α7 (adapté de Egea et al., 2015)
Figure 17. Protocole de l'étude 1
Figure 18. Protocole de l'étude 2
Figure 19. Protocole de l'étude 3
Figure 20. Coordonnées stéréotaxiques d'injection de la 6-OHDA dans le striatum droit (délimité par le trait rouge) chez le rat selon l'Atlas du cerveau de rat de Paxinos et Watson (2009)

Figure 21. Princ	pe de l'immunofluorescence	98	3
------------------	----------------------------	----	---

- Figure 26. Analyses sur coupes par immunofluorescence : quantification de la TH et du CD11b respectivement dans le striatum et la SN de rats lésés à la 6-OHDA (n = 14)...110
- Figure 27. Biodistribution cérébrale *ex vivo* du [¹⁸F]ASEM chez des rats contrôles (n = 6) et après administration par intraveineuse de MLA, un antagoniste des nAChR- α 7 (n = 7)
- Figure 29. Analyse sur coupes par autoradiographie : quantification du DAT avec le [¹²⁵I]PE2I dans le striatum de rats lésés à la 6-OHDA (n = 8)......113

- Figure 34. Analyse sur coupes par autoradiographie : quantification du DAT et de la TSPO respectivement avec le [¹²⁵I]PE2I et le [³H]PK-11195 dans le striatum de rats lésés à la 6-OHDA (groupe contrôle, n = 7) et après traitement au PHA543613/PRE-084 (groupe PHA/PRE, n = 7).

Liste des annexes

Annexe 1 Article accepté en lien avec la thèse
--

Introduction

La maladie de Parkinson (MP) est une pathologie neurodégénérative affectant des millions de personnes à travers le monde, constituant ainsi un problème majeur de santé de publique. Elle est majoritairement caractérisée par la perte progressive des neurones dopaminergiques constituant la voie nigro-striée à l'origine du contrôle de la motricité, aboutissant ainsi à la manifestation d'une pléiade de symptômes moteurs et non-moteurs. Bien qu'elle ne soit pas complètement connue, l'étiologie de la maladie fait intervenir plusieurs facteurs incluant l'âge, l'exposition à des substances toxiques exogènes et la présence de facteurs génétiques prédisposants.

Les stratégies thérapeutiques actuellement mises en place sont symptomatiques et ne permettent pas de ralentir la progression de la maladie. Il y a donc un besoin urgent de développer de nouvelles approches neuroprotectrices visant à ralentir voire stopper la perte neuronale caractéristique de la maladie. Dans ce contexte, le développement et la caractérisation des modèles animaux représentent des outils fondamentaux pour l'amélioration de la compréhension des mécanismes intervenant dans le processus neurodégénératif et pour l'évaluation des stratégies thérapeutiques.

La perte progressive des neurones dopaminergiques nigro-striataux est multifactorielle, faisant intervenir plusieurs types de mécanismes. Parmi eux, la neuroinflammation y joue un rôle majeur car elle se manifeste par l'activation de cellules gliales (microglie et astrocytes), aboutissant à la production d'une multitude de facteurs inflammatoires et cytotoxiques, aggravant ainsi la perte neuronale. En s'appuyant sur l'utilisation de modèles animaux mimant les stades précoces de la maladie, l'élaboration de stratégies à visée anti-inflammatoire constitue donc une alternative thérapeutique de choix dans le traitement de la MP.

Ce manuscrit de thèse est organisé en plusieurs parties. La première est consacrée à des **rappels bibliographiques** sur la MP où plusieurs thèmes y sont abordés (physiopathologie, stratégies thérapeutiques, modèles animaux, neuroinflammation). Cette première partie se termine par les objectifs de la thèse. La deuxième partie du manuscrit est consacrée aux **matériels et méthodes** utilisés au cours de la thèse où toutes les procédures expérimentales (animaux, analyses *in vivo*, analyses sur coupes, traitement statistique des données) y sont détaillées. La troisième partie du manuscrit porte sur les **résultats** obtenus au cours de la thèse. La quatrième partie est consacrée à une **discussion** critique sur les différents résultats. Elle est suivie par une **conclusion** et par des **perspectives**.

Première partie Rappels bibliographiques

I- La maladie de Parkinson : généralités

1- Historique

La MP est une pathologie neurodégénérative chronique à évolution lente majoritairement caractérisée par la perte des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée à l'origine du contrôle de la motricité. Elle a été pour la première fois décrite en 1817 par le médecin britannique Sir James Parkinson (1755-1824) dans son ouvrage intitulé «Essay on the shaking palsy » (Parkinson, 2002). Il qualifia alors la maladie de « paralysie agitante » dans laquelle il décrivit deux symptômes majeurs à savoir le tremblement au repos de certaines parties du corps et l'akinésie (lenteur dans l'initiation des mouvements). En 1872, le neurologue français Jean-Martin Charcot (1825-1873) décrivit un autre symptôme clé de la maladie, le phénomène de rigidité, et attribua le nom de MP. Quelques années plus tard, en 1912, le médecin allemand Friedrich Lewy (1885-1950) décrivit des inclusions intracytoplasmiques appelées corps de Lewy au sein de la substance noire (SN) de patients atteints de la maladie. En 1919, le neuropathologiste russe Konstantin Tretiakoff (1892-1958) confirma que l'origine du processus lésionnel expliquant la MP est localisée dans la SN. Au cours des années 1950, les travaux d'Arvid Carlsson (1923-) ont conduit à l'observation que la MP résulte d'un déficit en dopamine et que l'utilisation de la L-dihydrophénylalanine (L-DOPA), précurseur de la dopamine, représente un traitement efficace contre cette maladie. L'ensemble de ces découvertes a permis la mise en place de plusieurs types de stratégies thérapeutiques à la fois médicamenteuses (dopathérapie) et non médicamenteuses (stimulation cérébrale profonde, chirurgie lésionnelle). Actuellement, les recherches sont majoritairement focalisées sur des stratégies de neuroprotection visant à ralentir le processus neurodégénératif et d'autres types de stratégies thérapeutiques sont encore au stade expérimental (thérapie génique).

2- Données épidémiologiques

La MP est la deuxième pathologie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer (MA). Elle touche plus de 6 millions de personnes à travers le monde, constituant donc un réel problème majeur de santé publique. Bien que la MP affecte toutes les populations ethniques, il existe des différences en termes de prévalence et d'incidence. En Europe, la prévalence et l'incidence de la maladie sont respectivement estimées entre 100 et 200 et entre 10 et 20 pour 100 000 habitants (Alves et al., 2008). Dans la très grande majorité des cas, la maladie est diagnostiquée chez des sujets âgés, affectant environ 1% de la population des plus de 60 ans et près de 4% de la population des plus 85 ans (de Lau et Breteler, 2006). De manière exceptionnelle, la maladie peut survenir précocement avant l'âge de 40 ans, on parle alors de « MP juvénile ». Le risque de survenue de la maladie après la naissance diffère selon le sexe. En effet, il est estimé à 2% pour les hommes et à 1,3% pour les femmes (Elbaz et al., 2002). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer cette différence comme un possible effet neuroprotecteur des oestrogènes mais leur rôle reste encore controversé.

3- Etiologie

Bien que plusieurs facteurs de risque aient été identifiés à ce jour, les causes exactes de la MP ne sont pas encore totalement connues. L'âge représente le facteur de risque le plus important. En effet, les neurones dopaminergiques sont de plus en plus prédisposés à la dégénérescence car les processus physiologiques et biochimiques comme le métabolisme de la dopamine déclinent avec l'âge (Schapira et Jenner, 2011 ; Reeve et al., 2014). De plus, les neurones dopaminergiques sont de plus en plus exposés aux substances toxiques environnementales car la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) augmente avec l'âge (Popescu et al., 2009). Classiquement, il existe deux grands types de facteurs de risque : les facteurs environnementaux et les facteurs génétiques.

A. Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux sont représentés par des substances toxiques exogènes. L'implication de facteurs environnementaux dans la survenue de la MP a été mise en évidence avec la description de cas de syndrome parkinsonien chez des toxicomanes suite à une injection intraveineuse accidentelle d'un dérivé de l'héroïne, le 1-méthyl-4-phényl-1,2,4,6-tétrahydropyridine (MPTP) (Kasten et al., 2007). Par ailleurs, il est reconnu que la vie en milieu rural, la consommation d'eau de puits et l'agriculture représentent d'autres facteurs de risque (Goldman, 2014), mettant en avant un rôle des pesticides (insecticides, fongicides, herbicides). En effet, plusieurs études épidémiologiques rapportent un lien entre une exposition aux pesticides et une augmentation du risque de développer la MP (Nandipati et Litvan, 2016). En France, la maladie est notamment déclarée comme maladie professionnelle pour les personnes travaillant dans le monde agricole. Il est également reconnu que des expositions à des métaux lourds (mercure, manganèse) et à des solvants organiques (trichloroéthylène, méthanol) sont associées à une augmentation du risque de développer la maladie (Caudle et al., 2013). Certaines de ces substances toxiques comme le MPTP, la roténone et le paraquat sont utilisées chez l'animal (souris, rat, primate non-humain) pour modéliser la MP. De plus, il existe une relation inverse entre la consommation de tabac, de café et de thé et le risque de survenue de la maladie (Delamarre et Meissner, 2017). Les causes de ces relations inverses ne sont pas totalement comprises mais seraient expliquées notamment par des effets potentiellement neuroprotecteurs de la nicotine et de la caféine.

B. Facteurs génétiques

Dans la très grande majorité des cas, le diagnostic de la MP est établi sans liens génétiques apparents, on parle alors de maladie idiopathique ou sporadique. Cependant, dans environ 10% des cas, il existe un lien entre facteurs génétiques et MP (Klein et Westenberger, 2012). L'implication de facteurs génétiques est évoquée depuis de nombreuses années avec l'étude de cas familiaux et de jumeaux atteints de la maladie (Nussbaum et Polymeropoulos, 1997 ; Tanner et al., 1999). A ce jour, plusieurs types de mutations associées à des formes familiales ou héréditaires de la MP ont été identifiés (Tableau I).

Gène	Locus	Chromosome	Mode de transmission
SNCA	PARK1	4q22.1	AD
PRKN	PARK2	6q26	AR
PARK3	PARK3	2p13	AD
SNCA	PARK4	4q22.1	AD
UCHL1	PARK5	4p13	AD
PINK1	PARK6	1p36	AR
PARK7	PARK7	1p36.23	AR
LRRK2	PARK8	12q12	AD
ATP13A2	PARK9	1p36.13	AR
PARK10	PARK10	1p32	NC
GIGYF2	PARK11	2q37.1	AD
PARK12	PARK12	Xq21-q25	Hérédité liée à l'X
HTRA2	PARK13	2p13.1	AD
PLA2G6	PARK14	22q13.1	AR
FBX07	PARK15	22q12.3	AR
PARK16	PARK16	1q32	NC
VPS35	PARK17	16q11.2	AD
EIF4G1	PARK18	3q27.1	AD
DNAJC6	PARK19	1p31.3	AR
SYNJI	PARK20	21q22.1	AR
TMEM230	PARK21	20p13	AD
CHCHD2	PARK22	7p11.2	AD
VPS13C	PARK23	15q22.2	AR
RIC3	NC	11p15.4	AD

AD : autosomique dominant, AR : autosomique récessif, NC : non connu

Tableau I. Liste des gènes impliqués dans la MP (adapté de Deng et al., 2018). Abréviation : MP (maladie de Parkinson).

Bien que l'étiologie de la MP reste encore mal connue, il existe des interactions importantes entre les facteurs environnementaux et les facteurs génétiques. A titre d'exemple, les facteurs environnementaux sont capables d'interférer avec les mécanismes épigénétiques (méthylation de l'acide désoxyribonucléique (ADN), modification post-traductionnelle des histones, acides ribonucléiques (ARN) non-codants intervenant dans la régulation de l'expression protéique), perturbant ainsi fortement l'expression génique (pour revue : Feng et al., 2015).

- 4- Symptômes, diagnostic et évolution
- A. Symptômes

La MP est majoritairement caractérisée par la perte des neurones dopaminergiques de la voie

nigro-striée à l'origine du contrôle de la motricité. Les symptômes moteurs apparaissent quand approximativement 50 à 60% des neurones dopaminergiques de la voie ont dégénéré (Schapira et al., 2017). Parmi l'ensemble des symptômes moteurs, les principaux sont regroupés sous l'acronyme anglais *TRAP* : *Tremor at rest* (tremblements au repos), *Rigidity* (rigidité musculaire), *Akinesia* (Akinésie) et *Postural instability* (troubles de la posture) (Jankovic, 2008) :

- Les tremblements au repos sont présents dans 60 à 70% des cas. Ils sont généralement unilatéraux, débutent classiquement au niveau de l'extrémité distale du membre supérieur et suivent des oscillations rythmiques, régulières et de faible amplitude (Moreau et Defebvre, 2015). Les tremblements disparaissent temporairement lors de l'exécution du mouvement volontaire. Ils concernent également d'autres régions du corps comme les lèvres, la mâchoire ou encore la langue.
- La rigidité musculaire se caractérise par une hypertonie, c'est-à-dire une augmentation anormale du tonus musculaire. Elle provoque d'importantes raideurs musculaires affectant de nombreuses zones articulaires comme le cou, les épaules, les hanches, les poignets et les chevilles (Jankovic, 2008). Cette rigidité entraine des difficultés dans l'exécution des mouvements et elle est responsable de la posture fléchie et courbée des patients atteints de la maladie.
- L'akinésie se caractérise par une lenteur lors de l'initiation ou de l'exécution du mouvement. Elle concerne principalement les mouvements semi-automatiques et les mouvements fins demandant de la dextérité comme l'écriture (micrographie). L'akinésie se manifeste également lors de la marche où elle provoque une lenteur, un raccourcissement et une asymétrie du pas ainsi qu'une diminution du balancement des bras accompagnant la marche (Bonnet et Hergueta, 2016).
- Il est reconnu que les troubles de la posture font partie des symptômes moteurs principaux de la maladie en plus de la triade de symptômes classiques regroupant les tremblements, la rigidité et l'akinésie. Ils se manifestent tardivement au cours de la maladie, après plusieurs années d'évolution et se caractérisent par une inclinaison du tronc vers l'avant ou sur le côté gênant considérablement la marche (Ziégler, 2006).

La MP est également caractérisée par la présence de symptômes non-moteurs. Ils peuvent s'installer à tous les stades de la maladie et traduisent des atteintes de zones cérébrales qui n'ont pas de lien directe avec le contrôle de la motricité comme le locus cœruleus, les noyaux du raphé et le tubercule olfactif (Poewe et al., 2008). Parmi les principaux symptômes nonmoteurs, on retrouve des altérations sensorielles (olfaction, vision), des troubles de l'humeur (dépression, anxiété, apathie), des troubles du sommeil, des altérations des fonctions végétatives (hypotension, dysphagie) et de la fatigue (Pfeiffer, 2016). Les symptômes nonmoteurs peuvent se manifester très précocement au cours de la maladie. En effet, il est établi que la maladie peut avoir une phase dite « pré-motrice » ou prodomale avant que les symptômes moteurs se manifestent. Elle peut durer plusieurs années et se caractérise par une perte d'odorat, des troubles du comportement en sommeil paradoxal, de l'anxiété ou encore des troubles de l'humeur (Azulay et al., 2017).

B. Diagnostic

Le diagnostic de la maladie repose essentiellement sur l'observation clinique du patient, à la recherche des principaux signes cliniques comme les tremblements au repos, la rigidité musculaire et l'akinésie. Cependant, le diagnostic est souvent difficile à établir car les signes cliniques ne s'expriment pas avec la même intensité et ne sont pas forcément présents au même moment. Les examens paracliniques comme le recours à l'imagerie cérébrale (scanner ou imagerie par résonance magnétique) ne sont pas suffisamment discriminants. Cependant, afin d'éviter des erreurs de diagnostic ou de confirmer le diagnostic, il est maintenant possible d'avoir recours à l'imagerie médicale scintigraphique en utilisant le DAT-scan[®] par Tomographie par Emission Monophotonique ou TEMP. Le DAT-scan[®] ([¹²³I]-Ioflupane) permet de cibler spécifiquement le transporteur de la dopamine (DAT) pré-synaptique dont la densité diminue de manière asymétrique principalement au niveau du putamen au cours des stades précoces de la maladie. Par conséquent, cet examen permet de confirmer la dégénérescence des neurones dopaminergiques et de différencier le tremblement essentiel du tremblement lié aux syndromes parkinsoniens dégénératifs incluant la MP (Chen et al., 2017b).

C. Evolution

La MP est une maladie chronique à évolution lente mais dont l'évolution dépend du patient. Généralement, on décrit trois grandes phases évolutives (Nieoullon, 2017) :

- La première phase : le diagnostic est établi suite à l'entretien avec le neurologue et un traitement est mis en place (le plus souvent un traitement à la L-DOPA, voir chapitre III). Cette première phase est généralement bien acceptée par le patient, à la fois rassuré par la prise en charge et l'efficacité du traitement. Cette phase est souvent qualifiée de « lune de miel » et peut durer jusqu'à une dizaine d'année.
- La deuxième phase : elle débute avec l'apparition de complications, le plus souvent motrices, liées au traitement comme des dyskinésies conduisant à des dystonies (voir chapitre III).
- La troisième phase : elle correspond à l'apparition de symptômes non liés au traitement, et elle est qualifiée de phase « avancée ». Durant cette phase, les symptômes deviennent très invalidants, constituant un handicap majeur dans la vie quotidienne et sociale du patient. La parole elle-même devient rare, les troubles de déglutition s'accentuent, les troubles digestifs sont très présents, la baisse de la pression artérielle et les troubles cognitifs s'accentuent.

De manière plus précise, la progression de la MP au cours du temps peut être évaluée grâce à l'échelle de Hoehn et Yahr (Hoehn et Yahr, 1967). C'est une échelle peu sensible mais fiable et rapide d'utilisation. Elle a été modifiée depuis sa création et comprend actuellement huit stades évolutifs allant du stade 0 au stade 5 (Tableau II).

Stade	Stade Manifestations cliniques	
Stade 0	Aucun signe de la maladie	
Stade 1	Signes unilatéraux n'entrainant pas d'handicap dans la vie quotidienne	
Stade 1,5	Atteintes unilatérale et axiale	
Stade 2	Stade 2 Signes à prédominance unilatérale entraînant un certain handicap	
Stade 2,5 Atteinte bilatérale légère à modérée avec altération de l'équilibre		
Stade 3 Atteinte bilatérale importante avec perte d'équilibre, pas de perte d'autono		
Stade 4 Handicap sévère mais possibilité de marche, perte partielle d'autonomi		
Stade 5 Malade en chaise roulante ou alité, perte d'autonomie		

Tableau II. Echelle de Hoehn et Yahr (modifiée de l'originale).

II- Physiopathologie de la maladie de Parkinson

1- Considérations biologiques et anatomiques

A. Métabolisme de la dopamine

La dopamine appartient à la famille des catécholamines. Elle a été pour la première fois synthétisée par Barger et Ewens en 1910. La dopamine a été initialement décrite comme un produit de dégradation de la tyrosine et comme le précurseur de synthèse de l'adrénaline et de la noradrénaline. Dans les années 1950, les travaux d'Arvid Carlsson (Prix Nobel de physiologie ou médecine en 2000) ont permis de mettre en évidence la fonction de neurotransmetteur de la dopamine. La synthèse des catécholamines et donc de la dopamine s'effectue à partir de la L-tyrosine. La L-tyrosine peut être directement apportée par le biais de l'alimentation mais elle peut également être produite à partir de l'hydroxylation de la L-phénylalanine par la phénylalanine hydroxylase dans les cellules hépatiques. La L-tyrosine est capturée au niveau des terminaisons pré-synaptiques par un transport actif où va débuter la synthèse de la dopamine. La synthèse de la dopamine s'effectue classiquement en deux grandes étapes :

- L'hydroxylation de la L-tyrosine en L-DOPA sous l'action de la tyrosine hydroxylase (TH) (étape limitante de la synthèse de la dopamine)
- La décarboxylation de la L-DOPA en dopamine sous l'action de la DOPA décarboxylase
 (AADC pour aromatic amino acid decarboxylase)

En plus de la voie de synthèse classique, la dopamine peut également être produite à partir de la tyramine. En effet, la tyramine est produite à partir de la L-tyrosine par la DOPA décarboxylase et convertie en dopamine par les enzymes Cyp2D. Cette voie alternative de synthèse de la dopamine a été décrite chez le rat *in vivo* (Meiser et al., 2013). Une fois synthétisée, la dopamine est stockée activement dans les vésicules synaptiques *via* un transporteur vésiculaire des monoamines, le VMAT2 (*vesicular monoamine transporter 2*). La dopamine peut également servir de précurseur de synthèse pour la noradrénaline et l'adrénaline : elle est hydroxylée par la dopamine β -hydroxylase pour donner de la noradrénaline, elle-même convertie en adrénaline *via* la phénylétanolamine N- méthyltransférase. La dopamine est libérée des vésicules de stockage par un mécanisme voltage-dépendant : l'arrivée d'un potentiel d'action induit l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants localisés au niveau de la membrane pré-synaptique, entrainant son exocytose dans la fente synaptique. Une fois libérée, la dopamine peut soit être recapturée par les terminaisons pré-synaptiques, soit être dégradée ou soit venir se fixer sur ses récepteurs spécifiques au niveau pré- ou post-synaptique.

La majeure partie de la dopamine exocytée dans la fente synaptique (80%) est recapturée activement par le DAT. Il s'agit d'une protéine à 12 domaines transmembranaires localisée au niveau de la membrane pré-synaptique des neurones dopaminergiques et permettant la recapture d'une molécule de dopamine *via* un transport actif Na⁺/Cl⁻ dépendant (German et al., 2015). Outre sa fonction de recapture, le DAT permet également la libération de la dopamine dans la fente synaptique selon un mécanisme plus lent Na⁺-dépendant appelé le « *reverse transport* » (Leviel, 2001). De part ces deux rôles opposés, le DAT est donc un acteur clé dans le maintien de l'homéostasie de la dopamine et le contrôle de la transmission dopaminergique. Contrairement à la TH qui est exprimée par toutes les cellules dites catécholaminergiques, le DAT est uniquement exprimé par les neurones dopaminergiques et constitue un très bon index d'intégrité de ces neurones.

Les deux principales enzymes participant à la dégradation de la dopamine sont la monoamine oxydase (MAO) et la catéchol O-méthyltransférase (COMT) (Meiser et al., 2013). Il existe deux isoformes de MAO : la MAO-A et la MAO-B, toutes deux localisées au niveau de la membrane externe mitochondriale. Les MAO sont exprimées par les neurones mais également par des cellules gliales comme les cellules microgliales et les astrocytes. Les MAO catalysent l'oxydation de la dopamine recapturée par le DAT en 3,4-dihydroxyphénylacétaldéhyde ou DOPAL, lui-même réduit en 3,4-dihydroxyphényléthanol ou DOPET ou oxydé en acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (DOPAC). Le DOPAC est ensuite libéré dans la fente synaptique pour y être dégradé. La COMT est une enzyme localisée au niveau de la membrane du neurone post-synaptique. Elle convertit la dopamine en 3-méthoxytyramine, elle-même transformée en 3-méthoxy-4-hydroxyacétaldéhyde puis en acide homovanillique (HVA). La COMT catalyse également la conversion du DOPAC issu de l'action des MAO en HVA. En plus d'être dégradée, la dopamine peut subir des réactions de conjugaison *via* la phénolsulfotransférase ou PST et l'uridine diphosphoglucuronosyltransférase ou UGT.





Figure 1. Représentation schématique des voies de synthèse de la dopamine (d'après Meiser et al., 2013). Abréviations : AADC (aromatic amino acid decarboxylase), TH (tyrosine hydroxylase), COMT (catechol O-methytransferase), MAO (monoamine oxydase), ALDH (aldehyde dehydrogenase), ADH (alcohol dehydrogenase), AR (aldehyde reductase), PST (phenolsulfotransferase), UGT (uridine glucuronosyltransferase).

Les récepteurs dopaminergiques appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G. Il existe 5 récepteurs dopaminergiques : D1, D2, D3, D4 et D5. Ils sont classés en 2 sous-familles selon leur propriétés biochimiques et pharmacologiques : les récepteurs dits « D1-like » regroupent les récepteurs D1 et D5 et les récepteurs dits « D2-like » regroupent les récepteurs D2, D3 et D4 (Landry et Gies, 2014). Au niveau de la synapse, les récepteurs « D1-like » sont exclusivement post-synaptiques alors que les récepteurs « D2-like » sont localisés à la fois en pré- et post-synaptique. Plusieurs voies de transduction sont associées aux récepteurs dopaminergiques mais la plus décrite est celle de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) (Bordet, 2004) :

- Les récepteurs « D1-like » sont couplés à une protéine Gs et régulent à la hausse le taux d'AMPc par activation d'une adénylate cyclase, aboutissant à une dépolarisation et donc à une augmentation de la fréquence d'émission des potentiels d'action (effet excitateur).
- Les récepteurs « D2-like » sont couplés à une protéine Gi et régulent à la baisse le taux d'AMPc par inhibition de l'adénylate cyclase, aboutissant à une hyperpolarisation au niveau post-synaptique et à une diminution de la libération du neurotransmetteur en présynaptique (effet inhibiteur).

Les récepteurs dopaminergiques sont localisés à la fois au niveau central et au niveau périphérique. Dans le cerveau (Beaulieu et Gainetdinov, 2011) :

- Les récepteurs D1 sont fortement exprimés au niveau du striatum, du noyau accumbens, de la SN, du tubercule olfactif, de l'amygdale et du cortex frontal. Ils sont également exprimés plus faiblement dans l'hippocampe et le cervelet.
- Les récepteurs D2 sont fortement exprimés au niveau du striatum, du noyau accumbens et du tubercule olfactif. Ils sont également retrouvés au niveau de la SN, de l'aire tegmentaire ventrale (ATV), de l'hypothalamus, de l'amygdale et de l'hippocampe.
- Les récepteurs D3 ont un pattern d'expression très limité. Ils sont localisés au niveau du noyau accumbens et du tubercule olfactif.
- Les récepteurs D4 sont les récepteurs dopaminergiques les moins exprimés. Ils sont retrouvés notamment au niveau du cortex frontal, de l'amygdale et de l'hippocampe.
- Les récepteurs D5 sont faiblement exprimés dans plusieurs régions cérébrales comme la SN, l'hypothalamus et l'hippocampe.

B. Les voies dopaminergiques dans le système nerveux central

Bien qu'ils jouent un rôle dans plusieurs fonctions essentielles, les neurones dopaminergiques représentent moins de 1% des cellules du cerveau. Chez les mammifères, les cellules dopaminergiques sont classiquement divisées en 10 groupes distincts de A8 à A17 (Figure 2), les groupes A1 à A7 correspondent aux neurones noradrénergiques. Les groupes A8, A9 et A10 constituent les voies dopaminergiques majeures du système nerveux central (SNC) et sont les plus décrits :

- Le groupe A9 est situé au niveau de la substance noire *pars compacta* (SNpc) et projette vers le striatum. Il s'agit de la voie nigro-striée jouant un rôle essentiel dans le contrôle de la motricité. Cette voie constitue notamment près de 80% du système dopaminergique du cerveau (Jučaite, 2002). La dégénérescence spécifique de cette voie est à l'origine des symptômes moteurs de la MP.
- Le groupe A10 est situé au niveau de l'ATV et projette majoritairement vers des structures du système limbique dont le noyau accumbens, l'amygdale et le tubercule olfactif. Ces différentes projections forment la voie mésolimbique participant aux circuits de la récompense et de la motivation.
- Le groupe A8 est situé dans l'ATV et dans le champ rétrorubral et projette majoritairement vers plusieurs régions du cortex dont le cortex cingulaire, enthorinal et préfrontal. Il s'agit de la voie mésocorticale impliquée dans les fonctions exécutives comme la mémoire de travail.

Le nombre de neurones constituant les groupes A8, A9 et A10 diffère suivant les espèces : il est estimé à 45 000 pour le rat, à 165 000 pour le macaque et à 590 000 pour l'Homme (Chinta et Andersen, 2005 ; Prakash et Wurst, 2006). Les groupes A11 à A17 interviennent dans diverses fonctions :

- Le groupe A11 est localisé au niveau du diencéphale et projette vers la moelle épinière, ces neurones jouent un rôle dans les processus sensori-moteurs.
- Les groupes A12 et A14 sont situés au niveau des noyaux arqué et périventriculaire de l'hypothalamus et projettent vers l'éminence médiane hypothalamique. Ils constituent la voie tubéro-infundibulaire impliquée dans le contrôle de la libération d'hormones au niveau hypophysaire comme la prolactine.
- Le groupe A13 est localisé au niveau de la zona inserta et projette vers l'amygdale et l'hypothalamus, il s'agit de la voie incerto-hypothalamique impliquée dans les

comportements sexuels.

- Les groupes A16 et A17 sont retrouvés respectivement au niveau du bulbe olfactif et de la rétine.
- Le groupe A15, quant à lui, est retrouvé chez certaines espèces comme le mouton au niveau du noyau supra-optique de l'hypothalamus.



Figure 2. Représentation schématique des voies dopaminergiques dans le SNC chez l'Homme (A) et chez le rongeur (B) (d'après Björklund et Dunnett, 2007). Pour les voies dopaminergiques chez l'Homme, la voie nigrostriée est représentée par les flèches rouges, la voie méso-limbique par les flèches bleues, la voie méso-corticale par la flèche verte et la voie tubéro-infundibulaire par la flèche mauve. Abréviation : SNC (système nerveux central).

- 2- Les ganglions de la base
- A. Organisation des circuits des ganglions de la base

Les ganglions de la base sont constitués par un ensemble de structures sous-corticales jouant un rôle dans diverses fonctions incluant le contrôle moteur, les fonctions exécutives et les émotions. Les ganglions de la base comprennent le striatum, les globus pallidum interne (GPi) et externe (GPe), le noyau sous-thalamique (NST) et la SN, elle-même subdivisée en SNpc en position dorsale et en substance noire *pars reticulata* (SNpr) en position ventrale. A ces structures viennent s'ajouter le noyau accumbens, l'ATV, le noyau pédonculopontin et le complexe central du thalamus. Toutes ces structures sont interconnectées et sont catégorisées (Lanciego et al., 2012) :

- Les noyaux d'entrée (*input nuclei*) : ce sont des structures recevant des informations provenant de différentes sources, le plus souvent d'origine corticale, thalamique et nigrale. Ils sont représentés par le striatum et le noyau accumbens.
- Les noyaux de sortie (*output nuclei*) : ce sont des structures chargées d'envoyer des informations vers le thalamus. Ils sont représentés par le GPi et la SNpr.
- Les noyaux intrinsèques (*intrinsic nuclei*) : ce sont des structures permettant le relais de l'information entre les noyaux d'entrée et de sortie. Ils comprennent le GPe, le NST et la SNpc.

Le bon fonctionnement de ces circuits assure le contrôle de la motricité alors qu'un dysfonctionnement est à l'origine des problèmes moteurs rencontrés au cours de la MP.

B. Circuits des ganglions de la base en condition physiologique

Classiquement, la connectivité des ganglions de la base en condition physiologique est largement décrite par le modèle établi par Alexander et Crutcher (1990). Le striatum constitue la porte d'entrée du système. Il s'agit d'une structure volumineuse composée à plus de 90% par des neurones épineux de taille moyenne (NEM ou *MSN* pour *Medium Spiny Neurons*). Les NEM sont des interneurones GABAergiques contenant également des neuropeptides colocalisés participant à leur différenciation en deux sous-populations (GABA + substance P et GABA + enképhaline). Les interneurones GABAergiques striataux reçoivent deux types d'afférences excitatrices : des afférences dopaminergiques de la SNpc et des afférences glutamatergiques du cortex cérébral. Au niveau striatal, deux types de voies efférentes existent : la voie directe et la voie indirecte.

La voie directe met en jeu les NEM striataux (GABA + substance P) projetant vers le complexe GPi/SNpr. Les neurones glutamatergiques provenant du cortex cérébral entrainent l'activation des NEM, induisant une inhibition des neurones GABAergiques de la SNpr. Cette inhibition provoque une levée d'inhibition des neurones glutamatergiques du thalamus projetant en direction du cortex cérébral, aboutissant *in fine* à l'activation du mouvement (Calabresi et al., 2014).

La voie indirecte, quant à elle, met en jeu les NEM striataux (GABA + enképhaline) projetant directement dans le NST et indirectement dans la SNpr par l'intermédiaire du GPe. L'activation de ces NEM entraine une inhibition des neurones GABAergiques du GPe
conduisant à la levée d'inhibition des neurones glutamatergiques du NST. Par conséquent, l'activation de ces neurones induit une activation des neurones GABAergiques de la SNpr projetant dans le thalamus, aboutissant *in fine* à l'inhibition du mouvement (Calabresi et al., 2014).

Au sein de ce système, les neurones dopaminergiques provenant de la SNpc agissent comme des projections modulatrices. En effet, il est montré que les NEM striataux projetant vers le complexe GPi/SNpr expriment le récepteur D1 (activation de l'adénylate cyclase avec effet excitateur) alors que les NEM projetant en direction du GPe expriment le récepteur D2 (inhibition de l'adénylate cyclase avec effet inhibiteur) (Lanciego et al., 2012). Les neurones dopaminergiques régulent donc le contrôle du mouvement, soit en facilitant la voie directe, soit en inhibant la voie indirecte.

Les circuits des ganglions de la base en condition physiologique sont représentés dans la Figure 3 ci-dessous.



Figure 3. Représentation schématique des circuits des ganglions de la base en condition physiologique (adapté de Lanciego et al., 2012). Abréviations : GPe (globus pallidum externe), GPi (globus pallidum interne), NST (noyau sous-thalamique), SNpc (substance noire *pars compacta*), SNpr (substance noire *pars reticulata*).

C. Circuits des ganglions de la base dans la maladie de Parkinson

La MP est majoritairement caractérisée par la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la SNpc, amenant à d'importantes modifications des circuits neuronaux à l'origine du contrôle du mouvement. En effet, la déplétion en dopamine au niveau striatal entraine une hypoactivation de la voie directe et une hyperactivation de la voie indirecte, induisant ainsi une hyperactivité des neurones GABAergiques du complexe GPi/SNpr. En effet, l'hyperactivation de la voie indirecte entraine une hyperactivité des neurones glutamatergiques du NST. L'hyperactivité des neurones GABAergiques du GPi et de la SNpr entraine l'inhibition des projections glutamatergiques thalamiques, provoquant ainsi une inhibition du mouvement. L'activité anormale de certaines de ces structures comme le NST, le complexe GPi/SNpr ou encore le thalamus font l'objet de stratégies thérapeutiques (stimulation cérébrale profonde, chirurgie lésionnelle) afin de réduire les symptômes moteurs de la maladie.

Les circuits des ganglions de la base dans la MP sont représentés dans la Figure 4 ci-dessous.



Figure 4. Représentation schématique des circuits des ganglions de la base dans la MP (adapté de Lanciego et al., 2012). Abréviations : MP (maladie de Parkinson), GPe (globus pallidum externe), GPi (globus pallidum interne), NST (noyau sous-thalamique), SNpc (substance noire *pars compacta*), SNpr (substance noire *pars reticulata*).

3- Caractéristiques de la dégénérescence dopaminergique

A. Données macroscopiques et microscopiques

Comme dit précédemment, la MP est majoritairement caractérisée par la perte des neurones dopaminergiques de la SNpc. D'un point de vue macroscopique, la perte de ces neurones se manifeste par une dépigmentation de la SN (Figure 5). En effet, les neurones dopaminergiques de la SNpc avec les neurones noradrénergiques du locus cœruleus sont les cellules les plus pigmentées du cerveau. Ils contiennent un pigment, la neuromélanine, qui exerce un rôle neuroprotecteur en chélatant des composés toxiques comme des métaux lourds ou des produits toxiques issus de la synthèse de la dopamine (Zecca et al., 2003). D'un point de vue microscopique, les neurones dopaminergiques de la SNpc contiennent de petites inclusions cytoplasmiques sphériques de nature éosinophile appelés les corps de Lewy (Figure 5). Ils sont caractérisés par la présence de protéines anormalement repliées et jouent un rôle important dans le processus neurodégénératif.



Figure 5. Neuropathologie de la MP. (A) Représentation schématique de la voie nigro-striée en condition physiologique. (B) Représentation schématique de la voie nigro-striée dans la MP. (C) Marquage immunohistochimiques des corps de Lewy au sein des neurones dopaminergiques de la SNpc (d'après Dauer et Przedborski, 2003). Abréviations : MP (maladie de parkinson), SNpc (substance noire *pars compacta*).

B. Processus intervenant dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques

La mort des neurones dopaminergiques de la SNpc est multifactorielle : elle met en jeu plusieurs types de processus dont les principaux sont résumés dans la Figure 6. La neuroinflammation qui joue également un rôle important dans la neurodégénérescence fait l'objet d'une partie indépendante du manuscrit.



Figure 6. Représentation schématique des principaux mécanismes impliqués dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la MP (adapté de Maiti et al., 2017). Abréviation : MP (maladie de Parkinson).

Accumulation et agrégation de protéines mal repliées (cas de l'α-synucléine)

La présence des corps de Lewy au sein des neurones dopaminergiques de la SNpc est une caractéristique majeure de la MP. Ces corps sont majoritairement composés d'une protéine anormalement repliée, l' α -synucléine, laquelle est morphologiquement proche à d'autres types de protéines dont la protéine Tau phosphorylée et la protéine β -amyloïde. L' α -synucléine est une petite protéine de 140 acides aminés assurant diverses fonctions physiologiques comme la compartimentalisation, le stockage et le recyclage de neurotransmetteurs comme la dopamine (Xu et Pu, 2016). La mise en évidence de mutations ponctuelles de l' α -synucléine associées à de rares formes héréditaires dominantes de la MP a permis d'évoquer un rôle de cette protéine dans le processus neurodégénératif. Plusieurs mutations ont été découvertes à ce jour incluant l'A30P, l'A53T, l'A18T, l'A29S, l'E46K,

l'H50Q et la G51D (Maiti et al., 2017). La mutation A53T est notamment utilisée comme modèle d'étude transgénique. L' α -synucléine, sous sa forme native mutée ou non, peut adopter diverses conformations toxiques sous l'influence de facteurs environnementaux comme le stress : il s'agit d'oligomères ou de fibrilles pouvant s'agréger entre elles pour former les corps de Lewy (Tan et al., 2009 ; Breydo et al., 2012). Trois mécanismes ont été proposés pour expliquer la neurotoxicité de l' α -synucléine (Beyer et al., 2009) :

- L'α-synucléine est capable d'interagir directement avec l'ADN où elle inhibe l'acétylation des histones (neurotoxicité nucléaire).
- L'α-synucléine peut également interagir avec les lipides membranaires où elle créer des pores perturbant fortement l'homéostasie ionique (neurotoxicité membranaire).
- L'α-synucléine peut inhiber le facteur de survie neuronal MEF2D entrainant une diminution de la viabilité des neurones.
 - Altération de la protéolyse cellulaire

Les deux principaux systèmes intervenant dans la protéolyse cellulaire sont le système ubiquitine-protéasome et l'autophagie. Le système ubiquitine-protéasome permet la dégradation des protéines conjuguées à des chaines d'ubiquitine par un complexe protéolytique, le protéasome. L'implication de ce système dans la physiopathologie de la MP a été mise en évidence suite à la découverte de la mutation de gènes retrouvés dans certaines formes de la maladie comme le gène Parkin et le gène UCHL1 codant respectivement pour la parkine et la protéine UCH-L1 (Rubinsztein, 2006 ; Lim et Tan, 2007). Ces protéines jouent un rôle important au sein du système : la parkine est une ubiquitine ligase E3 intervenant dans le processus d'ubiquitination alors que la protéine UCH-L1 permet de restaurer des monomères d'ubiquitine. Des données expérimentales permettent également de mettre en évidence des altérations du protéasome dans la MP. En effet, des études post-mortem dans la SN de patients parkinsoniens ont révélé des défauts d'expression des sous unités α constituant le protéasome 20S (McNaught et al., 2002 ; Bukhatwa et al., 2010). D'autre part, l'inhibition du protéasome chez l'animal conduit à la dégénérescence des neurones dopaminergiques (Fornai et al., 2003 ; McNaught et al., 2004) et est également utilisée comme modèle d'étude pour la MP (Bentea et al., 2017).

L'autophagie inclut la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie médiée par les protéines chaperones dont les protéines HSC70 (*heat shock cognate protein 70*) et permet la

dégradation des protéines *via* le lysosome (Lynch-Day et al., 2012). La macroautophagie est le mécanisme le plus décrit et englobe la mitophagie, processus permettant la dégradation des mitochondries endommagées. Le dysfonctionnement de la mitophagie est notamment présent dans les maladies neurodégénératives incluant la MP (Wang et al., 2016). Les altérations des processus d'autophagie ont été décrites *post-mortem* dans la SN de patients parkinsoniens (Anglade et al., 1997 ; Alvarez-Erviti et al., 2010) et l'amélioration de ces processus engendre des effets neuroprotecteurs chez l'animal (Decressac et al., 2013 ; Xilouri et al., 2013). Par conséquent, les altérations de la protéolyse cellulaire entrainent l'accumulation de protéines endommagées et/ou anormalement repliées favorisant la mort cellulaire.

Atteintes mitochondriales et stress oxydatif

Il est très largement reconnu que les mitochondries jouent un rôle central dans la physiopathologie de la MP. Les altérations mitochondriales sont majoritairement représentées par la production d'espèce réactives de l'oxygène (ERO) et par une déplétion en adénosine triphosphate (ATP) (Luo et al., 2015). Plusieurs facteurs sont en cause dans ces altérations à commencer par l'âge. En effet, les fonctions mitochondriales (production d'ATP et activité de la chaine respiratoire) décroissent avec l'âge. De plus, l'ADN mitochondrial dans le tissu en vieillissement présente de nombreuses mutations et de larges déplétions à l'origine de plusieurs dysfonctionnements (Theurey et Pizzo, 2018). L'exposition à des facteurs environnementaux comme les pesticides intervient également dans la survenue des altérations mitochondriales : le MPTP, la roténone ou encore le paraquat sont capables d'interférer avec la chaîne de transport des électrons à l'origine de la production d'ATP en bloquant le complexe I (Maiti et al., 2017).

La production d'ERO est très présente dans la MP : une augmentation de 8-hydroxyguanine (issu de l'oxydation de l'ADN) et une augmentation de la quantité de protéines oxydées ont été rapportées dans la SN de patients parkinsoniens (Alam et al., 1997 ; Floor et al., 1998). La chaine de transport des électrons est la principale source d'ERO au niveau cellulaire. En effet, les complexes I, II et III sont capables de générer de l'anion superoxyde O_2^{-} (Turrens, 2003). Le métabolisme de la dopamine lui-même génère également des ERO. En condition normale, la dégradation de la dopamine est assurée par la MAO-A. Cependant, avec l'âge et dans la MP, la dégradation est préférentiellement assurée par la MAO-B générant ainsi de l'eau oxygénée H₂O₂ (Dias et al., 2013). Les ERO sont très toxiques et favorisent la mort cellulaire

en s'attaquant aux composants cellulaires tels que l'ADN, les protéines ou encore les phospholipides membranaires.

III- Stratégies thérapeutiques pour la maladie de Parkinson

Il existe de nombreuses approches thérapeutiques pour la MP. Classiquement, elles peuvent être divisées en trois grands types : les thérapies médicales regroupant la dopathérapie et des approches non pharmacologiques alternatives comme la rééducation physique, les thérapies chirurgicales (stimulation cérébrale profonde, chirurgie lésionnelle) et les thérapies expérimentales (thérapie cellulaire, thérapie génique, nouvelles stratégies thérapeutiques). L'ensemble de ces approches est représenté dans la Figure 7 ci-dessous.



Figure 7. Représentation schématique de la diversité des approches thérapeutiques dans le traitement de la MP. Abréviation : MP (maladie de Parkinson).

1- Les thérapies médicales

A. La dopathérapie

La dopathérapie représente un ensemble de stratégies médicamenteuses visant à pallier le manque de dopamine soit en stimulant sa synthèse, soit en mimant son action, soit en bloquant sa dégradation (Figure 8).



Figure 8. Représentation schématique de la pharmacothérapie dans la MP avec l'utilisation de la L-DOPA, des agonistes dopaminergiques et des inhibiteurs du catabolisme de la dopamine (d'après Poewe et al., 2017). Abréviations : MP (maladie de Parkinson), L-DOPA (3,4-dihydroxyphénylalanine), AADC (aromatic amino acid decarboxylase), COMT (catechol-O-methyltransferase), MAOB (monoamine oxidase B), BBB (blood-brain barrier), DAT (dopamine transporter), 3-O-M-DOPA (3-O-methyl-DOPA), D1R (dopamine D1 receptor), D2R (dopamine D2 receptor), DOPAC (3,4-dioxy-phenylacetic acid), TH (tyrosine hydroxylase).

La stimulation de la synthèse de la dopamine est médiée par l'administration orale de L-DOPA encore appelée lévodopa. Il s'agit du médicament le plus puissant dans l'amélioration des fonctions motrices et le mieux toléré par les patients (Poewe et al., 2010), considéré alors comme le « gold standard » dans le traitement de la MP. Après ingestion orale, la lévodopa est activement absorbée au niveau de l'intestin grêle pour rejoindre le cerveau via la circulation sanguine. Afin d'éviter sa dégradation périphérique et donc d'améliorer sa biodisponibilité cérébrale, la lévodopa est classiquement co-administrée avec des inhibiteurs de l'AADC (carbidopa, bensérazide) ou de la COMT (entacapone, tolcapone) (Lewitt, 2008). Bien qu'elle permette l'amélioration des symptômes moteurs de la MP, l'administration de lévodopa induit des effets indésirables à la fois au niveau périphérique et central. En effet, la prise initiale de lévodopa peut provoquer des nausées, des vomissements, de l'hypotension et dans de rares cas des troubles du rythme cardiaque (Lewitt, 2008). D'autre part, un traitement à long terme (environ 4 à 6 ans) à la lévodopa est souvent associé à l'apparition de mouvements anormaux involontaires appelés dyskinésies. Elles concernent environ 40% des patients médiqués et touchent différentes zones du corps comme le cou, la mâchoire et les membres (Fernandez, 2012 ; Pandey et Srivanitchapoom, 2017). Les mécanismes soustendant le développement de ces dyskinésies ne sont pas complètement connus. Cependant, elles sont causées par une hyperactivation de la voie directe et une hypoactivation de la voie indirecte au sein des circuits des ganglions de la base conduisant à une hyperactivité de la voie thalamo-corticale (Guridi et al., 2012).

Les agonistes dopaminergiques sont des analogues structuraux de la dopamine. Ils agissent sur tous les types de récepteurs dopaminergiques mais partagent une capacité plus particulière à stimuler les récepteurs D2 (Poewe et al., 2017). Les agonistes dopaminergiques sont classés en deux catégories : les agonistes ergotés, dérivés de l'ergot de seigle (exemple de la bromocriptine, agoniste D2) et les agonistes non-ergotés (exemple de l'apomorphine, agoniste D1 et D2). Du fait de leur structure chimique, les agonistes ergotés présentent un risque de développement de fibrose (pulmonaire ou rétropéritonéale). Comparés à un traitement à la lévodopa, les effets des agonistes dopaminergiques dans l'amélioration des fonctions motrices sont moins importants. De plus, ils partagent les mêmes effets indésirables que la lévodopa bien qu'ils présentent un risque moindre dans la survenue de dyskinésies à long terme.

Les inhibiteurs du catabolisme de la dopamine agissent principalement sur deux enzymes : la MAO-B (exemple de la ségéline) et la COMT. Ils ont pour rôle d'empêcher la dégradation de la dopamine afin de potentialiser son effet au niveau des récepteurs dopaminergiques.

B. Les approches non-pharmacologiques alternatives

Elles sont principalement représentées par différents types de rééducations fonctionnelles (physique, orthophonique). Bien qu'elles ne permettent pas de ralentir la progression de la maladie, ces rééducations améliorent certains symptômes. A titre d'exemple, la pratique régulière d'un exercise physique permet d'améliorer la rigidité musculaire et l'instabilité posturale.

2- Les thérapies chirurgicales

Les thérapies chirurgicales dans le traitement de la MP concernent très peu de patients, environ 10 à 15%, principalement ceux dont le traitement chronique à la lévodopa devient progressivement inefficace avec apparition de dyskinésies (Beitz, 2014).

A. La stimulation cérébrale profonde

La stimulation cérébrale profonde (SCP) consiste à implanter des électrodes de stimulation reliées à un dispositif implanté sous la peau (principalement au niveau sous-claviculaire) délivrant des impulsions électriques de haute fréquence en continu. Ces électrodes sont préférentiellement implantées bilatéralement dans des zones cérébrales hyperactivées au cours de la MP comme le GPi, le thalamus et le NST. La stimulation du NST est une cible privilégiée, elle permet l'amélioration des symptômes moteurs (akinésie, rigidité musculaire, dyskinésies) mais également de certains symptômes non-moteurs comme les troubles de l'humeur (Benabid, 2003). La SCP n'induit pas de lésion tissulaire et elle est réversible. Certaines complications liées à la procédure chirurgicale peuvent se manifester comme la survenue d'un hématome cérébrale ou des infections. Cependant, elles ne concernent que très peu de patients, environ 2% des cas.

B. La chirurgie lésionelle

Contrairement à la SCP, la chirurgie lésionnelle consiste à détruire des zones cérébrales hyperactivées au cours de la maladie par émission de rayonnements ionisants. Il existe plusieurs types de lésions suivant la structure ciblée : la pallidotomie (GPi), la thalamotomie (thalamus) et la sous-thalamonie (NST) (Walter et Vitek, 2004). Du fait de sa nature destructrice et donc irréversible, la chirurgie lésionnelle n'est plus pratiquée en routine de nos jours. D'autre part, cette technique se pratique uniquement de manière unilatérale et s'avère donc moins efficace que la SCP.

3- Les thérapies expérimentales

Dans tous les cas, les stratégies thérapeutiques sont symptomatiques, ne permettant pas de ralentir la progression de la maladie. Dans cette optique, il est urgent de développer de nouvelles approches capables de ralentir la dégénérescence des neurones dopaminergiques. Les thérapies expérimentales regroupent plusieurs types de stratégies incluant la thérapie cellulaire, la thérapie génique et de nouvelles stratégies thérapeutiques.

A. La thérapie cellulaire

En considérant que les neurones ont une capacité très limitée de renouvellement, la transplantation de cellules capables de remplacer les neurones dopaminergiques ayant dégénéré au cours de la MP représente une approche thérapeutique très prometteuse. L'objectif de la thérapie cellulaire est donc de remplacer la neurotransmission dopaminergique défaillante par la greffe de cellules capables de sécréter *in situ* de la dopamine. Plusieurs types de cellules peuvent être utilisés pour la transplantation.

Les premières cellules ayant été utilisées sont des cellules provenant du mésencéphale foetal. Les premiers effets bénéfiques de la greffe de ce type de cellules ont été montrés en 1979 (Björklund et Steveni, 1979 ; Perlow et al., 1979). Ces deux équipes ont rapporté une amélioration des fonctions motrices suite à une greffe striatale dans le modèle de lésion à la 6hydroxydopamine (6-OHDA) chez le rongeur (voir chapitre IV). Ils ont également confirmé par analyses histologiques une survie du greffon, l'excroissance de fibres dopaminergiques et la formation de synapses. Le succès de ces greffes a donc logiquement amené à des essais cliniques. A partir des années 1990, de nombreuses études ont rapporté des effets bénéfiques chez l'Homme notamment sur les symptômes moteurs de la maladie (Lindvall et al., 1990 ; Freed et al., 1992; Spencer et al., 1992; Lindvall et al., 1994; Peschanski et al., 1994; Wenning et al., 1997 ; Hauser et al., 1999). Cependant, l'utilisation de cellules provenant du mésencéphale foetal soulève des questions éthiques (elles sont obtenues après interruption volontaire de grossesse) et induit des effets indésirables. En effet, il a été montré que ces greffes sont capables d'induire l'apparition de dyskinésies similaires à celles induites par la lévodopa chez certains patients (Hagell et al., 2002). D'autre part, certains neurones dopaminergiques de la greffe présentent des corps de Lewy, suggérant qu'ils sont affectés par le processus pathologique de la MP (Korwoder et Brundin, 2009). Toutes ces considérations ont donc amené à utiliser d'autres types cellulaires.

Les cellules souches embryonnaires sont des cellules dérivant de la masse interne du blastocyste au cours de la vie intra-utérine. Ce sont des cellules pluripotentes : elles ont la capacité de se multiplier et de se différencier en n'importe quel type cellulaire. Comme pour les cellules provenant du mésencéphale foetal, l'utilisation de ce type de cellules pose des problèmes éthiques (même origine que les cellules provenant du mésencéphale foetal) et elles sont associées à la formation de tumeurs. En effet, il a été montré chez le rat lésé à la 6-OHDA que la greffe striatale de cellules souches embryonnaires de souris permet une amélioration des fonctions motrices mais induit également l'apparition de tératomes (Björklund et al., 2002). Dans ce même modèle, la greffe striatale de neurones dopaminergiques provenant de cellules souches embryonnaires humaines permet également une amélioration des fonctions motrices mais l'analyse de la greffe indique une prolifération importante de cellules non-différenciées potentiellement pro-tumorales (Roy et al., 2006b).

Les cellules souches mésenchytameuses sont des cellules multipotentes présentent chez l'adulte dans la moelle osseuse. Elles sont également rencontrées dans certains tissus chez l'adulte et le nouveau-né dont les plus importants sont le tissu adipeux et le cordon ombilical. Comparés aux autres types de cellules souches, les cellules souches mésenchytameuses présentent plusieurs avantages : leur utilisation ne présentent pas de risque de formation de tératomes, ne pose pas de problèmes éthiques, n'induise pas de réactions immunitaires de rejet et ces cellules sont relativement faciles d'accès (Gugliandolo et al., 2017). Plusieurs études récentes dans différents modèles pré-cliniques ont rapporté des effets neuroprotecteurs ainsi qu'une amélioration des fonctions motrices suite à la greffe de cellules mésenchytameuses dérivant de la moelle osseuse (Bouchez et al., 2008 ; Hayashi et al., 2013 ; Wang et al., 2013 ; Xiong et al., 2017a), du tissu adipeux (Zhou et al., 2013 ; Berg et al., 2015 ; Schwerk et al., 2015) et du cordon ombilical (Mathieu et al., 2012 ; Kang et al., 2013 ; Yan et al., 2013). Cependant, aucune donnée clinique ne montre des effets bénéfiques concluants suite à l'utilisation de cellules souches mésenchytameuses (Yasuhara et al., 2017).

L'utilisation des cellules souches pluripotentes induites (CSPis ou *iPSCs* pour *induced pluripotent stem cells*) est une alternative très prometteuse dans la thérapie cellulaire pour la MP. En 2006, Takahashi et Yamanaka (2006) ont montré qu'il est possible de reprogrammer *in vitro* des fibroblastes de souris adultes en cellules souches pluripotentes grâce à l'introduction de facteurs de transcription spécifiques. Ce concept à par la suite été étendu aux

cellules somatiques humaines (Takahashi et al., 2007 ; Yu et al., 2007 ; Park et al., 2008). Des études récentes dans des modèles pré-cliniques utilisant des CSPis ont rapporté des effets bénéfiques notamment sur les fonctions motrices (Doi et al., 2014 ; Han et al., 2015 ; Samata et al., 2016 ; Kikuchi et al., 2017a ; Kikuchi et al., 2017b ; Lehnen et al., 2017). Pour le moment, les CSPis n'ont pas été étudiées chez l'Homme dans le cadre de la MP mais des essais cliniques sont programmés pour les prochaines années (Barker et al., 2017). Bien qu'elles présentent les mêmes avantages que les cellules souches mésenchytameuses, les CSPis dérivées de patients parkinsoniens pourraient être utilisés pour modéliser la maladie *in vitro*, permettant ainsi la recherche et l'évaluation de nouveaux traitements pharmacologiques (Barrow, 2015). Le principe d'utilisation des CSPis chez l'Homme est résumé dans la Figure 9 ci-dessous.



Figure 9. Représentation schématique du principe d'utilisation des CSPis chez l'Homme dans le cadre de la MP (adapté de Sonntag et al., 2018). Abréviations : CSPis (cellules souches pluripotentes induites), MP (maladie de Parkinson).

B. La thérapie génique

La thérapie génique consiste à introduire du matériel génétique afin de modifier la fonction biologique ou cellulaire d'un tissu cible à des fins thérapeutiques. L'introduction du matériel

génétique nécessite l'utilisation d'un vecteur. Actuellement, il existe deux grands types de vecteurs : les vecteurs viraux (adénovirus, lentivirus, « adeno-associated-virus » ou AAV) et les vecteurs non-viraux regroupant un ensemble de techniques incluant l'électroporation (Lin et al., 2017). Toutefois, les AAV sont les vecteurs les plus utilisés car ils sont capables d'infecter une grande variété de types cellulaires incluant les neurones. Ils sont modifiés en laboratoire afin d'éviter leurs réplications et ainsi limiter le risque infectieux. Il existe actuellement deux grands types de thérapie génique dans le traitement de la MP : les thérapies basées sur l'administration de facteurs neurotrophiques et les thérapies basées sur la régulation de la synthèse de neurotransmetteurs (Lin et al., 2017).

Les facteurs neurotrophiques sont des protéines jouant un rôle important dans le développement et le maintien des fonctions cérébrales, ils assurent en particulier le maintien des neurones chez l'adulte. Compte tenu de ces propriétés, l'administration intra-cérébrale de facteurs neurotrophiques pourrait donc ralentir voire stopper la perte des neurones dopaminergiques dans la MP (Hegarty et al., 2014). Deux facteurs neurotrophiques ont particulièrement été étudiés : le GDNF (g*lial cell-derived neurotrophic factor*) et la neurturine.

Les effets du GDNF ont été étudiés dans plusieurs modèles pré-cliniques : il a été montré que l'administration de ce facteur neurotrophique en utilisant le vecteur AAV2 induit des effets neuroprotecteurs ainsi qu'une amélioration des fonctions motrices (Eslamboli et al., 2003 ; Eslamboli et al., 2005 ; Eberling et al., 2009 ; Johnston et al., 2009 ; Kells et al., 2010). Un essai clinique utilisant le même vecteur viral est notamment en cours (Valdés et Schneider, 2018). La neurturine, quant à elle, a fait l'objet de plusieurs essais cliniques mais les résultats obtenus n'ont pas été concluants (Marks et al., 2008 ; Marks et al., 2010 ; Bartus et al., 2013 ; Warren Olanow et al., 2015).

Les thérapies basées sur la régulation de la synthèse de neurotransmetteurs incluent des thérapies ciblant le glutamate et la dopamine. Comme dit précédemment (voir chapitre II), la perte des neurones dopaminergiques nigro-striataux entraine des modifications importantes au sein des circuits des ganglions de la base dont une hypoactivation des voies GABAergiques du NST. De ce fait, plusieurs thérapies géniques ont été développées afin de rétablir le tonus GABAergique au sein de cette structure cérébrale. Pour cela, elles se sont appuyées sur l'utilisation et l'injection dans le NST de vecteurs AAV2 contenant la GAD (g*lutamic acid decarboxylase*), enzyme limitante de la synthèse du GABA. Plusieurs essais cliniques ont notamment rapporté une amélioration des symptômes moteurs (Kaplitt et al., 2007 ; LeWitt et

al., 2011; Niethammer et al., 2017).

Les thérapies géniques ciblant la dopamine ont pour objectif de favoriser la production locale de dopamine *via* l'introduction d'un ensemble de molécules intervenant dans la voie de biosynthèse comme l'AADC. Deux essais cliniques utilisant des vecteurs AAV2 contenant l'AADC ont notamment montré une amélioration des symptômes moteurs (Christine et al., 2009 ; Muramatsu et al., 2010). Plus récemment, une tri-thérapie génique basée sur l'administration d'un lentivirus contenant la TH, l'AADC et un co-facteur de la TH, le GTC (guanosine triphosphate cyclohydrolase) (ProSavin[®]) a été développée et a également montré une amélioration des symptômes moteurs (Christine et al., 2014).

C. Les nouvelles strategies thérapeutiques

L'élaboration de nouvelles approches thérapeutiques dans le traitement de la MP s'appuie sur la connaissance des mécanismes pathologiques intervenant dans la mort des neurones dopaminergiques de la SNpc. Comme cité précédemment, la perte de ces neurones est multifactorielle, faisant intervenir différents mécanismes comme le stress oxydatif et l'altération de la protéolyse cellulaire. L'accumulation de données expérimentales chez l'Homme comme chez l'animal suggère que la neuroinflammation joue un rôle majeur dans le processus neurodégénératif *via* différents évènements cellulaires et moléculaires, conduisant ainsi à l'élaboration d'approches neuroprotectrices visant à réduire ces processus inflammatoires (voir chapitre V).

IV- Modèles animaux dans l'étude de la maladie de Parkinson

Bien que les modèles animaux ne permettent pas de reproduire toutes les caractéristiques de la MP, ils représentent des outils indispensables dans l'amélioration de la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la maladie humaine et dans l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques. Il existe deux grands types de modèles animaux de la MP : les modèles génétiques et les modèles toxiques.

1- Modèles génétiques

Les modèles génétiques sont basés sur l'expression d'un gène muté observé dans des formes familiales ou héréditaires de la MP. Ils permettent notamment d'améliorer la compréhension des voies de signalisation associées à ces mutations afin d'élargir le spectre des approches thérapeutiques (Jagmag et al., 2015). La souris et le rat sont les deux espèces animales les plus utilisées pour les modèles génétiques. Certaines espèces d'invertébrés, comme la drosophile (D. melanogaster), le poisson zèbre (D. rerio) et le nématode (C. elegans) sont également utilisées. En effet, la plupart des gènes mis en causes dans la MP possèdent leurs homologues chez ces espèces animales. Les modèles génétiques sont basés sur le transfert d'un gène d'intérêt dans des cellules cibles grâce à l'utilisation de vecteurs. Plusieurs types de vecteurs peuvent être utilisés : des vecteurs viraux comme des adénovirus et des lentivirus mais également des vecteurs non viraux comme les prions ou les plasmides (Dawson et al., 2010). Les modèles génétiques les plus répandus sont basés sur la sur-expression de l'a-synucléine, normale ou mutée (exemple de la mutation A53T). De nombreuses études ont rapporté que la sur-expression d'a-synucléine normale ou mutée (A53T) chez la souris et le rat induit une perte neuronale au niveau de la SN et la formation d'agrégats toxiques cytoplasmiques (Kirik et al., 2002 ; Lo Bianco et al., 2002 ; Lauwers et al., 2003 ; Koprich et al., 2010 ; Engeln et al., 2013; Oliveras-Salva et al., 2013).

2- Les modèles toxiques

Les modèles toxiques sont basés sur l'administration locale ou systémique de neurotoxines capables d'induire une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée. Les toxines majoritairement utilisées sont le MPTP, la 6-OHDA, la roténone, le paraquat et la méthamphétamine. Le modèle d'intoxication à la 6-OHDA fait l'objet d'une partie indépendante car il s'agit du modèle utilisé au cours de cette thèse.

A. Intoxication au MPTP

La mise en évidence des effets neurotoxiques du MPTP remonte aux années 1970 avec la description de syndromes parkinsoniens chez des toxicomanes suite à une injection intraveineuse accidentelle de ce dérivé de l'héroïne. Il s'agit d'une molécule hautement lipophilique pouvant facilement traverser la BHE. Le MPTP peut donc être injecté de manière systémique. Une fois injecté, le MPTP est converti dans les cellules gliales comme les astrocytes en MPP⁺ (1-méthyl-4-phénylpyridinium) par la MAO-B. Il s'agit du métabolite actif et très toxique du MPTP (Jackson-Lewis et Przedborski, 2007). Le MPP⁺ est ensuite libéré dans l'espace intercellulaire et pénètre dans les neurones dopaminergiques par le DAT. Une fois dans les neurones dopaminergiques, la neurotoxicité du MPP⁺ est médiée par une production importante d'ERO et par une inhibition du complexe I de la chaine respiratoire mitochondriale (Lambeng et al., 2002). Les espèces animales les plus utilisées dans ce modèle sont la souris et le primate non-humain. Le rat présente une résistance face à l'intoxication au MPTP (Riachi et al., 1990). Certaines souches de souris sont également résistantes face à l'intoxication au MPTP. Les raisons de ces résistances ne sont pas bien pas connues mais résulteraient d'une différence d'activité de la MAO-B entre les différentes espèces (Meredith et Rademacher, 2011). Dans le modèle d'intoxication au MPTP, les dommages neuronaux ne sont pas spécifiques de la voie nigro-striée. En effet, ce modèle présente également une perte des neurones GABAergiques striataux et une perte des neurones de l'ATV (Hernandez-Baltazar et al., 2017). Bien que la souris et le primate non-humain intoxiqués au MPTP présentent une perte des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée caractéristique de la maladie humaine, ils ne présentent pas de formation de corps de Lewy.

B. Intoxication à la roténone

La roténone est une toxine naturellement produite par différentes plantes et très largement utilisée comme insecticide. Comme le MPTP, elle est hautement lipophilique et peut donc être administrée chez l'animal de manière systémique (intra-péritonéale, intraveineuse, souscutanée). La roténone peut également être injectée directement de manière intra-cérébrale par stéréotaxie. La toxicité de la roténone envers les neurones dopaminergiques a été pour la première fois montrée chez le rat par Heikkila et al. (1985). Le mécanisme d'action de la roténone est similaire à celui du MPTP : après avoir pénétré dans le neurone par simple diffusion au travers de la membrane, la roténone inhibe le complexe I de la chaine respiratoire mitochondriale, provoquant une déplétion en ATP et la production d'ERO (Johnson et Bobrovskaya, 2015). Le modèle d'intoxication à la roténone a la particularité de reproduire quasiment toutes les caractéristiques de la maladie humaine incluant la formation des corps de Lewy (Blesa et al., 2012). Cependant, ce modèle est caractérisé par une faible reproductibilité et par un taux de mortalité important chez le rat (Greenamyre et al., 2010).

C. Intoxication au paraquat

Le paraquat (N,N'-diméthyl-4-4-4'-bypiridinium) est un herbicide très largement utilisé en agriculture à travers le monde. Il est capable de provoquer une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNpc et la formation de corps de Lewy chez le rat et la souris (McCormack et al., 2002 ; Cicchetti et al., 2005). Contrairement au MPTP et à la roténone, le paraquat ne peut pas traverser la BHE, il emprunte le système de transport des acides aminés neutres pour pénétrer dans le cerveau (Shimizu et al., 2001). Bien qu'il partage une analogie de structure avec le métabolite MPP⁺ (il emprunte également le DAT pour pénétrer dans les neurones dopaminergiques), son mécanisme d'action ne passe pas par une inhibition du complexe I de la chaine respiratoire mitochondriale. En effet, la toxicité du paraquat est médiée par la production d'ERO *via* des cycles d'oxydo-réduction (Le et al., 2014). Cependant, l'utilisation de ce modèle montre des résultats contradictoires avec une grande variabilité dans la perte des neurones dopaminergiques notamment au niveau du striatum (Miller, 2007), amenant certains auteurs à remettre en question la spécificité du paraquat.

D. Les modèles basés sur l'administration de dérivés de l'amphétamine

Certaines substances dérivées de l'amphétamine comme la méthamphétamine sont capables d'induire des effets toxiques envers les neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée. En effet, plusieurs études chez différentes espèces animales rapportent une toxicité dopaminergique suite à une administration de méthamphétamine (Howard et al., 2011 ; Morrow et al., 2011 ; Ares-Santos et al., 2014). Au niveau des neurones dopaminergiques, la méthamphétamine provoque une redistribution de la dopamine depuis les vésicules synaptiques vers le cytosol en interagissant avec le VMAT2 mais également avec le DAT (Jagmag et al., 2015). Cette redistribution va induire une augmentation de l'auto-oxydation et de l'oxydation enzymatique de la dopamine, générant ainsi un stress oxydatif important (Thrash et al., 2009). Le 3,4-méthylènedioxy-N-méthylamphétamine (MDMA), un autre dérivé de l'amphétamine, est également capable d'induire une perte des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée. En effet, il a été montré chez la souris que l'administration répétée de MDMA produit une dégénérescence des neurones dopaminergiques dans le striatum ainsi qu'une perte des cellules TH positives dans la SNpc (Granado et al., 2008a ; 2008b). Cependant, aucun modèle animal basé sur l'administration de ces substances n'a encore été développé à ce jour.

L'administration de lipopolysaccharide bactérien (LPS) est également utilisée pour étudier la MP chez l'animal (voir chapitre V).

Les différents modes d'action des neurotoxines utilisées pour modéliser la MP sont résumés dans la Figure 10.



Figure 10. Représentation schématique des mécanismes d'action des différentes neurotoxines autres que la 6-OHDA utilisées pour modéliser la MP chez l'animal (adapté de Zeng et al., 2018). Abréviations : 6-OHDA (6hydroxydopamine), MP (maladie de Parkinson), BHE (barrière hémato-encéphalique), MAO-B (monoamine oxydase B), DAT (transporteur de la dopamine), MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,4,6-tétrahydropyridine), MPP⁺ (1-méthyl-4-phénylpyridinium).

3- Modèle d'intoxication à la 6-OHDA

A. Généralités

La 6-OHDA est un analogue hydroxylé de la dopamine qui a été isolé pour la première fois en 1959 par Senoh et Witkop. Les premiers effets biologiques ont été rapportés par Porter et al. (1963). Ils ont montré qu'une injection intra-péritonéale de 6-OHDA chez la souris est capable d'induire une déplétion en noradrénaline au niveau des terminaisons nerveuses sympathiques cardiaques. Quelques années plus tard, Ungerstedt (1968) a montré que l'administration intracérébrale par voie stéréotaxique de 6-OHDA chez le rat induit une dégénérescence sélective des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée, générant ainsi le premier modèle d'étude pour la MP encore très largement utilisé aujourd'hui. Plusieurs espèces animales sont sensibles à la 6-OHDA incluant le rat, la souris, le chat, le chien et le primate non-humain (Beal, 2001). Cependant, le rat reste l'espèce la plus utilisée dans ce modèle.

Le rat lésé à la 6-OHDA présente une dégénérescence sélective des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée et des altérations motrices typiques de la MP pouvant être évaluées par différents tests comportementaux. Il peut également développer des dyskinésies en réponse à un traitement à la L-DOPA comme dans la maladie humaine. En effet, il a été montré que des administrations répétées de L-DOPA induisent l'apparition de dyskinésies chez les rats lésés à la 6-OHDA. Ces dyskinésies se manifestent au niveau de la patte avant controlatérale, du tronc et de la musculature orofaciale (Tronci et Francardo, 2018). Cependant, le rat lésé à la 6-OHDA ne développe pas de corps de Lewy comme pour le modèle d'intoxication au MPTP (Tieu, 2011).

B. Effets neurotoxiques de la 6-OHDA

La 6-OHDA possède une analogie de structure avec les catécholamines endogènes lui permettant de pénétrer sélectivement dans les neurones dopaminergiques et noradrénergiques en empruntant le DAT et le transporteur de la noradrénaline respectivement (Simola et al., 2007). Afin de cibler spécifiquement les neurones dopaminergiques, la 6-OHDA peut être injectée après un pré-traitement avec de la désipramine, un inhibiteur de la recapture de la noradrénaline.

Les effets neurotoxiques de la 6-OHDA sont médiés par l'induction d'un important stress oxydatif et par une action directe sur les fonctions mitochondriales (Figure 11). En effet, la 6-OHDA peut s'auto-oxyder au niveau extra- ou intra-cellulaire ou subir une oxydation par voie enzymatique par les MAO, générant ainsi des ERO (principalement du peroxyde d'hydrogène) (Blum et al., 2001). Une fois produites, les ERO vont s'attaquer aux composants cellulaires tels que les phospholipides membranaires (peroxydation lipidique) et l'ADN. Au niveau de la mitochondrie, la 6-OHDA va inhiber le complexe I et le complexe IV de la chaîne de transport des électrons, provoquer un découplage de la phosphorylation oxydative et diminuer le potentiel membranaire mitochondrial (Zeng et al., 2018), entrainant une déplétion en ATP. Les différents effets neurotoxiques de la 6-OHDA vont conduire à la mort des neurones dopaminergiques par apoptose. Ces effets peuvent être prolongés par l'injection d'un inhibiteur de MAO (pargyline par exemple) pour éviter son oxydation enzymatique.



Figure 11. Représentation schématique des effets neurotoxiques de la 6-OHDA (adapté de Blum et al., 2001). Abréviations : 6-OHDA (6-hydroxydopamine), MAO (monoamine oxydase), DAT (transporteur de la dopamine), NAT (transporteur de la noradrénaline).

C. Les différents modèles d'intoxication à la 6-OHDA

La 6-OHDA est une molécule à caractère hydrophile et ne peut donc pas traverser la BHE. De ce fait, elle doit être directement injectée dans le cerveau par voie stéréotaxique. L'injection de la toxine s'effectue généralement de manière unilatérale. En effet, les injections bilatérales de 6-OHDA provoquent un fort taux de mortalité chez les animaux et induisent des aphagies (impossibilité de déglutir) et des adipsies (absence anormale de la sensation de soif), nécessitant l'apport de nombreux soins intensifs (Blandini et al., 2008). De plus, l'injection unilatérale de 6-OHDA présente deux avantages majeurs : 1) avoir un hémisphère intact pouvant être comparé à l'hémisphère lésé et 2) présenter un déficit sensori-moteur très largement utilisé dans l'élaboration de tests comportementaux permettant d'étudier les conséquences fonctionnelles de la lésion et/ou d'une stratégie neuroprotectrice ou réparatrice. Bien qu'il existe plusieurs tests comportementaux associés à ce modèle, le test de rotation est le plus utilisé. Il permet d'évaluer le comportement rotatoire des animaux lésés unilatéralement suite à l'administration de drogues psychostimulantes comme l'amphétamine ou l'apomorphine. Cependant, le sens de rotation sui côté lésé (rotations ipsilatérales)

alors que l'apomorphine provoque des rotations du côté opposé à la lésion (rotations controlatérales). L'amphétamine agit comme un stimulateur pré-synaptique, favorisant ainsi la libération de dopamine à partir des terminaisons striatales. Ceci génère donc un déséquilibre en dopamine favorisant le système nigro-strié du côté non-lésé à l'origine des rotations ipsilatérales (Meredith et Kang, 2006). A l'inverse, l'apomorphine induit une stimulation des récepteurs D2 post-synaptiques qui sont régulés à la hausse en compensation à la dénervation du striatum côté lésé, générant ainsi des rotations controlatérales (Carey, 1990). Le test de rotation en réponse aux drogues psychostimulantes permet d'apprécier indirectement le succès de la lésion dopaminergique à la 6-OHDA : un rat non lésé ne présente pas de comportement rotatoire suite à l'administration d'amphétamine ou d'apomorphine. L'apparition du comportement rotatoire dépend de la nature de la drogue administrée et du taux de perte des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée. En effet, les rotations controlatérales en réponse à l'apomorphine apparaissent pour une perte neuronale égale ou supérieure à 90% alors que les rotations ipsilatérales en réponse à l'amphétamine se manifestent pour une perte d'au moins 50% (Hefti et al., 1980 ; Hudson et al., 1993). Le test de rotation en réponse à l'administration d'amphétamine est donc très bien adapté pour des modèles de lésion partielle à la 6-OHDA.

Classiquement, la 6-OHDA peut être injectée dans trois structures cibles : le faisceau médian du télencéphale (FMT), la SNpc et le striatum (Figure 12). La 6-OHDA peut également être injectée au niveau intraventriculaire mais ce modèle est très peu utilisé.



Figure 12. Représentation schématique des différentes localisations d'injection de la 6-OHDA chez le rat. Abréviation : 6-OHDA (6-hydroxydopamine).

Injection de la 6-OHDA dans le FMT

L'injection unilatérale de la 6-OHDA dans le FMT est un modèle très largement utilisé. Ce type d'injection peut provoquer (selon la dose utilisée et le site d'injection) une destruction totale des neurones des groupes A9 et A10 induisant une perte totale de dopamine dans le striatum ipsilatéral (Perese et al., 1989), donc peu sélectif des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée. Ce type d'injection provoque également une hypersensibilité des récepteurs dopaminergiques post-synaptiques au niveau du striatum ipsilatéral après la perte d'au moins 90% des neurones dopaminergiques dans la SNpc. Cependant, ce phénomène n'existe pas à plus faible intensité de lésion car il est compensé par une augmentation de la synthèse de dopamine par les cellules résiduelles de la SNpc (Kowall et al., 2000) ou par augmentation de la quantité de dopamine endogène dans le striatum. Les animaux lésés unilatéralement à la 6-OHDA dans le FMT présentent un comportement rotatoire suite à l'administration de drogues pyschostimulantes comme l'apomorphine. Cependant, l'apparition de ce comportement dépend de l'intensité de la lésion. En effet, les animaux présentant une lésion quasi-totale des neurones dopaminergiques (99%) vont présenter un comportement rotatoire en réponse à l'administration d'apomorphine. A l'inverse, les animaux présentant une lésion partielle des

neurones dopaminergiques (75%) ne présenteront pas de rotations controlatérales en réponse à la drogue (Barnéoud et al., 1995).

Injection dans la SNpc

Comparé au FMT, l'injection de la 6-OHDA dans la SNpc permet d'obtenir un modèle plus sélectif et plus spécifique de destruction des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée. Bien que l'intensité de la lésion dépend de la dose utilisée, ce type d'injection est généralement caractérisé par la perte de près de 90% des neurones dopaminergiques de la SNpc. La 6-OHDA peut être injectée dans plusieurs zones de la SNpc. Il a notamment été montré qu'une injection dans la zone latérale induit une perte neuronale plus importante qu'une injection dans la zone médiane de la SNpc (Carman et al., 1991 ; Dentresangle et al., 2001). Ce profil de lésion est notamment en accord avec la pathologie humaine où la perte des neurones dopaminergiques est préférentiellement localisée dans la zone latérale de la SNpc.

En conclusion, les modèles basés sur l'injection de la 6-OHDA dans le FMT et la SNpc génèrent une dégénérescence massive (> 90%) et rapide (2 à 3 jours) des neurones dopaminergiques (Blandini et Armentero, 2012 ; Gubellini et Kachidian, 2015). Ils permettent en autre d'étudier les stades tardifs de la MP (Glajch et al., 2012) et sont donc peu adaptés à l'évaluation de stratégies thérapeutiques nécessitant une administration dans les stades précoces.

• Injection dans le striatum

L'injection intrastriatale de 6-OHDA est un modèle hautement sélectif et spécifique de destruction des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée décrit pour la première fois dans les 1990. Contrairement aux modèles d'injection dans le FMT et la SNpc, la lésion des neurones dopaminergiques est dite rétrograde : l'injection de la 6-OHDA provoque une dégénérescence des terminaisons des neurones dopaminergiques au niveau du striatum amenant à une perte des corps cellulaires de ces mêmes neurones dans la SNpc (Sauer et Oertel, 1994 ; Przedborski et al., 1995). Dans ce type de modèle, la perte neuronale est modérée et environ 50 à 70% des neurones dopaminergiques dégénèrent de manière progressive. En effet, l'injection de 6-OHDA dans le striatum provoque une dégénérescence des terminaisons des neurones dopaminergiques dans les premiers jours, suivie par une perte des corps cellulaires dans les premiers jours, suivie par une perte des corps cellulaires dans les premiers jours, suivie par une perte des corps cellulaires dans les premiers jours, suivie par une perte des corps cellulaires dans les premiers jours, suivie par une perte des corps cellulaires dans la SNpc atteignant un niveau stable à partir de deux semaines après

l'injection (Duty et Jenner, 2011).

Bien que le striatum soit une structure très volumineuse avec plusieurs territoires d'innervation, deux zones sont particulièrement ciblées pour injecter la 6-OHDA : la région ventro-latérale (équivalant au putamen chez l'Homme) et la région dorso-médiane (équivalant au noyau caudé chez l'Homme). Une injection de la 6-OHDA dans la région ventro-latérale a des effets sur la locomotion et sur le comportement rotatoire en réponse aux drogues psycho-stimulantes alors que l'injection dans la région dorso-médiane induit des troubles dans l'initiation du mouvement, dans l'orientation sensori-motrice et dans le comportement moteur fin (Hernandez-Baltazar et al., 2017). En considérant que la déplétion dopaminergique est très marquée dans le putamen chez l'Homme (Kish et al., 1988), l'injection de la 6-OHDA dans la région dorso-médiane se rapproche donc le plus de la pathologie humaine.

En considérant que la lésion des neurones dopaminergiques est partielle, progressive et qu'elle permet de mimer les stades précoces de la MP (Kirik et al., 1998 ; Deumens et al., 2002), ce modèle est très bien adapté pour l'évaluation de différentes stratégies thérapeutiques. Cependant, plusieurs limitations ont été rapportées concernant l'utilisation de ce modèle (Penttinen et al., 2016) :

- L'administration de fortes doses produit des lésions quasi-totales et des dommages neuronaux non-spécifiques.
- La 6-OHDA peut diffuser dans le ventricule latéral ou remonter le long de l'aiguille lors de l'injection, produisant ainsi des lésions de faible intensité.
- La lésion partielle des neurones dopaminergiques peut être spontanément compensée par plusieurs mécanismes comme une augmentation de la libération de la dopamine par les neurones épargnés.

Toutes ces considérations amènent à revoir les différentes modalités d'injection de la 6-OHDA dans le striatum afin d'obtenir un modèle stable, reproductible et fiable dans l'exploitation des données expérimentales.

V- Neuroinflammation et maladie de Parkinson

1- Généralités

A. Le système immunitaire et l'inflammation

Le système immunitaire est l'une des grandes fonctions de l'organisme. Il permet le maintien de la cohésion cellulaire et tissulaire, l'élimination des constituants altérés et la défense contre les substances étrangères ou les agents infectieux. Le système immunitaire est composé d'un ensemble de molécules en solution dans les liquides biologiques (immunité humorale), et par différents types cellulaires communiquant entre eux par des médiateurs (solubles ou membranaires). Il existe deux types d'immunité :

- l'immunité inée ou immunité naturelle : elle est commune aux organismes pluricellulaires, aux végétaux et aux animaux. Elle est mise en jeu immédiatement après une agression extérieure. Elle est basée sur la reconnaissance de motifs communs à un grand nombre de microorganismes pathogènes (*PAMP* pour *pathogen associated molecular patterns*) et fait intervenir plusieurs types cellulaires dont les polynucléaires (éosinophiles, basophiles et neutrophiles) et les monocytes/macrophages.
- L'immunité adaptative ou spécifique : elle est uniquement présente chez les vertébrés. Les cellules impliquées dans ce type d'immunité sont les lymphocytes (T et B). Contrairement à l'immunité inée, l'immunité adaptative est plus spécifique et elle est caractérisé par la propriété de mémoire : elle permet une élimination plus rapide et plus efficace de l'agent infectieux lors de nouvelles expositions.

L'inflammation est une réaction du système immunitaire face à des agressions externes de nature infectieuse, physique, chimique ou métabolique. Elle est ubiquitaire et fait intervenir l'immunité inée et l'immunité adaptative. De manière synthétique, l'inflammation se traduit par une augmentation de la perméabilité de la paroi des vaisseaux sanguins permettant le passage de leucocytes vers le site inflammatoire (diapédèse), et par une libération importante de différents médiateurs par les cellules immunitaires incluant des cytokines pro-

inflammatoires, des cytokines anti-inflammatoires, des substances vasodilatatrices et des chimiokines.

L'inflammation est une réaction naturelle de défense contre des agressions extérieures, elle est donc utile pour l'organisme. Cependant, elle peut s'installer de façon chronique et induire ainsi d'importants dégâts cellulaires et tissulaires.

B. La neuroinflammation

Il a été longtemps pensé que le SNC, dont les capacités de renouvellement tissulaire sont très limitées, est un site immuno-privilégié notamment en raison de la présence de la BHE (Renaud et al., 2015). En effet, la BHE sépare anatomiquement le parenchyme cérébral de la circulation sanguine et contrôle drastiquement les échanges entre ces deux compartiments : elle empêche la pénétration de la grande majorité des composés et des cellules circulants. Cependant, l'accumulation de données expérimentales montre bel et bien l'existence d'une inflammation au niveau central qualifiée de neuroinflammation. Bien qu'elle partage un language moléculaire commun avec l'inflammation dite « périphérique », la neuroinflammation est médiée par des cellules propres au tissu cérébral : les cellules gliales (également appelées cellules de la névroglie). Elles assurent un rôle de nutrition, de soutien et de protection vis-à-vis des neurones. La neuroinflammation est majoritairement représentée par l'activation de deux types de cellules gliales : les cellules microgliales et les astrocytes.

Les cellules microgliales

Les cellules microgliales ont été pour la première fois mises en évidence en 1919 par Del Rio Hortega. Elles sont parfois nommées « cellules d'Hortega » dans certains ouvrages. Les cellules microgliales représentent environ 10% de l'ensemble des cellules gliales et sont qualifiés de « macrophages résidents du SNC ». L'origine des cellules microgliales diffère de celle des macrophages au cours du développement. En effet, des travaux chez la souris ont montré que les cellules microgliales ont une origine extra-embryonnaire (Ginhoux et al., 2010) : contrairement aux macrophages dérivant de l'hématopoïèse définitive qui a lieu dans le foie foetal à partir du 10^{me} jour de la vie intra-utérine (E10) et dans la moelle osseuse à partir de la naissance et pour toute la vie, les cellules microgliales dérivent uniquement de l'hématopoïèse primitive (elle a lieu dans le sac vitellin entre E8 et E12). Les cellules microgliales produites dans le sac vitellin viennent envahir le neuroépithélium lors des stades précoces du développement bien avant l'hématopoïèse définitive (Legendre et Le Corronc, 2014). L'origine extra-embryonnaire confère aux cellules microgliales des caractéristiques propres : elles possèdent une longue durée de vie et elles sont capables d'auto-renouvellement car non remplacées par des cellules dérivant de la moelle osseuse (Saijo et Glass, 2011 ; Prinz et al., 2014). Malgré cette différence, les cellules microgliales comme les macrophages nécessitent les mêmes facteurs de prolifération et de différenciation et partagent les mêmes récepteurs de surface comme l'intégrine CD11b.

Les cellules microgliales représentent les cellules sentinelles du tissu cérébral : ce sont les premières cellules activées en cas d'agression. L'activation microgliale se traduit par des changements morphologiques (Kreutzberg, 1996) : la cellule microgliale en condition physiologique (microglie quiescente) présente un petit corps cellulaire associé à de longs prolongements cytoplasmiques fins alors que la cellule microgliale activée possède un corps cellulaire plus volumineux avec des prolongements cytoplasmiques plus courts et plus ramifiées. L'activation microgliale se traduit également par des modifications d'expression de certaines protéines membranaires (CD11b notamment), la capacité à se mouvoir, à phagocyter des débris cellulaires, à proliférer (phénomène appelé la microgliose) et à libérer des facteurs pro- et anti-inflammatoires (Audinat et Arnoux, 2014). Cette dernière caractéristique amène au fait que les cellules microgliales sont capables d'adopter différents phénotypes en fonction de leur environnement cellulaire et moléculaire. Ce concept a d'abord été décrit pour les macrophages puis étendu aux cellules microgliales. Mills et al. (2000) ont évoqué l'existence de deux phénotypes selon le type de réponse médiée par les lymphocytes T : le phénotype M1 qui est associé aux lymphocytes Th1 libérant de l'interféron-gamma (IFN-γ) et le phénotype M2 qui est associé aux lymphocytes Th2 sécrétant de l'interleukine-4 et 10 (IL-4 et IL-10). Classiquement, le phénotype M1 (phénotype classique ou pro-inflammatoire) est induit par une exposition à l'IFN-y, au LPS ou à des cytokines pro-inflammatoires comme le tumor necrosis factor-alpha (TNF-a) et est caractérisé par le production de cytokines proinflammatoires, d'ERO et d'espèces réactives de l'azote. Le phénotype M2 (phénotype alternatif ou anti-inflammatoire) est quant à lui induit par une exposition à l'IL-4, l'IL-13, l'IL-10, aux glucocorticoides ou à des complexes immuns et caractérisé par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires dont l'IL-10 et de facteurs de croissance comme l'IGF-1 (insulin growth factor-1) (Figure 13) (Gordon et Martinez, 2010; Wang et al., 2014; Orihuela et al., 2016). Il est à noter que le phénotype M2 est lui-même subdivisé en quatre sous-phénotypes : M2a, M2b, M2c et M2d. Les cellules microgliales ont donc la capacité de se polariser en phénotype M1 ou M2 selon la nature des stimuli environnementaux et il s'agit d'un processus dynamique : les cellules polarisées en phénotype M1 sont capables de « switcher » vers le phénotype M2 et inversement (Jha et al., 2016).



Figure 13. Représentation schématique de la polarisation des cellules microgliales. Abréviations : LPS (lipopolysaccharide bactérien), IFN- γ (interféron-gamma), IL-4 (interleukine-4), IL-13 (interleukine-13), IL-10 (interleukine-10), TNF- α (tumor necrosis factor-alpha), ERO (espèces réactives de l'oxygène), ERN (espèce réactives de l'azote), IGF-1 (insulin-like Growth Factor-1).

Les astrocytes

D'origine neuro-ectodermique, les astrocytes représentent près de 70% de l'ensemble des cellules gliales. Leur nom provient directement de leur forme étoilée décrite pour la première fois par Otto Dieters en 1865. Les astrocytes assurent de nombreuses fonctions au sein du SNC : ils participent à la formation de la BHE et jouent un rôle clé déterminant dans l'homéostasie du glutamate afin d'éviter sa toxicité (Parpura et Verkhratsky, 2012).

Outre ces fonctions, les astrocytes interviennent dans la neuroinflammation se traduisant par une astrogliose. Les caractéristiques principales de l'astrogliose sont une hypertrophie cellulaire, une prolifération des astrocytes et une augmentation de l'expression d'un filament intermédiaire spécifique des astrocytes, la GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) (Sofroniew,

2014). De plus, les astrocytes activés libèrent de nombreux facteurs incluant des cytokines pro- et anti-inflammatoires, des facteurs de croissance (dont des facteurs neurotrophiques indispensables aux neurones) et des chimiokines (favorisant entre autre l'attraction et l'activation des cellules microgliales). En retour, les astrocytes activés reçoivent de nombreux signaux de la part des cellules microgliales mais également de la part des neurones (Sofroniew et Vinters, 2010 ; Sofroniew, 2014). De par ses relations étroites avec les cellules microgliales et sa capacité à sécréter des facteurs pro- et anti-inflammatoires, les astrocytes jouent un rôle clé dans le contrôle de l'environnement des neurones.

2- Neuroinflammation et maladie de Parkinson

A. Neuroinflammation et dégénérescence des neurones dopaminergiques

Il est très largement reconnu que la neuroinflammation joue un rôle majeur dans la perte des neurones dopaminergiques caractéristique de la MP. Elle est caractérisée par des réactions gliales majoritairement représentées par l'activation des cellules microgliales et des astrocytes. Bien que la perte de ces neurones concerne à la fois le striatum et la SNpc, les réactions gliales sont plus marquées dans la SNpc. En effet, la SNpc est quasi-exclusivement composée des corps cellulaires des neurones dopaminergiques alors que les terminaisons de ces neurones représentent moins de 15% de l'ensemble des terminaisons nerveuses striatales. De plus, la SNpc est une région cérébrale caractérisée par une forte densité de cellules microgliales (Teismann et al., 2003).

La processus neurodégénératif résulte d'un dialogue moléculaire complexe entre les cellules microgliales, les astrocytes et les neurones dopaminergiques suivant un « cercle vicieux » (Saijo et Glass, 2011 ; Collins et al., 2012 ; Wang et al., 2015) (Figure 14). En effet, l'activation des cellules microgliales en réponse à divers stimuli comme l'exposition à des facteurs environnementaux induit la libération d'une pléiade de molécules pro-inflammatoires comme des cytokines (TNF- α , ...) et des ERO aggravant le processus neurodégénératif. En retour, la dégénérescence des neurones dopaminergiques provoque la libération de facteurs favorisant l'activation microgliale, les DAMPs (*damage-associated molecular pattern*). Parmi ces facteurs, on retrouve l'ATP qui en se fixant sur les récepteurs purinergiques des cellules microgliales favorise l'activation de celles-ci. Les facteurs inflammatoires libérés par l'activation des cellules microgliales vont également contribuer à l'activation des astrocytes

qui vont à leur tour produire des facteurs pro-inflammatoires favorisant le processus neurodégénératif. Enfin, ces mêmes facteurs vont modifier la perméabilité de la BHE, induisant ainsi une pénétration de cellules de l'immunité adaptative comme les lymphocytes (Vivekanantham et al., 2015).



Figure 14. Représentation schématique des différents mécanismes inflammatoires impliqués dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la MP (adapté de Wang et al., 2015). Abréviations : MP (maladie de Parkinson), ERO (espèces réactives de l'oxygène), TNF- α (tumor necrosis factor-alpha), DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns), BHE (barrière hémato-encéphalique).

L'activation des cellules microgliales occupe donc un rôle central dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques. Il est notamment décrit que l'activation de ces cellules est un événement précoce dans de nombreuses pathologies cérébrales y compris les maladies neurodégénératives comme la MP (Kraft et Harry, 2011). En effet, dans les modèles animaux, l'activation microgliale et la libération de facteurs inflammatoires se manifeste dans les 24 heures suivant la dégénérescence neuronale, suivi par une infiltration lymphocytaire dans les 48 heures et par une activation astrocytaire importante dans les 72 heures (Barcia, 2013). Bien que ces activations soient transitoires avec un retour vers des valeurs basales, elles deviennent

chroniques dans les pathologies neurodégénératives. Concernant l'étude des phénotypes microgliaux, ils différent suivant le stade d'évolution de la maladie. Dans la MP mais également dans la MA et la Sclérose Latérale Amyotrophique, le phénotype M2 antiinflammatoire (réduction des processus pro-inflammatoires et maintien de l'homéostasie tissulaire) prédomine au stade d'apparition de la maladie alors que le phénotype M1 proinflammatoire prédomine au cours de la progression vers des stades tardifs (Tang et Le, 2016). En effet, l'accumulation chronique de signaux comme l' α -synucléine mutée, le peptide A β et la protéine SOD1 mutée induit l'apparition du phénotype M1 (Tang et Le, 2016).

B. Données chez l'Homme et chez l'animal

Les liens entre la neuroinflammation et le processus neurodégénératif dans la MP ont été mis en évidence grâce à de nombreuses études menées à la fois chez l'Homme et dans des modèles animaux. A partir des années 1980, de nombreux travaux ont permis de prouver l'existence d'une neuroinflammation dans le cerveau de patients atteints de la MP. Il a notamment été décrit *post-mortem* une activation microgliale ainsi qu'une augmentation des taux de facteurs inflammatoires incluant des cytokines (TNF- α ,...) et des chimiokines (CXCL12) dans la SN et le putamen de patients parkinsoniens (McGeer et al., 1988 ; Boka et al., 1994 ; Mogi et al., 1994 ; Banati et al., 1998 ; Knott et al., 2000 ; Imamura et al., 2003 ; Shimoji et al., 2009 ; Garcia-Esparcia et al., 2014). Par ailleurs, une augmentation des taux circulants de cytokines pro-inflammatoires a également été rapportée dans le liquide céphalorachidien de patients atteints de la MP (Mogi et al., 1996 ; Blum-Degen et al., 1995 ; Vawter et al., 1996).

Le développement des techniques d'imagerie médicale a permis de visualiser directement *in vivo* la neuroinflammation chez le patient parkinsonien. La tomographie par émission de positrons (TEP) permet de reconstituer des images en trois dimensions du corps à partir d'éléments radioactifs préalablement injectés au patient et émetteurs de positons comme le Fluor 18 (¹⁸F) et le Carbone 11 (¹¹C). La TEP a permis notamment de mettre en évidence une activation microgliale grâce à la quantification de la protéine translocatrice 18 kDa (TSPO). La TSPO (initialement décrite comme un récepteur périphérique aux benzodiazépines) est une protéine associée à la membrane externe mitochondriale et exprimée notamment dans les cellules microgliales. En condition physiologique, la TSPO est peu exprimée mais elle devient fortement surexprimée lors de l'activation microgliale (Venneti et al., 2006 ; Liu et al., 2014),

représentant ainsi un marqueur sensible de ce processus. Le [¹¹C]PK11195 est un radioligand très utilisé pour imager l'activation microgliale *in vivo* (Gerhard, 2016). Plusieurs études ont montré en utilisant ce radioligand une activation microgliale dans plusieurs régions cérébrales incluant les structures de la voie dopaminergique nigro-striée impliquée dans la MP (Ouchi et al., 2005 ; Gerhard et al., 2006 ; Edison et al., 2013 ; Iannaconne et al., 2013).

Différents modèles animaux de la MP, génétiques comme toxiques, présentent des processus neuro-inflammatoires (pour revue Cebrián et al., 2015). Dans ce cadre, le modèle LPS est un bon exemple du lien existant entre la neuroinflammation et la dégénérescence des neurones dopaminergiques. Le LPS est une endotoxine de la membrane externe des bactéries Gram négatif (Escherichia coli), considéré comme un activateur très efficace de la réponse inflammatoire. En culture, les neurones dopaminergiques sont deux fois plus sensibles au LPS que les neurones non-dopaminergiques et cette toxicité est médiée par une activation des cellules microgliales (Bronstein et al., 1995; Gayle et al., 2002). Ces résultats ont par la suite été confirmés chez le rongeur. En effet, il a été montré que l'injection intra-nigrale de LPS induit une dégénérescence des neurones dopaminergiques et une activation des cellules microgliales et des astrocytes (Castaño et al., 1998 ; Herrera et al., 2000 ; Gao et al., 2002 ; Arai et al., 2004 ; Iravani et al., 2005). Il a également été montré que l'administration intrastriatale, intra-pallidale, intra-nasale ou systémique de LPS induit une perte progressive des neurones dopaminergiques au niveau de la SN (Zhang et al., 2005 ; Qin et al., 2007 ; Hunter et al., 2009 ; He et al., 2013). De plus, il existe également un modèle de sensibilisation des neurones dopaminergiques suite à une exposition au LPS in utero chez le rat. En effet, l'administration de LPS au stade pré-natal est capable d'induire une perte des neurones dopaminergiques au niveau de la SN chez les nouveaux nés (Ling et al., 2002) et les neurones dopaminergiques de ces animaux présentent une sensibilité plus importante suite à l'exposition à des neurotoxines comme la 6-OHDA (Ling et al., 2004). En tant qu'initiateur de la réponse inflammatoire, le LPS est donc capable d'induire une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SN, illustrant ainsi le lien existant entre la neuroinflammation et la perte des neurones dopaminergiques dans la MP.

- 3- La voie cholinergique anti-inflammatoire : une stratégie thérapeutique prometteuse
- A. Mise en évidence de la voie cholinergique anti-inflammatoire

La voie cholinergique anti-inflammatoire (VCAI) a été mise en évidence à partir des années 2000 par l'équipe de Kévin J. Tracey aux Etats-Unis. A l'origine, ce mécanisme a été décrit au niveau périphérique et fait intervenir les propriétés anti-inflammatoires des efférences vagales. En effet, cette équipe américaine a montré chez le rat que la stimulation électrique du nerf vague réduit la réponse inflammatoire périphérique induite par une injection intraveineuse de LPS (Borovikova et al., 2000 ; Bernik et al., 2002). Cette stimulation électrique induit notamment une réduction des taux de TNF-a au niveau hépatique, cardiaque et circulatoire. Cette même équipe a également montré que cet effet anti-inflammatoire est médié par la libération d'acétylcholine agissant sur un sous-type de récepteurs nicotiniques (nAChRs) exprimés par les macrophages, les récepteurs nicotiniques alpha 7 (nAChR-α7) (Wang et al., 2003). Ces données ont permis de décrire de façon globale la VCAI (Pavlov et al., 2003) (Figure 15) : l'administration périphérique de LPS stimule l'activation des macrophages et la production de cytokines pro-inflammatoires, stimulant ainsi les afférences vagales. En retour, les efférences vagales induisent la libération d'acétylcholine qui, en se fixant sur les nAChR-a7, va inhiber la libération de cytokines pro-inflammatoires dont le TNF-α.


Figure 15. Représentation schématique la voie cholinergique anti-inflammatoire (adapté de Pavlov et al., 2003). Abréviations : LPS (lipopolysaccharide bactérien) ; TNF- α (tumor necrosis factor-alpha) ; nAChR- α 7 (récepteurs nicotiniques alpha 7).

Ce mécanisme a par la suite été décrit au niveau central. En 2004, Shytle et al. (Shytle et al., 2004) ont rapporté qu'un pré-traitement avec de l'acétylcholine et de la nicotine (agonistes des nAChR- α 7) réduit la libération de TNF- α par les cellules microgliales murines suite à une exposition au LPS. La VCAI est donc un processus permettant de réduire les réponses inflammatoires à la fois au niveau périphérique et central avec pour éléments centraux les nAChR- α 7.

B. Les récepteurs nicotiniques alpha 7

Les nAChR- α 7 appartiennent à la famille des récepteurs à l'acétylcholine incluant les récepteurs muscariniques et les nAChRs. Ce sont des canaux homomériques constitués par l'assemblage de cinq sous-unités α , chacune d'entre elles étant composée par quatre passages transmembranaires (Figure 16A). Bien qu'il a été longtemps considéré que les nAChR- α 7 sont exclusivement présents sous forme d'homomères, les sous-unités α 7 peuvent également former des hétéromères avec des sous-unités α 5, β 2, β 3 et β 4 (Zoli et al., 2015). Au niveau

périphérique, les nAChR-a7 sont exprimés par diverses cellules immunitaires incluant les cellules dendritiques, les macrophages, les lymphocytes T et B mais sont également exprimés par d'autres types cellulaires comme les cellules de l'endothélium vasculaire, les kératinocytes et les adipocytes. Au niveau central, ces récepteurs sont présents sur les neurones mais également sur les cellules gliales comme les cellules microgliales et les astrocytes (Kalkman et Feuerbach, 2016). Les nAChR-α7 sont notamment, avec les récepteurs $\alpha 4\beta 2$, les sous-types les plus répandus dans le SNC chez les mammifères (Millar et Gotti, 2009). Les nAChR-α7 sont retrouvés dans de nombreuses régions cérébrales mais avec des profils d'expression différents : ils sont fortement exprimés au niveau des colliculi, de l'hippocampe et du cortex et plus faiblement exprimés dans les structures des ganglions de la base incluant le striatum et la SN (Posadas et al., 2013 ; Quik et al., 2015). Concernant les propriétés des nAChR-a7, ce sont des canaux cationiques non sélectifs perméables aux ions Nat et fortement perméables aux ions Ca2t. De plus, ce sont des canaux possédant une désensibilisation très rapide (de l'ordre de quelques millisecondes) en présence d'une forte présence d'agoniste (Bertrand et al., 2015), réduisant ainsi les dommages cellulaires engendrés par des entrées massives de calcium.

La stimulation des nAChR-α7 induit l'activation de cascades moléculaires aboutissant à des effets anti-inflammatoires et anti-oxydants (pour revue Egea et al., 2015) (Figure 16B). Deux grandes voies de signalisation ont été décrites :

 La première voie de signalisation est Jak2/STAT3 dépendante. Elle conduit à l'inhibition de la translocation nucléaire du facteur de transcription NF-κB, empêchant ainsi la transcription de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires et des ERO.

La deuxième voie de signalisation est Jak2/PI3K/Akt dépendante. Elle conduit à l'inhibition de la protéine kinase GSK-3β, activant ainsi la translocation nucléaire du facteur de transcription Nrf2 et la transcription de gènes codant pour plusieurs protéines anti-oxydantes dont l'hème oxygènase-1 ou HO-1.



Figure 16. Les nAChR- α 7. (A) Représentation schématique de la structure des nAChR- α 7 (d'après Quik et al., 2015). (B) Représentation schématique des voies de signalisation associées à l'activation des nAChR- α 7 (adapté de Egea et al., 2015). Abréviations : nAChR- α 7 (récepteurs nicotiniques alpha 7), HO-1 (hème oxygénase-1), ERO (espèces réactives de l'oxygène).

C. La stimulation des récepteurs nicotiniques alpha 7 dans le traitement de la maladie de Parkinson

Du fait qu'il existe une relation inverse entre le tabagisme et l'incidence de la MP, il a été proposé que les composants du tabac comme la nicotine pourraient avoir des effets bénéfiques. Par la suite, il a été montré que la nicotine exerce des effets neuroprotecteurs dans des modèles d'étude pré-cliniques (Quik et al., 2007 ; Quik et al., 2012), suggérant ainsi que les nAChRs pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de la MP. En considérant que la neuroinflammation joue un rôle majeur dans le processus neurodégénératif et que les nAChR- α 7 possèdent des propriétés anti-inflammatoires, plusieurs stratégies neuroprotectrices visant à stimuler ces récepteurs se sont développées dans le but de réduire les processus inflammatoires et prévenir la perte des neurones dopaminergiques. Dans cette optique, les études se sont tournées vers l'utilisation d'agonistes des nAChR- α 7 capables de se lier et d'activer spécifiquement ces récepteurs. Parmi ces agonistes, le CNI-1493 (semapimod), le PNU-282987, le DMXBA (ou GTS-21) et l'ABT-107, ont montré une réduction des réactions gliales et une protection partielle des neurones dopaminergiques dans les modèles MPTP et 6-OHDA (Noelker et al., 2013 ; Stuckenholz et al., 2013 ; Suzuki et al.,

2013 ; Bordia et al., 2015). Notre équipe a récemment montré dans le modèle 6-OHDA chez le rat que l'administration du PHA543613, un agoniste des nAChR- α 7, induit une protection partielle des terminaisons striatales des neurones dopaminergiques associée à une réduction de l'activation microgliale (Sérrière et al., 2015).

Outre leurs effets bénéfiques sur les processus inflammatoires, certains agonistes des nAChRα7 ont également été utilisés dans le cadre du traitement des dyskinésies. En effet, Zhang et al. (2014 ; 2015) ont récemment montré que l'ABT-107 et l'ABT-126 sont capables de réduire les dyskinésies induites par un traitement à la L-DOPA chez le singe intoxiqué au MPTP. Des effets similaires ont également été rapporté avec un autre agoniste, l'AQW051 (Di Paolo et al., 2014), suggérant que ce type de stratégie thérapeutique peut être appliquée aux grands mammifères et donc potentiellement chez l'Homme. L'AQW051 a notamment fait l'objet d'un essai clinique mais les résultats obtenus n'ont pas montré de réduction significative des dyskinésies (Trenkwalder et al., 2016).

D. Interaction des récepteurs nicotiniques alpha 7 avec d'autres types de récepteurs (exemple des récepteurs sigma-1)

Outre les nAChR- α 7, plusieurs types de récepteurs ont suscité de l'intérêt dans le traitement de la MP comme les récepteurs sigma. Originellement décrit comme un sous-type de récepteurs aux opiacés dans les années 1970, ces récepteurs constituent une classe unique de récepteurs intracellulaires. Il en existe deux sous-types : les récepteurs sigma-1 (σ 1R) et les récepteurs sigma-2. Ces derniers restent encore peu décrits à l'heure actuelle. Les σ 1R sont constitués de deux domaines transmembranaires et sont localisées sur la membrane du réticulum endoplasmique. Ils peuvent également être retrouvés sur la membrane nucléaire, la membrane mitochondriale et la membrane plasmique (Nguyen et al., 2015). Ce sont des récepteurs présentant une distribution relativement ubiquitaire avec une expression périphérique (foie, coeur, système gastro-intestinal, rate, reins) et centrale. A ce niveau, ils sont exprimés par les neurones mais également par des cellules gliales comme les cellules microgliales et les astrocytes (Ruscher et Wieloch, 2015). Au sein du SNC, les σ 1R sont retrouvés au niveau de plusieurs structures cérébrales incluant l'hippocampe, l'hypothalamus, les bulbes olfactifs, le locus cœruleus et la SNpc (Cobos et al., 2008).

Comme pour les nAChR- α 7, la stimulation pharmacologique des σ 1R peut induire à la fois des effets anti-inflammatoires et neuroprotecteurs. En effet, l'administration d'agonistes de

ces récepteurs a montré une réduction des réactions gliales et des processus neurodégénératifs dans différents modèles animaux (Ajmo et al., 2006 ; Penas et al., 2011 ; Mancuso et al., 2012 ; Peviani et al., 2014 ; Ono et al., 2014 ; Dong et al., 2016). Dans le cadre de la MP, un seul agoniste des σ 1R a été testé pour le moment, il s'agit du PRE-084. Cet agoniste a été étudié dans le modèle d'intoxication à la 6-OHDA chez la souris (Francardo et al., 2014). Les résultats obtenus ont montré des effets bénéfiques intéressants incluant une protection partielle des neurones dopaminergiques associée à une augmentation des facteurs neurotrophiques dont le GDNF et une réduction de l'activation des cellules microgliales. De plus, ces effets sont abolis chez la souris lésée à la 6-OHDA et traitée au PRE-084 mais invalidée pour le gène codant pour les σ 1R (Francardo et al., 2014). Cependant, ces résultats prometteurs devront être confrontés à d'autres données.

L'existence d'une interaction entre les nAChR- α 7 et les σ 1R n'a été suggéré que récemment. Il a été pour la première fois évoqué dans le modèle d'injection intraventriculaire du peptide $A\beta_{25-35}$ chez la souris, modèle d'étude pour la MA (Yang et al., 2012). Ces auteurs ont montré que l'administration de la prégnénolone sulfate (PREGS) atténue la mort des cellules pyramidales hippocampiques suite à l'injection du peptide Aβ₂₅₋₃₅. Ils ont également montré que cette effet est mimé par l'administration d'un agoniste des o1R (PRE-084) ou des nAChR- α 7 (DMXBA) et au contraire aboli en présence d'un antagoniste des σ 1R (NE-100) ou des nAChR-α7 (méthyllycaconitine ou MLA). En considérant que le PREGS peut activer directement à la fois les σ 1R et les nAChR- α 7, les auteurs ont conclu que les effets neuroprotecteurs du PREGS dépendent d'une possible interaction entre ces deux récepteurs. L'existence de cette interaction a par la suite été confirmée dans le même modèle animal (Maurice, 2016). Dans cette étude, suite à l'injection du peptide, le PRE-084 exerce des effets neuroprotecteurs seul ou en combinaison avec le donépézil, un inhibiteur de l'acétylcholine estérase (enzyme intervenant dans la dégradation de l'acétylcholine). De plus, l'analyse pharmacologique de cette combinaison a révélé un effet synergique impliquant à la fois les σ 1R et les nAChR- α 7, confirmant ainsi une interaction entre ces deux récepteurs.

L'ensemble de ces résultats ont donc permis de mettre en évidence une interaction neuroprotectrice entre les σ 1R et les nAChR- α 7 dans un modèle d'étude de la MA. Ainsi, l'utilisation en combinaison d'agonistes ciblant ces deux types de récepteurs pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique dans le traitement d'autres maladies

neurodégénératives comme la MP. Cependant, à notre connaissance, ce type de stratégie n'a pas été étudié.

VI- Objectifs de la thèse

Les stratégies thérapeutiques actuellement mises en place (administration orale de lévodopa,...) sont symptomatiques et ne permettent pas de ralentir le progression de la MP. De ce fait, il y a un besoin urgent de développer de nouvelles approches visant à réduire voire stopper la perte des neurones dopaminergiques nigro-striataux. Dans ce contexte, le développement et la caractérisation des modèles animaux sont des outils fondamentaux pour l'amélioration de nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans le processus neurodégénératif et dans l'évaluation de stratégies thérapeutiques.

Parmi les mécanismes impliqués dans le processus neurodégénératif, la neuroinflammation y joue un rôle majeur puisqu'elle intervient de façon précoce *via* l'activation de cellules gliales incluant la microglie et les astrocytes. Ces activations aboutissent à une liberation importante de médiateurs pro-inflammatoires et cytotoxiques, aggravant ainsi la perte neuronale. Dans ce contexte, l'élaboration de stratégies visant à réduire ces processus neuroinflammatoires constitue donc une alternative thérapeutique de choix dans le traitement de la MP.

Ainsi, l'ensemble de ce travail de thèse a consisté à mettre au point et à caractériser un modèle de lésion partielle à la 6-OHDA chez le rat afin d'évaluer par la suite les effets d'une stratégie neuroprotectrice. Ce travail a été décomposé et présenté en trois grands volets :

• Etude 1 : cette première étude a concerné la mise au point et la caractérisation d'un modèle de lésion partielle à la 6-OHDA. L'injection intrastriatale de 6-OHDA est caractérisée par une dégénérescence partielle, progressive et rétrograde des neurones dopaminergiques nigro-striataux mimant les stades précoces de la maladie, permettant ainsi l'évaluation de stratégies thérapeutiques. Toutefois, la stabilité et la reproductibilité de ce type de lésion dépend de plusieurs facteurs expérimentaux incluant la dose totale de 6-OHDA injectée, le nombre de points d'injection et leurs coordonnées. En se basant sur les données de la littérature, nous avons réalisé la mise au point et la caractérisation d'un modèle où la neurotoxine a été délivrée en trois points du striatum droit afin de produire une lésion partielle stable et reproductible des neurones dopaminergiques nigro-striataux. Le processus neurodégénératif et la

neuroinflammation ont été étudiés en utilisant plusieurs approches expérimentales incluant du comportement, de l'imagerie TEP et des analyses sur coupes par autoradiographie et par immunofluorescence. Dans le but d'explorer plus précisement le modèle, des analyses métabolomiques ont également été réalisées. Ce modèle a été utilisé par la suite dans les études 2 et 3.

- Etude 2 : cette deuxième étude s'est focalisée sur l'analyse *in vivo* du profil d'expression des nAChR-α7 dans le modèle de lésion partielle développé. L'activation de ces récepteurs induit des effets anti-inflammatoires et neuroprotecteurs dans divers modèles animaux incluant des modèles de MP, suggérant que les nAChR-α7 pourrraient constituer une cible thérapeutique de choix dans l'atténuation des processus neurodégénératifs et neuroinflammatoires caractéristiques de la maladie. Bien que la répartition cérébrale de ces récepteurs soit connue en condition physiologique, il n'en n'était rien en contexte pathologique en particulier dans les stades précoces de la MP. Dans ce contexte, l'expression des nAChR-α7 a été évaluée *in vivo* par imagerie TEP dans les structures clés de la voie nigro-striée (striatum et SN) à différents temps après administration de la neurotoxine. En considérant que ces récepteurs sont exprimés à la fois par les neurons, les cellules microgliales et les astrocytes, l'activation des cellules gliales au niveau striatal et nigral a également été évaluée par des analyses par immunofluorescence sur coupes.
- Etude 3 : cette troisième étude a consisté à évaluer les effets d'une stratégie neuroprotectrice basée sur l'utilisation en combinaison d'un agoniste des nAChR-α7 et d'un agoniste des σ1R. En effet, il avait été montré dans la littérature dans un modèle animal de MA que l'interaction spécifique entre ces deux récepteurs exerçait des effets neuroprotecteurs. De ce fait, l'utilisation en combinaison d'agonistes ciblant spécifiquement les nAChR-α7 et les σ1R pourrait constituer une nouvelle approche neuroprotectrice dans le traitement des maladies neurodégénératives incluant la MP. De plus, ce type de combinaison n'avait jamais été évalué dans le modèle de lésion partielle à la 6-OHDA. Cette étude s'est focalisée sur l'utilisation en combinaison du PHA543613 (agoniste des nAChR-α7) et du PRE-084 (agoniste des σ1R), deux agonistes sélectifs ayant montré indépendamment des effets neuroprotecteurs et anti-inflammatoires dans un modèle de lésion partielle à la 6-OHDA. Les effets du

traitement ont été étudiés au niveau comportemental mais également sur la dégénérescence des neurones dopaminergiques nigro-striataux et sur la neuroinflammation *via* des analyses sur coupes par autoradiographie et par immunofluorescence.

Deuxième partie Matériel et méthodes

I- Animaux et procédures expérimentales

1- Animaux

Toutes les procédures expérimentales ont été réalisées en accord avec la Directive Européenne 2010/63/EU relative à l'expérimentation animale et ont été validées par le Comité Régional d'Ethique (Autorisation N°00434.02). Toutes les expérimentations ont été réalisées chez des rats Wistar mâles adultes provenant du centre d'élevage Charles River basé en France. Les animaux sont hébergés au laboratoire au nombre de deux par cage dans un environnement contrôlé en température $(21 \pm 1^{\circ}C)$ et en hygrométrie ($55 \pm 5\%$) avec un cycle nychtéméral d'alternance lumière / obscurité de 12 heures et de l'eau et de la nourriture *ad libitum*. Avant le début des expérimentations, les animaux sont acclimatés pendant une semaine afin qu'ils puissent s'adapter à leur nouvel environnement. Au moment de la lésion à la 6-OHDA, les animaux pèsent entre 275 et 300 grammes.

2- Procédures expérimentales

Les protocoles expérimentaux des **études 1, 2 et 3** sont respectivement représentés dans les Figures 17, 18 et 19 (pages suivantes).



Figure 17. Protocole de l'étude 1. Les animaux ont été lésés à la 6-OHDA dans le striatum droit et le test des rotations induites par l'administration d'amphétamine a été réalisé 13 jours post-lésion (jpl) (n = 22). A 14 jpl, les animaux ont été séparés en deux groupes pour différents types d'analyses expérimentales. Pour le premier groupe (n = 8), les animaux ont été imagés en TEP avec le [18 F]LBT-999. Les animaux ont ensuite été mis à mort et les cerveaux ont été prélevés pour effectuer des analyses métabolomiques. Pour le deuxième groupe (n = 14), les animaux ont été mis à mort et les cerveaux ont été mis à mort et les cerveaux ont été prélevés et coupés pour effectuer des analyses autoradiographiques et par immunofluorescence. Abréviations : 6-OHDA (6-hydroxydopamine), jpl (jours post-lésion), TEP (tomographie par émission de positrons).



Figure 18. Protocole de l'étude 2. Les animaux ont été lésés à la 6-OHDA dans le striatum droit et les nAChR- α 7 ont été imagés en TEP avec le [¹⁸F]ASEM successivement à 3, 7 et 14 jpl (n = 8). Le test des rotations induites par l'administration d'amphétamine a été réalisé à 13 jpl. A 14 jpl après la dernière session d'imagerie TEP, les animaux ont été mis à mort et les cerveaux ont été prélevés et coupés pour effectuer des analyses autoradiographiques et par immunofluorescence. Abréviations : 6-OHDA (6-hydroxydopamine), nAChR- α 7 (récepteurs nicotiniques alpha 7), TEP (tomographie par émission de positrons), jpl (jours post-lésion).



Figure 19. Protocole de l'étude 3. Les animaux ont été lésés à la 6-OHDA dans le striatum droit (n = 14) et ont été quotidiennement administrés avec le PHA543613 (6 mg/kg/jour, voie orale) et le PRE-084 (1mg/kg/jour, voie intra-péritonéale) (n = 7) ou administrés avec le véhicule (n = 7) pendant 14 jours. Le test des rotations induites par l'administration d'amphétamine a été réalisé à 13 jpl (n = 14). A 14 jpl après le dernier traitement, les animaux ont été mis à mort et les cerveaux ont été prélevés et coupés pour effectuer des analyses autoradiographiques et par immunofluorescence (n = 14). Abréviations : 6-OHDA (6-hydroxydopamine), jpl (jours post-lésion).

II- Lésion à la 6-OHDA

Le protocole de lesion à la 6-OHDA a été utilisé pour les études 1, 2 et 3. Vingt minutes avant la chirurgie, les animaux sont injectés en intra-péritonéal avec de la pargyline hydrochloride (50 mg/kg, Abcam, Paris, France). Cette injection permet de prolonger l'effet neurotoxique de la 6-OHDA en empêchant son oxydation par les MAO. Les animaux sont ensuite anesthésiés avec de l'isoflurane (4%, 500 mL/min, Baxter, France) et placés sur l'appareil de stéréotaxie (Stoelting, Phymep, Paris, France) avec une barre d'incisive réglée à -3,3 mm. Pendant toute la durée de la chirurgie, les animaux sont anesthésiés avec de l'isoflurane à 2,5%, la température corporelle est maintenue aux alentours des 37°C et contrôlée à l'aide d'une sonde rectale. Après avoir tondu et incisé la peau du crâne, la boite crânienne est percée pour les différentes injections de la neurotoxine. La lésion est obtenue par une injection intrastriatale de 6-OHDA hydrochloride (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Pour cela, 12 µg de 6-OHDA ont été administrés unilatéralement en trois points dans le striatum droit (2 mg/mL dans un tampon phosphate contenant de l'acide ascorbique à 0,01%, pH 4,5, 4 µg dans 2 µL pour chaque site d'injection) à l'aide d'une seringue Hamilton Gastight de 25 µL (Hamilton, Massy, France) montée d'une aiguille de calibre 30 gauges (Phymep, Paris, France). Chaque point d'injection est caractérisée par trois coordonnées stéréotaxiques calculées à partir du point bregma (point 0, point d'intersection entre la suture coronale et la suture sagittale) : la coordonnée dans l'axe rostro-caudal (AP), la coordonnée dans l'axe médio-latéral (L) et la coordonnée dans l'axe dorso-ventral (P). Les coordonnées stéréotaxiques utilisées ont été reprises de l'étude de Pentinnen et al. (2016) (Figure 20 page suivante) selon l'atlas du cerveau de rat de Paxinos et Watson (2009) :

- Point d'injection 1 : AP1 = +1,6 mm, L1 = -2,8 mm, P1 = -6 mm
- Point d'injection 2 : AP2 = 0.0 mm, L2 = -4.1 mm, P2 = -5.5 mm
- Point d'injection 3 : AP3 = -1,2 mm, L3 = -4,5 mm, P3 = -5,5 mm

La solution de 6-OHDA est injectée avec un débit de $0,5 \mu$ L/min. Après chaque injection, la seringue est laissée en place pendant 5 minutes puis retirée lentement pour éviter la remontée de la solution le long de l'aiguille. La brèche osseuse est obturée avec de la cire à os

(Bonewax[®]) et la plaie est nettoyée et suturée avec du fil chirurgical. Une fois l'intervention terminée, l'animal reçoit une injection sous-cutanée de buprénorphine (buprécare[®], 0,05 mg/kg) pour la gestion de la douleur post-opératoire. L'animal est placé dans sa cage et surveillé quotidiennement.



Figure 20. Coordonnées stéréotaxiques d'injection de la 6-OHDA dans le striatum droit (délimité par le trait rouge) chez le rat selon l'Atlas du cerveau de rat de Paxinos et Watson (2009). Abréviation : 6-OHDA (6-hydroxydopamine).

III- Traitement avec les agonistes et test des rotations induites par l'administration d'amphétamine

1- Traitement avec les agonistes

Les traitements avec les agonistes ont été realisés dans le cadre de l'étude 3. Ils ont été réalisés avec un agoniste des nAChR- α 7, le PHA543613 (ICOA : Institut de Chimie Organique et Analytique, Orléans, France) et un agoniste des σ 1R, le PRE-084 (Tocris Biosciences, Lille, France). Les deux agonistes sont dilués dans de l'eau pour préparation injectable et conservés à -20°C avant leur utilisation. Le PHA543613 est administré par voie orale à raison de 6 mg/kg/jour pendant toute la durée du traitement. Le PRE-084, quant à lui, est injecté par voie intra-péritonéale à la dose de 1 mg/kg/jour pendant toute la durée du traitement.

2- Test des rotations induites par l'administration d'amphétamine

Ce test comportemental a été realisé pour les **études 1, 2 et 3**. Les animaux reçoivent une injection intra-péritonéale de d-amphétamine sulfate (3 mg/kg, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) diluée dans une solution de NaCl à 0,9%. Ils sont ensuite placés dans des enceintes circulaires automatisées (Imetronic, Pessac, France) permettant de mesurer le nombre de rotations effectuées dans le sens ipsilatéral pendant un temps défini. L'enregistrement démarre 15 minutes après administration de la drogue et le nombre de rotations ipsilatérales est comptabilisé pendant 2 heures.

IV- Imagerie TEP

1- Principe général

La TEP permet de reconstituer des images en trois dimensions du corps à partir d'éléments radioactifs préalablement injectés au sujet et émetteurs de positons comme le Fluor 18 (¹⁸F) et le Carbone 11 (¹¹C). Le principe de l'imagerie TEP repose sur une réaction d'annihilation entre un positon et un électron. En effet, de manière simplifiée, le positon émis par le radioélément va effectuer un court trajet dans la matière avant d'interagir avec un électron. Cette réaction entraine la production de deux photons dans des directions diamétralement opposées. Ces photons sont alors capturés par les détecteurs des anneaux de la caméra TEP entourant le sujet. Ces captures vont permettre ainsi de reconstruire une image en trois dimensions. La TEP est une technique d'imagerie appliquée également chez l'animal et chez le petit animal comme le rongeur, on parle dans ce cas de micro-TEP. Aujourd'hui, la TEP et la micro-TEP bénéficient de la multimodalité par le couplage avec un scanner (tomodensitométrie ou TDM) utilisant des rayons X. Ce scanner améliore la localisation de la fixation du radiotraceur utilisé et corrige l'atténuation des photons dans les tissus, permettant ainsi d'obtenir une meilleure sensibilité et une meilleure spécificité de l'image.

A. Préparation des radiotraceurs

La préparation des radiotraceurs a été réalisé au Centre d'Etudes et de Recherches sur les RadioPharmaceutiques (CERRP) de Tours.

Le [¹⁸F]LBT-999 a été utilisé dans le cadre de l'**étude 1** et a été préparé selon la méthode décrite par Sérrière et al. (2014). La radiotraceur a été obtenu avec une pureté radiochimique supérieure à 98 % et une activité spécifique comprise entre 30 et 190 GBq/µmol. Le [¹⁸F]ASEM, quant à lui, a été utilisé dans le cadre de l'**étude 2** et sa radiosynthèse a été

adaptée à partir de la méthode décrite par Gao et al. (2013b). Elle a été réalisée à l'aide d'un module FWFN[®] (GE Healthare, Upsalla, Suède). Les cartouches QMA et Sep-Pak[®] light C18 ont été fournies par Waters (Milford, MA, Etats-Unis). Les étapes de purifications par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) ont été réalisées à l'aide d'une colonne Zorbax Eclipse XDB-C18 9,4 x 250 mm, 5 µm(Agilent*, Santa Clara, CA, Etats-Unis). Le contrôle de la qualité a été effectué à l'aide d'un système Ultimate 3000 HPLC (Thermo, Waltam, MA, Etats-Unis) équipé d'un détecteur à longueurs d'onde variable et d'un radiodétecteur B-FC-4100 (Bioscan, Oxnard, CA, Etats-Unis) utilisant Zorbax Eclipse XDB-C18 4,6x150 mm 5µ. Le [¹⁸F] a été envoyé dans l'automate, piégé sur la cartouche QMA, puis l'élution du [¹⁸F] a été effectuée avec une solution de K₂CO₃/K_{2.2.2}. La solution a été séchée dans le réacteur sous atmosphère azéotrope en utilisant deux fois 1 mL de MeCN. Après séchage du complexe de [18F]-fluorure, du 3-(1,4-Diazabicyclo[3.2.2.2]nonan-4-yl]-6nitrodibenzo [b,d]-thiophène 5,5-Dioxyde a été ajouté comme précurseur (2 mg dissous dans 0,8 mL de DMSO). La solution a été ensuite chauffée à 160°C pendant 12 minutes, puis refroidie à température ambiante et diluée avec 2 mL d'eau et 1 mL d'acétonitrile. La solution a été chargée sur la boucle puis purifiée sur la colonne semi-préparative en utilisant du triéthylamine 0,2% / acétonitrile (60/40) comme phase mobile à 4 mL/min. La fraction recueillie a été diluée dans 30 mL d'eau et piégée dans une cartouche légère t-C18. L'élution de la cartouche a été effectuée avec 0,5 mL d'éthanol et la formulation a été complétée par l'ajout de 4,5 mL de NaCl à 0,9%. Le traceur a été obtenu avec un rendement radiochimique d'environ 35 %, avec une pureté radiochimique supérieure à 95 % et une activité spécifique de $33,5 \pm 5,32$ GBq/µmol.

B. Biodistribution ex vivo cérébrale du [18F]ASEM

Avant de réaliser des acquisitions TEP avec le [¹⁸F]ASEM chez le rat lésé à la 6-OHDA, une biodistribution *ex vivo* dans le cerveau du rat sain a été réalisée. Pour cela, les animaux ont été séparés en deux groupes expérimentaux (groupe contrôle, n = 6; groupe MLA, n = 7). Tous les animaux sont injectés en intraveineuse dans la veine du pénis avec 0,3 mL de [¹⁸F]ASEM (2,20 ± 0,13 MBq) sous anesthésie à l'isoflurane. Les animaux appartenant au groupe contrôle reçoivent uniquement le radiotraceur alors que les animaux appartenant au groupe MLA reçoivent en intraveineuse 1 mg/kg de MLA (Tocris Biosciences, Lille, France) 15 minutes

avant l'injection du [¹⁸F]ASEM. Tous les animaux sont ensuite mis à mort par étourdissement et décapitation une heure après l'injection du radiotraceur. Le cerveau est soigneusement extrait de la boîte crânienne et six régions sont disséquées : l'hippocampe, les colliculi, le cortex préfrontal, le thalamus, le striatum et le cervelet (CE). Les échantillons sont pesés dans des tubes tarés et la radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur gamma (2480 Gamma counter Wizard, Perkin Elmer, Etats-Unis, avec une efficacité de comptage de 48% pour le [¹⁸F]). L'accumulation du [¹⁸F]ASEM est calculée par le pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu (%DI/g) par comparaison avec les échantillons aux dilutions standards de la solution injectée. En utilisant le CE comme région de référence (accumulation très faible du radiotraceur et aucune différence après pré-injection de MLA), le ratio du %DI/g ([%DI/g]r) a été utilisé comme critère quantitatif dans cette étude.

C. Acquisitions et traitements des images TEP

Pour les deux radiotraceurs utilisés, l'acquisition et le traitement des images TEP ont été effectués avec un système micro-TEP/TDM SuperArgus* (Sedecal, Madrid, Espagne) et le logiciel PMOD (version 3.403, PMOD Technologies, Zurich, Suisse) respectivement, selon la méthode décrite par Sérrière et al. (2014). Brièvement, les animaux sont anesthésiés à l'isoflurane (4%, 500 mL/min, Baxter, France) et un cathéter est implanté dans la veine de la queue pour l'injection du radiotraceur. Ils sont ensuite placés dans le lit chauffant du micro-TEP et une TDM de 5 minutes est effectuée pour la correction de l'atténuation des photons. Ensuite, le [¹⁸F]LBT-999 ou le [¹⁸F]ASEM (dilution dans une solution de NaCl à 0,9%) a été injecté dans la veine de la queue du rat anesthésié à raison de 37 MBq pour 300 g de poids corporel et les images sont enregistrées pendant 51 minutes pour le [¹⁸F]LBT-999 et pendant 61 minutes pour le [¹⁸F]ASEM. L'anesthésie est abaissée à 2,5% et la température et la fréquence respiratoire de l'acquisition des images.

Les images TEP sont ensuite reconstruites et analysées à l'aide du logiciel PMOD. Dans l'analyse des images, trois régions d'intérêt ont été utilisées pour le [¹⁸F]LBT-999 : le striatum controlatéral (STC), le striatum ipsilatéral (STI) et le CE. Pour le [¹⁸F]ASEM, ces trois régions ont été également utilisées en plus de la SN controlatérale (SNC) et de la SN ipsilatérale (SNI). Pour chaque région analysée, la fixation du radiotraceur est caractérisée par

la valeur de fixation normalisée (*SUV* pour standard uptake value) correspondant à la fixation du radiotraceur normalisée par la dose injectée à l'animal et rapportée à la masse de l'animal. En utilisant le CE comme région de référence, le ratio de la valeur de fixation normalisée (*SUVr* pour standard uptake value ratio) a été utilisé comme critère quantitatif dans ces études.

V- Métabolomique

Les analyses métabolomiques ont été réalisées dans le cadre de l'étude 1.

1- Principe général

La métabolomique appartient aux techniques dites « omiques » regroupant la génomique, la transcriptomique et la protéomique. Elle correspond à l'analyse du métabolome faisant référence à tous les métabolites contenus dans un organisme, un type cellulaire ou un fluide biologique comme les urines ou le sang. Les métabolites sont des molécules organiques ayant un poids moléculaire inférieure à 1,5 kDa pouvant être d'origine endogène ou exogène (production par des micro-organismes). Chaque métabolite est relié à une ou plusieurs voies métaboliques intervenant dans différents types de métabolisme (métabolisme énergétique, métabolisme lipidique,...). De manière simplifiée, l'analyse métabolomique est décomposée en trois grandes parties : 1) la préparation des échantillons, 2) l'analyse des échantillons (par spectrométrie par résonance magnétique nucléaire ou par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie gazeuse ou liquide) et 3) le traitement statistiques des données. L'analyse peut se faire soit de façon ciblée (les métabolites détectés et quantifiés sont connus grâce à l'utilisation d'une banque de données) soit de façon non ciblée (tous les métabolites de l'échantillon connus ou non sont détectés et quantifiés).

2- Préparation des échantillons

Les animaux sont mis à mort par étourdissement et décapitation et les cerveaux sont délicatement extraits de la boîte crânienne. Quatre régions sont ensuite disséquées : le STI, le STC, la SNC et la SNI. La préparation des échantillons pour les analyses métabolomiques a été effectuée selon la méthode décrite par Diémé et al. (2017). Brièvement, les échantillons sont pesées dans des tubes tarés et sont lyophilisés pendant 48 heures dans un lyophilisateur FreeZone 4.5 Liter Benchtop Freeze Dry System[®] (Labconco, Kansas City, Etats-Unis). La

lyophilisation permet d'évaporer toute l'eau contenue dans les échantillons à analyser (passage du tissu frais au tissu sec). Après cette étape, les échantillons lyophilisés sont broyés jusqu'à obtention d'une poudre très fine (à partir de 40 mg de tissu frais en moyenne pour le striatum et de 6 mg en moyenne pour la SN, environ 10 mg et 1 mg de poudre sont obtenus respectivement pour les deux structures après lyophilisation et broyage). Les échantillons sont ensuite extraits deux fois dans un mélange acétonitrile/eau ultra pure (1,5 mL, 1/1). Après centrifugation, les surnageants sont récupérés et évaporés à l'aide d'un sytème SpeedVac[®] (Thermo Scientific, Etats-Unis). Les résidus secs sont conservés à -80°C avant l'analyse par Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse Haute Résolution (CL-SMHR). Il est à noter que pour les étapes d'extraction, seulement 3 mg de matière sèche est utilisée pour le striatum alors que la totalité de la matière sèche est utilisée pour la SN.

3- Analyse par CL-SMHR

Les résidus secs sont reconstitués dans un mélange méthanol/eau ultra pure (150 µL, 1/1). L'analyse par CL-SMHR a été effectuée selon la méthode décrite par Diémé et al. (2017). Brièvement, les analyses ont été réalisées avec un système Ultimate 3000 HPLC (Dionex) couplé à un spectromètre de masse Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific, Allemagne) avec pour source d'ionisation un électronébuliseur. La chromatographie a été réalisée avec une colonne Kinetex[®] 1,7 µm XB - C18 (150 mm x 2,10 mm) avec une porosité de 100 Å (Phenomenex, Etats-Unis). Le système de solvant utilisé comprend une phase mobile A [0,1 % (vol/vol) d'acide formique dans de l'eau] et une phase mobile B [0,1% (vol/vol) d'acide formique dans du méthanol]. Le gradient a été opéré avec un débit d'écoulement de 0,4 mL/min pendant une durée de 30 minutes. Afin de vérifier la stabilité du système et ainsi valider l'analyse des échantillons, 20 contrôles qualités (CQ) (obtenus en mélangeant un volume égal de tous les échantillons) ont été préparés puis injectés de façon répétée (tous les 10 échantillons) du début à la fin de l'analyse. La qualité des données a été vérifiée sur la base des résultats obtenus pour les CQ par analyse en composantes principales.

4- Traitement ciblé des données

Dans cette étude, les analyses métabolomiques ont été effectuées de manière ciblée, c'est-àdire que les métabolites détectés et quantifiés dans les échantillons sont connus grâce à l'utilisation d'une banque de donnée. Ces analyses ont été effectuées selon la méthode décrite par Madji Hounoum et al. (2017). Brièvement, une bibliothèque de composés standards (Mass Spectroscopy Metabolite Library of standards MS ML[®], IROA technologies) a été analysée avec le même gradient de phases mobiles et dans les mêmes conditions que celles utilisées pour analyser les échantillons. L'identité de chaque métabolite détecté a été validée par son temps de rétention et sa masse moléculaire. Les molécules ciblées ont été sélectionnées et intégrées à l'aide du logiciel Xcalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, Etats-Unis). Les données ont été normalisées par rapport à la masse de tissu sec. Les coefficients de variation (CV) pour les échantillons CQ ont ensuite été calculés. Pour les analyses statistiques, seuls les métabolites présentant une variabilité biologique élevée ont été sélectionnés ainsi que les métabolites présentant un CV < 30 % dans les CQ et un CV > 30 % dans le cas où la variabilité biologique (CV dans les échantillons) dépasse la variabilité analytique (CV dans les CQ).

VI- Analyses sur coupes

1- Prélèvement des cerveaux

Les animaux sont injectés en intra-péritonéal avec une surdose de pentobarbital sodique (60 mg/kg, Ceva Santé Animale, France) et perfusés de manière intracardiaque avec du sérum physiologique froid hépariné (250 mL pour chaque rat). La perfusion permet en autre d'éliminer le sang au niveau cérébral, limitant ainsi le bruit de fond lors des analyses expérimentales. Une fois perfusés, les cerveaux sont délicatement extraits de la boîte crânienne et congelés dans un mélange isopentane/carboglace à -35°C. Ils sont ensuite coupés en plusieurs sections coronales de 16 µm d'épaisseur à l'aide d'un cryostat à -20°C (CM3050S, Leica, Allemagne). Les coupes sont récupérées sur des lames préalablement gélatinées et ensuite conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

2- Autoradiographie sur coupes

A. Principe général

L'autoradiographie est une technique d'imagerie moléculaire basée sur la détection de particules émises par une molécule radioactive distribuée sur des coupes histologiques. La lecture de l'image peut se faire soit par révélation sur film photographique, soit par l'utilisation d'un radio-imageur comme le β -imageur. Contrairement aux films photographiques, les radio-imageurs possèdent plusieurs avantages incluant une acquisition avec visualisation en temps réel de l'image, une obtention rapide des résultats expérimentaux et une détection de plusieurs types de particules émises par la source radioactive (β - comme le ³H ou γ comme l'¹²⁵I) (Barthe, 2007).

B. Autoradiographie sur coupes du DAT avec le [¹²⁵I]PE2I et de la TSPO avec le [³H]DPA-714 et le [³H]PK-11195

Le [¹²⁵I]PE2I a été utilisé pour les **études 1, 2 et 3**. Il a été radiomarqué selon la méthode décrite par Chalon et al. (1999) et obtenu avec une activité spécifique de 95 TBq/mmol. Le [³H]DPA-714 a été utilisé dans le cadre de l'**étude 1**. Il a été radiomarqué selon la méthode décrite par Damont et al. (2015) et obtenu avec une activité spécifique de 2,1 TBq/mmol. Le [³H]PK-11195 à quant à lui été utilisé dans le cadre de l'**étude 3**. Il a été directement acheté sous forme radiomarquée chez le fournisseur Perkin Elmer (Norwalk, CT, Etats-Unis) avec une activité spécifique de 3,06 TBq/mmol.

Pour chaque radioligand et pour chaque animal, six coupes coronales consécutives ont été utilisées. Après décongélation, les coupes sont préalablement séchées à température ambiante pendant environ 3 heures. Elles sont ensuite incubées soit avec un tampon phosphate (pH 7,4) contenant le [125 I]PE2I à une concentration de 100 pM pendant 60 minutes, soit avec un tampon Tris-HCl (pH 7,4) contenant le [1 H]DPA-714 ou le [3 H]PK-11195 à une concentration de 1 nM pendant 90 minutes. Ces solutions d'incubation permettent d'étudier la fixation totale des radioligands (FT). La fixation non-spécifique des radioligands (FNS) est évaluée soit en présence de cocaïne chlorhydrate (Cooper Industries, Melun, France) à une concentration de 100 μ M pour le [125 I]PE2I, soit en présence de PK-11195 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) à une concentration de 1 μ M pour le [3 H]DPA-714 ou le [3 H]PK-11195. Les coupes sont ensuite rincées deux fois dans du tampon d'incubation froid à 4°C (tampon phosphate pour le [125 I]PE2I, tampon Tris-HCl pour le [3 H]DPA-714 ou le [3 H]PK-11195) sous agitation pendant 5 minutes puis brièvement rincées dans de l'eau froide ultra pure. Après ces différents rinçages, les coupes sont séchées à température ambiante pendant toute une nuit.

Le lendemain, les radiomarquages sont ensuite analysés à l'aide d'un β -imageur (β -imagerTM 2000, Biospace, Paris, France). Afin d'établir un contact électrique pour que les acquisitions des images fonctionnent, un ruban électrique métallique est appliquée au dos de chaque lame pour les rendre conductrices. Elles sont ensuite placées dans la chambre à gaz du β -imageur et les acquisitions sont enregistrées pendant 4 heures quelque soit le radioligand utilisé. Les acquisitions sont analysées à l'aide du logiciel M3 Vision (Biospace, Paris, France). Pour chaque coupe, deux régions anatomiques ont été définies manuellement en utilisant l'Atlas du

cerveau de rat de Paxinos et Watson (2009) : le STC et le STI. A l'aide du logiciel, le niveau de radioactivité fixée est directement déterminé en comptant le nombre de rayonnements γ pour le [¹²⁵I]PE2I ou le nombre de particules β pour le [³H]DPA-714 ou le [³H]PK-11195 émis dans les régions définies. Le signal de chaque radioligand dans chacune de ces régions est exprimé en nombre de coups par minute et par millimètre carré (cpm/mm²). La fixation spécifique (FS) du radioligand est déterminée en soustrayant la fixation non-spécifique de la fixation totale : FS = FT - FNS. Les différentes conditions relatives à l'utilisation de ces radioligands sont récapitulés dans la Tableau III ci-dessous.

Cible moléculaire	Transporteur de la dopamine (DAT)	Protéine translocatrice 18 kDa (TSPO)	Protéine translocatrice 18 kDa (TSPO)	
Radioligand	Radioligand [125I]PE2I		[³ H]PK-11195	
Concentration	100 pM	1 nM	1 nM	
Activité spécifique	95 TBq/mmol	2,1 TBq/mmol	3,06 TBq/mmol	
Solution tampon Tampon phosphate (pH 7,4)		Tampon Tris-HCl (pH 7,4)	Tampon Tris-HCl (pH 7,4)	
Temps d'incubation	Semps d'incubation 90 minutes		60 minutes	
Température d'incubation	empérature d'incubation Température ambiante (20°C)		Température ambiante (20°C)	
Molécule compétitrice our l'étude de la fixation non-spécifique Cocaïne chlorhydrate (100 μM)		PK-11195 (1 μM)	PK-11195 (1 μM)	

Tableau III. Conditions expérimentales relatives à l'utilisation des différents radioligands utilisés dans le cadre des études d'autoradiographie. Abréviations : DAT (transporteur de la dopamine), TSPO (protéine translocatrice 18 kDa).

3- Immunofluorescence sur coupes

A. Principe général

L'immunofluorescence est une technique d'immunomarquage utilisant spécifiquement des anticorps secondaires couplés à des fluorochromes (Figure 21). Ces derniers sont des substances chimiques qui, après excitation par un faisceau lumineux incident, sont capables d'émettre de la lumière de fluorescence. Chaque fluorochrome possède sa propre longueur d'onde d'excitation (généralement compris entre 400 et 800 nm, spectre du visible) et d'émission, nécessitant ainsi l'utilisation de filtres adaptés pour l'observation de cette lumière de fluorescence au microscope. L'immunofluorescence permet donc de révéler la présence d'une protéine cellulaire spécifique par émission de fluorescence.



Figure 21. Principe de l'immunofluorescence. L'anticorps reconnait et se fixe sur la cible moléculaire. L'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome reconnait et fixe à son tour l'anticorps primaire. L'exposition du fluorochrome à un faisceau lumineux incident induit l'émission d'une lumière de fluorescence par le fluorochrome.

B. Immunofluorescence de la TH, du CD11b et de la GFAP

Trois types d'immunomarquages ont été réalisées sur les coupes coronales de cerveau de rat : immunomarquage de la TH pour les neurones dopaminergiques dans la SN (étude 1, 2 et 3), du CD11b pour les cellules microgliales dans la SN (étude 1 et 3) et de la GFAP pour les astrocytes dans la SN et le striatum (étude 2 et 3).

Pour chaque immunomarquage et pour chaque animal, deux coupes coronales consécutives ont été utilisées. Après décongélation, les coupes sont préalablement séchées à température ambiante pendant 5 à 10 minutes et délimitée au Dakopen (feutre hydrophobe permettant de retenir les différentes solutions d'incubation sur les coupes). Elles sont ensuite post-fixées dans une solution de paraformaldéhyde ou PFA (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier,

France) à 4% sous agitation pendant 30 minutes puis rincées successivement dans trois bains de PBS à 0,1M pendant 5 minutes sous agitation. Après ces étapes de rinçage, les coupes sont incubées dans une solution de blocage et de perméabilisation pendant 3 heures à température ambiante (5% de sérum de chèvre et 0,3% de Triton 100X dans du PBS 0,1M). Les coupes sont ensuite incubées toute une nuit à 4°C avec une solution contenant les anticorps primaires : 1% de sérum de chèvre et 0,3% de Triton 100X dans du PBS à 0,1M avec des anticorps anti-TH (1/1000^{ème}, Abcam ab112, Paris, France) ou anti-CD11b (1/500^{ème}, Merck Millipore CBL1512, Saint-Quentin en Yvelines, France) ou anti-GFAP (1/1000^{ème}, DAKO Z0334, Les Ulis, France).

Le lendemain, les coupes sont rincées successivement dans deux bains de PBS à 0,1M pendant 5 minutes puis incubées pendant 1 heure à température ambiante avec une solution contenant les anticorps secondaires : 1% de sérum de chèvre et 0,3% de Triton 100X dans du PBS à 0,1M avec des anticorps Alexa Fluor[®] 555 (1/500^{ème}, Abcam ab150086, Paris, France) pour la TH et la GFAP ou avec des anticorps Alexa Fluor[®] 488 (1/500^{ème}, Abcam ab150113, Paris, France) pour le CD11b. Après deux rinçages successifs dans du PBS à 0,1M puis dans de l'eau ultra pure, les noyaux cellulaires sont contre-colorés au 4'-6-diamino-2-phenylindole ou DAPI (1/10000^{ème}, Sigma-Aldrich D9542, Saint-Quentin Fallavier, France) et les coupes sont montées entre lames et lamelles avec du milieu montage spécial pour fluorescence (Abcam Ab103746, Paris, France). Les lames sont séchées à température ambiante à l'abris de la lumière afin d'éviter l'excitation des fluorochromes couplées aux anticorps secondaires puis elles sont conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation. Toutes les étapes de rinçage et d'incubation (à l'exception des anticorps primaires) s'effectuent à température ambiante.

Les immunomarquages sont visualisés puis capturés à l'aide d'un microscope à fluorescence (Leica DM5500 B, Allemagne) muni d'une caméra ORCA-R2 (Hamamatsu Photonics, Massy, France). Les images sont ensuite analysées à l'aide du logiciel ImageJ. Pour l'analyse de l'immunomarquage de la TH, le nombre de cellules TH positives a été manuellement compté dans la SNC et la SNI en superposant l'image contenant le marquage anti-TH et l'image contenant le marquage des noyaux cellulaires au DAPI (merge). Pour l'analyse de la GFAP au niveau striatal, le pourcentage de l'aire occupée par la marquage dans l'image a été automatiquement mesuré dans le STC et STI. Concernant l'analyse de la GFAP et du CD11b dans la SN, une région a été manuellement définie avec le logiciel dans la STC et dans la STI et le pourcentage de l'aire occupée par le marquage dans ces deux régions a été

automatiquement mesuré. Les différentes caractéristiques des anticorps primaires et secondaires utilisés dans ces études sont récapitulées dans la Tableau IV ci-dessous.

Anticorps primaires		Anti-TH	Anti-CD11b		Anti-GFAP		Anti-P2X7R	
Référence du produit		Abcam 112	М	erck Millipore CBL1512	DAKO Z0334		Merck Millipore AB5246	
Isotype / espèce		IgG / Lapin	Į	gG2a / Souris	Non précisé / Lapin		No	on précisé / Lapin
Réactivi	activité Rat		Rat	Rat		Rat		
Facteur de dilution utilisé		1/1000ème		1/500 ^{ème}	1/1000ème		1/500 ^{ème}	
Anticorps secondaires		5	Alexa Fluor®5	a Fluor®555 Alexa Fluor®48		8		
	Référence du produit Isotype / espèce			Abcam ab150086 Abcam ab150		Abcam ab15011	13	
				IgG / Chèvr	hèvre IgG / Chèvre			
Réactivité		Lapin		Souris				
Facteur de dilution utilisé		1/500ème		1/500ème				

Tableau IV. Caractéristiques des anticorps primaires et secondaires utilisés dans le cadre des analyses en immunofluorescence. Abréviations : TH (tyrosine hydroxylase), GFAP (glial fibrillary acidic protein), P2X7R (récepteur P2X7).

C. Double immunomarquage CD11b/P2X7R

Le double marquage CD11b/P2X7R permet de visualiser les cellules microgliales orientées en phénotype M1 pro-inflammatoire. Il a été realisé dans le cadre de l'**étude 2** à la fois dans le striatum et la SN en utilisant deux coupes consécutives pour chaque animal. Le protocole est légèrement différent de celui utilisé pour l'immunomarquage de la TH, du CD11b et de la GFAP en terme d'étapes de rinçage et de temps d'incubation. Après avoir été délimité au Dakopen, les coupes sont post-fixées au PFA 4% pendant 15 minutes sous agitation puis rincées dans six bains successifs de 5 minutes sous agitation : un bain de PBS à 0,1M, un bain de NH4Cl à 0,05M, un bain de PBS à 0,1M, un bain de PBS à 0,1M. Une fois les rinçages terminés, les coupes sont incubées dans une solution de blocage et de perméabilisation

pendant 15 minutes (5% de sérum de veau fœtal et 0,5% de Tween 80 dans du PBS à 0,1M). Elles sont ensuite incubées dans une solution contenant les anticorps primaires : 5% de sérum de veau fœtal et 0,5% de Tween 80 dans du PBS à 0,1M avec des anticorps anti-CD11b (même référence et même facteur de dilution que dans la section B) et anti-P2X7R (1/500^{ème}, Merck Millipore AB5246, Saint-Quentin en Yvelines, France). Après trois rinçages dans du PBS 0,1M, les coupes sont incubées dans une solution contenant les anticorps secondaires : 5% de sérum de veau fœtal et 0,5% de Tween 80 dans du PBS à 0,1M avec des anticorps Alexa Fluor[®] 488 pour le CD11b et Alexa Fluor[®] 555 pour le P2X7R (mêmes références et mêmes facteurs de dilution que dans la section B). Toutes les étapes de rinçage et d'incubation sont effectuées à température ambiante à l'exception du mélange méthanol/acétone (-20°C). Les étapes qui suivent l'incubation des anticorps secondaires sont les mêmes que celles décrites dans la section B.

Pour l'analyse des résultats, le nombre total de cellules CD11b positives et le nombre de cellules CD11b/P2X7R positives ont été manuellement quantifiés dans le STC, le STI et dans la SNC et la SNI en superposant les images des trois marquages (CD11b, P2X7R et DAPI) afin d'établir la proportion de cellules orientée en phénotype M1 pro-inflammatoire.

VII- Traitement statistique des données

Toutes les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm erreur standard sur la moyenne (*SEM* pour standard error mean). Tous les traitements statistiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism^{*} (version 6).

Pour l'étude 1 et 2, la comparaison des valeurs entre le STC et le STI et entre la SNC et la SNI ont été réalisés avec le test non-paramétrique des rangs de Wilcoxon bilatéral (seuil de significativité fixé à 0,05). Pour la comparaison entre le groupe contrôle et le groupe MLA pour la biodistribution *ex vivo* (étude 2), un test non-paramétrique des rangs de Mann-Withney bilatéral a été utilisé (seuil de significativité réglé à 0,05).

Pour l'étude 3, la comparaison des valeurs entre le STC et le STI et entre la SNC et la SNI pour les animaux appartenant au même groupe expérimental ont été réalisés avec le test non paramétrique des rangs de Wilcoxon bilatéral (seuil de significativité réglé à 0,05). Pour la comparaison des valeurs entre les STI et les SNI entre les deux groupes expérimentaux, un test non-paramétrique des rangs de Mann-Withney bilatéral a été réalisé (seuil de significativité fixé à 0,05).

Pour les analyses métabolomiques de l'étude I, les analyses multivariées ont été réalisées à l'aide du logiciel SIMCA P+ version 13 (Umetrics*, Umeå, Suède). Les tests non paramétriques ont été effectués en utilisant le logiciel Metaboanalyst (www.metaboanalyst.ca) afin de sélectionner les métabolites significatifs. Comme nous étions dans plusieurs cas de tests, un test non paramétrique a été effectué avec une valeur *p* ajustée (fixée à 0,05) et une procédure de contrôle du taux de fausses découvertes (*FDR* pour *False Discovery Rate*) de Benjamini-Hochberg. Les critères de sélection des métabolites pour le traitement des données sont les suivants : un score VIP (variable importance in projection) dans l'analyse multivariée > 0,5, un fold change (FC) ratio < 0,75 ou > 1,25 et une valeur *p* < 0,05. Ces métabolites sont ensuite introduits à l'aide de leur numéro d'identification KEGG dans le module d'analyse des voies métaboliques du logiciel Metaboanalyst. Les voies présentant une valeur *p* < 0,05 ont ainsi été sélectionnées.

Troisième partie Résultats

I- Résultats de l'étude 1

Dans cette étude, les animaux ont été lésés à la 6-OHDA dans le striatum droit et le test des rotations induites par l'administration d'amphétamine a été réalisé 13 jours post-lésion (jpl) (n = 22). A 14 jpl, les animaux ont été séparés en deux groupes pour différents types d'analyses expérimentales. Pour le premier groupe (n = 8), les animaux ont été imagés en TEP avec le $[^{18}F]LBT$ -999. Les animaux ont ensuite été mis à mort et les cerveaux ont été prélevés pour effectuer des analyses métabolomiques. Pour le deuxième groupe (n = 14), les animaux ont été mis à mort et les cerveaux ont été analyses autoradiographiques et par immunofluorescence.

1- Test des rotations induites par l'administration d'amphétamine

Ce test comportemental a été réalisé à 13 jpl et tous les animaux (n = 22) ont présenté un comportement rotatoire caractéristique du modèle, avec en moyenne $8,73 \pm 0,67$ rotations ipsilatérales par minute.

2- Imagerie TEP du DAT avec le [¹⁸F]LBT-999

L'imagerie TEP du DAT dans le striatum avec le [¹⁸F]LBT-999 (n = 7, un rat a été exclu suite à un problème lors de l'injection du radiotraceur) a été réalisée à 14 jpl. Les images TEP statiques coronale et axiale présentées dans la Figure 22A ont été obtenues entre 30 et 50 minutes après injection du radiotraceur. Elles sont co-enregistrées avec un template-IRM du cerveau de rat (modèle numérique du cerveau de rat permettant un repérage anatomique). Ces images permettent de mettre en évidence une accumulation plus faible du [¹⁸F]LBT-999 dans le STI comparé au STC. Les courbes moyennes représentant la fixation du radiotraceur en fonction du temps (Figure 22B) indiquent une capture rapide [¹⁸F]LBT-999 dans toutes les régions d'intérêt après injection par intraveineuse. Cependant, elle décroit rapidement dans le CE pour se maintenir à des valeurs basses de fixation à partir de 20 minutes post-injection. Au niveau striatal, la fixation du [¹⁸F]LBT-999 reste élevée et stable dans le STC comparé au STI à 50 minutes post-injection (4,39 ± 0,31 vs. 1,47 ± 0,18 SUV, respectivement). L'analyse quantitative des SUVr (Figure 22C) montre une réduction significative (de 64,46 ± 1,68 %) dans le STI comparé au STC (1,69 ± 0.21 vs. 4,68 ± 0,38 SUVr, respectivement, p = 0,0156). Ce pourcentage de diminution reflète l'intensité de la lésion.



Figure 22. Imagerie TEP du DAT avec le [¹⁸F]LBT-999 dans le striatum de rats lésés à la 6-OHDA (n = 7). (A) Images TEP statiques axiale (image du haut) et coronale (image du bas) avec le [¹⁸F]LBT-999 co-enregistrée avec un template-IRM. (B) Courbes moyennes représentant la fixation du [¹⁸F]LBT-999 (SUV) en fonction du temps après injection dans le STC, le STI et le CE. (C) Analyses quantitatives des SUVr dans le STC et le STI. Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm erreur standard sur la moyenne (SEM). * p = 0,0156(test des rangs de Wilcoxon). Abréviations : 6-OHDA (6-hydroxydopamine), TEP (tomographie par émission de positrons), DAT (transporteur de la dopamine), Template-IRM (template-imagerie par résonance magnétique), SUV (standard uptake value), STC (striatum controlatéral), STI (striatum ipsilatéral), CE (cervelet), SUVr (standard uptake value ratio).

3- Analyses métabolomiques

Les données extraites du striatum et de la SN ont été étudiées respectivement avec des analyses supervisées par OPLS-DA (orthogonal partial least scare-discriminant analysis) et par PLS-DA (partial least scare-discriminant analysis). Ces analyses permettent de maximiser la séparation entre les deux conditions expérimentales (ici ce sont les structures cérébrales provenant de l'hémisphère ipsilatéral et controlatéral). Elles permettent d'identifier les métabolites les plus discriminants (c'est-à-dire les métabolites permettant le mieux de séparer les deux conditions expérimentales) grâce à un score VIP (variable importance in

projection). Plus cette valeur est élevée, plus le métabolite est discriminant. Les résultats de ces analyses pour le striatum (n = 8) et pour la SN (n = 7, un échantillon a été exclu en raison d'un problème lors de l'extraction) sont représentés respectivement dans la Figure 23A et 23B. Chaque modèle est défini par une valeur descriptive (R^2Y = robustesse du modèle) et par une valeur prédictive (Q^2 = capacité prédictive du modèle). Nous constatons que la valeur R^2Y est élevée à la fois pour le striatum (0,90) et la SN (0,84). Cependant, la valeur Q^2 est plus faible pour la SN (0,53) que pour le striatum (0,78). Toutefois, une valeur $Q^2 \ge 0,4$ est considérée comme acceptable pour un modèle biologique (Worley et Powers, 2013). Les analyses par OPLS-DA et par PLS-DA montrent une séparation entre les structures cérébrales provenant des hémisphères ipsilatéral et controlatéral (STI vs. STC et SNI vs. SNC).



Figure 23. Résultats des analyses supervisées par OPLS-DA pour le striatum (A) (n = 8) et par PLS-DA pour la SN (B) (n = 7) des données extraites par CL-SMHR. Les structures cérébrales provenant de l'hémisphère controlatéral (STC et SNC) et de l'hémisphère ipsilatéral (STI et SNI) sont respectivement représentées par des points bleus et rouges. Les valeurs descriptive et prédictive de chaque modèle sont : $R^2Y = 0,90$ et $Q^2 = 0,78$ pour le striatum et $R^2Y = 0,84$ et $Q^2 = 0,53$ pour la SN. Abréviations : OPLS-DA (orthogonal partial least scare-discriminant analysis), PLS-DA (partial least scare-discriminant analysis), SN (Substance Noire), CL-SMHR (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution), STC (striatum controlatéral), STI (striatum ipsilatéral), SNC (substance noire controlatérale), SNI (substance noire ipsilatérale).

Les analyses multivariées et univariées ont permis l'identification de plusieurs métabolites basés sur les critères de sélection suivants : un score VIP dans l'analyse multivariée > 0,5, un FC ratio (sens de variation du métabolite) < 0,75 ou > 1,25 et une valeur p < 0,05 (Tableau V). Pour le striatum, quatre métabolites ont été identifiés : la dopamine (plus faible dans le STI par rapport au STC), le glucose-1-phosphate (plus faible dans le STI par rapport au STC), le glucose-1-phosphate (plus faible dans le STI par rapport au STC), le glucose-1-phosphate (plus faible dans le STI par rapport au STC), le glucose-1-phosphate (plus faible dans le STI par rapport au STC), le glucose-1-phosphate (plus faible dans le STI par rapport au STC), le glucose-1-phosphate (plus faible dans le STI par rapport au STC), le glucose-1-phosphate (plus faible dans le STI par rapport au STC), le glucose-1-phosphate (plus faible dans le STI par rapport au STC), le glucose-1-phosphate (plus faible dans le STI par rapport au STC), le glucose-1-phosphate (plus faible dans le STI par rapport au STC), le glucose-1-phosphate (plus faible dans le STI par rapport au STC), le glucose-1-phosphate (plus faible dans le STI par rapport au STC), le glucose-1-phosphate (plus faible dans le STI par rapport au STC), le glucose-1-phosphate (plus faible dans le STI par rapport au STC), le glucose-1-phosphate (plus faible dans le STI par rapport au STC), le glucose-1-phosphate (plus faible dans le STI par rapport au STC) et l'acide 3-indole acétique (plus

faible dans le STI par rapport au STC). Pour la SN, seulement un métabolite a été identifié suivant les critères de sélection : le glucose-6-phosphate (plus faible dans la SNI que dans la SNC).

Métabolite	Score VIP	FC ratio	<i>p</i> -value	
	Stri	atum		
Dopamine	2,37	0,44	0,002	
Glucose-1-phosphate	0,53	0,58	0,038	
L-Carnitine	1,91	1,32	0,001	
Acide 3-indole acétique	2,28	0,56	0,007	
	S	SN		
Glucose-6-phosphate	0,93	0,57	0,037	

Tableau V. Métabolites identifiés par les analyses multivariées et univariées dans le striatum et la SN présentant les critères suivants : un score VIP dans l'analyse multivariée > 0,50, un FC ratio (STI/STC et SNI/SNC) < 0,75 ou > 1,25 et une *p*-value < 0,05. Abréviations : SN (Substance Noire), VIP (variable in importance projection), FC ratio (fold change ratio), STC (striatum controlatéral), STI (striatum ipsilatéral), SNC (substance noire controlatérale), SNI (substance noire ipsilatérale).

L'analyse des voies métaboliques révèle une altération hautement significative de la voie de l'arginine et de la proline à la fois dans le striatum et la SN (Tableaux VI et VII). Le diagramme de Venn présenté dans la Figure 24 indique que l'altération de cette voie est spécifique suivant la structure considérée. De plus, dans la SN, les analyses indiquent une altération hautement significative de la voie de biosynthèse des aminoacyl-ARNt et du métabolisme de l'histidine (Tableau VII).

Voie métabolique	Match Status	FDR	Metabolites	FC ratio (STI/STC)
Métabolisme de	7/44	0,0090661	L-ornithine	0,91
l'arginine et de la proline			L-glutamic acid	0,93
			S-(5'-adenosyl)-L-methionine	0,96
			spermidine	1,39
			fumarate	1,15
			creatine phosphate	1,87
			spermine	2,20

Tableau VI. Analyses des voies métaboliques significativement altérées dans le striatum. Abréviations : FDR (False Discovery Rate), FC ratio (fold change ratio), STC (striatum controlatéral), STI (striatum ipsilatéral). Le match status correspond au nombre de métabolites détectés par rapport au nombre total de métabolites intervenant dans le voie.
Voie métabolique	Match status	FDR	Métabolites	FC ratio (SNI/SNC)	Voie	métabolique	Matcl status	n FDR	Métabolite	s	FC ratio (SNI/SNC)
Biosynthèse des aminoacyl-ARNt	16/67	5,1749.10 ⁻ 5	L-asparagine	0,67	Mét	létabolisme de line et de la proline	12/44	1,7372.10-4	4 L-glutamine		0,66
			L-histidine	0,69	l'arginin		2		citrulline		0,69
			L-phenylalanine	0,49					L-aspartate		0,67
			L-arginine	0,65					L-arginin	L-arginine	
			L-glutamine	0,66					L-glutamic a	cid	0,63
			glycine	0,74				L-proline		0,70	
			L-aspartate	0,67					guanidinoace	tate	0,61
			L-serine	0,77					creatine		0,64
			L-methionine	0,47					4-aminobutanoate		0,72
			L-alanine	0,67					S-(5'-adenosyl)-L-methionine		0,70
			L-lysine	0,68					creatine phosphate		0,86
			L-threonine	0,70					4-guanidobutanoate		0,66
			L-tryptophan	0,50							
			L-tyrosine	0,57		Voie Ma métabolique sta	Match status	FDR	Métabolites	FC ratio	20
			L-proline	0,70		Métabolisme de l'histidine	6/15	0,0025404	L-glutamic acid	0,63	_
			L-glutamic acid	0,63					L-histidine	0,69	_
									histamine	4,72	
									carnosine	0,67	
									L-aspartate	0,67	
									N-methyl-L-histidine	0,73	

Tableau VII. Analyses des voies métaboliques significativement altérées dans le SN. Abréviations : SN (substance noire), FDR (false discovery rate), FC ratio (fold change ratio), SNC (substance noire controlatérale), SNI (substance noire ipsilatérale). Le match status correspond au nombre de métabolites détectés par rapport au nombre total de métabolites intervenant dans le voie.



Figure 24. Diagramme de Venn représentant les métabolites de la voie de l'arginine et de la proline uniquement retrouvés dans le striatum (cercle vert) et dans la SN (cercle rouge). Abréviation : SN (substance noire).

4- Analyses sur coupes par autoradiographie et par immunofluorescence

La densité du DAT dans le striatum a été évaluée sur des coupes coronales de cerveau avec le $[^{125}I]PE2I$ (n = 14) comme illustré dans la Figure 25A. D'après la Figure 25B, la fixation spécifique du radioligand est significativement plus faible (de 76,35 ± 1,71%) dans le STI comparé au STC (4,66 ± 0,33 vs. 19,91 ± 0,77 cpm/mm², respectivement, *p* = 0,0001). La densité striatale de la TSPO, quant à elle, a été évaluée avec le $[^{3}H]DPA-714$ sur des coupes coronales de cerveau adjacentes (n = 14) (Figure 25C). Comme représentée dans la Figure 25D, la fixation spécifique du radioligand est significativement plus importante (de 93,98 ± 7,24%) dans le STI que dans le STC (3,12 ± 0,33 vs. 1,60 ± 0,15 cpm/mm²,

respectivement, p = 0.0001).



Figure 25. Analyse sur coupes par autoradiographie : quantification du DAT et de la TSPO respectivement avec le [125 I]PE2I et le [3 H]DPA-714 dans le striatum de rats lésés à la 6-OHDA (n = 14). (A) Représentation de la fixation totale (image du haut) et non-spécifique (image du bas) du [125 I]PE2I dans le STC et le STI. (B) Analyse quantitative de la fixation spécifique du [125 I]PE2I (cpm/mm²) dans le STC et le STI. (C) Représentation de la fixation totale (image du haut) et non-spécifique (image du bas) du [3 H]DPA-714 dans le STC et le STI. (D) Analyse quantitative de la fixation spécifique du [3 H]DPA-714 (cpm/mm²) dans le STC et le STI. (D) Analyse quantitative de la fixation spécifique du [3 H]DPA-714 (cpm/mm²) dans le STC et le STI. Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± erreur standard sur la moyenne (SEM). *** *p* = 0,0001 (test des rangs de Wilcoxon). Abréviations : DAT (transporteur de la dopamine), TSPO (protéine translocatrice 18 kDa), 6-OHDA (6-hydroxydopamine), STC (striatum controlatéral), STI (striatum ipsilatéral).

L'immunomarquage de la TH a été réalisé dans la SN sur des coupes coronales de cerveau (n = 14) comme représenté sur la Figure 26A. Les analyses quantitatives (Figure 26B) indiquent que le nombre de cellules TH positives est significativement plus faible (de $63,87 \pm 1,57\%$) dans la SNI comparée à la SNC ($23,6 \pm 1,60$ vs. $65,14 \pm 2,62$ cellules TH positives,

respectivement, p = 0,0001).

Le CD11b a également été immunomarqué dans cette région cérébrale sur des coupes coronales de cerveau adjacentes (n = 14) (Figure 26C). Comme illustré dans la Figure 26D, l'aire occupée par l'immunomarquage du CD11b est statistiquement plus importante (de 2690 \pm 330%) dans la SNI par rapport à la SNC (10,64 \pm 0,83 vs 0,44 \pm 0,04%, respectivement, *p* = 0,0001).



Figure 26. Analyses sur coupes par immunofluorescence : quantification de la TH et du CD11b respectivement dans le striatum et la SN de rats lésés à la 6-OHDA (n = 14). (A) Représentation de l'immunomarquage de la TH dans la SNC et la SNI. (B) Analyse quantitative du nombre de cellules TH positives dans la SNC et la SNI. (C) Représentation de l'immunomarquage du CD11b dans la SNC et la SNI. (D) Analyse quantitative de l'aire occupée par l'immunomarquage du CD11b (%) dans la SNC et la SNI. Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm erreur standard sur la moyenne (SEM). *** p = 0,0001 (test des rangs de Wilcoxon). Abréviations : TH (tyrosine hydroxylase), SN (substance noire), 6-OHDA (6-hydroxydopamine), SNC (substance noire controlatérale), SNI (substance noire ipsilatérale).

II- Résultats de l'étude 2

Dans cette étude, les animaux ont été lésés à la 6-OHDA dans le striatum droit et les nAChR- α 7 ont été imagés en TEP avec le [¹⁸F]ASEM successivement à 3, 7 et 14 jpl (n = 8). Le test des rotations induites par l'administration d'amphétamine a été réalisé à 13 jpl. A 14 jpl après la dernière session d'imagerie TEP, les animaux ont été mis à mort et les cerveaux ont été prélevés et coupés pour effectuer des analyses autoradiographiques et par immunofluorescence.

1- Biodistribution cérébrale ex vivo du [18F]ASEM

Comme représenté dans la Figure 27, l'accumulation du radiotraceur (de la plus forte à la plus faible) une heure après injection par intraveineuse ont été retrouvées dans l'hippocampe (4,83 \pm 0,23 [%DI/g]r), les colliculi (4,30 \pm 0,23 [%DI/g]r), le cortex préfrontal (2,86 \pm 0,09 [%DI/g]r), le thalamus (2,86 \pm 0,09 [%DI/g]r) et le striatum (1,70 \pm 0,06 [%DI/g]r). La préinjection de MLA induit une diminution significative de l'accumulation du [¹⁸F]ASEM dans toutes les structures analysées (-60% pour l'hippocampe, -72% dans les colliculi, -44% dans le cortex préfrontal, - 34% dans le thalamus et -18% dans le striatum, *p* = 0,0012).



Figure 27. Biodistribution cérébrale *ex vivo* du [¹⁸F]ASEM chez des rats contrôles (n = 6) et après administration par intraveineuse de MLA, un antagoniste des nAChR- α 7 (n = 7). L'accumulation du [¹⁸F]ASEM ([%DI/g]r) a été évaluée dans plusieurs structures cérébrales incluant l'hippocampe, les colliculi, le cortex préfrontal, le thalamus et le striatum. Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± erreur standard sur la moyenne (SEM). ## p = 0,0012 (test des rangs de Mann-Whitney). Abréviations : MLA (méthyllycaconitine), nAChR- α 7 (récepteurs nicotiniques alpha 7), DI (dose injectée).

2- Test des rotations induites par l'administration d'amphétamine

Ce test comportemental a été réalisé 13 jpl et tous les animaux (n = 8) ont présenté un comportement rotatoire caractéristique du modèle, avec en moyenne $6,73 \pm 0,69$ rotations ipsilatérales par minute.

3- Imagerie TEP des nAChR-α7 avec le [¹⁸F]ASEM

L'imagerie TEP des nAChR- α 7 dans le striatum et la SN avec le [¹⁸F]ASEM (n = 8) a été réalisée successivement à 3, 7 et 14 jpl. Les images TEP statiques axiales présentées dans la Figure 28A ont été obtenues entre 30 et 50 minutes après injection du radiotraceur. Comme le montre la Figure 28B, l'analyse quantitative des SUVr révèle une augmentation significative (de 10,31 ± 2,93%) dans le STI comparé au STC à 3 jpl (0,88 ± 0,05 vs. 0,80 ± 0,05 SUVr, respectivement, p = 0,0078). Cependant, aucune différence statistique n'a été observée entre le STI et le STC à 7 et 14 jpl. Au niveau de la SN, l'analyse quantitative des SUVr indique une augmentation significative (de 18,46 ± 4,12%) dans la SNI par rapport à la SNC à 7 jpl (0,90 ± 0,07 vs. 0,77 ± 0,06 SUVr, respectivement, p = 0,0078) (Figure 28C). A 3 et 14 jpl, aucune différence significative n'a été observée entre la SNI et la SNC.



Figure 28. Imagerie TEP des nAChR- α 7 avec le [¹⁸F]ASEM dans le striatum et la SN de rats lésés à la 6-OHDA (n = 8). (A) Images TEP statiques coronales avec le [¹⁸F]ASEM co-enregistrée avec un template-IRM. (B)

Analyses quantitatives des SUVr dans le STC et le STI à 3, 7 et 14 jpl. (C) Analyses quantitatives des SUVr dans le SNC et le SNI à 3, 7 et 14 jpl. Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm erreur standard sur la moyenne (SEM). ## p = 0,0078 (test des rangs de Wilcoxon). Abréviations : TEP (tomographie par émission de positrons), nAChR- α 7 (récepteurs nicotiniques alpha 7), SN (substance noire), 6-OHDA (6-hydroxydopamine), Template-IRM (template-imagerie par résonance magnétique), SUVr (standard uptake value ratio), STC (striatum controlatéral), STI (striatum ipsilatéral), jpl (jours post-lésion), SNC (substance noire controlatérale), SNI (substance noire ipsilatérale).

4- Analyses sur coupes par autoradiographie

La densité du DAT dans le striatum a été évaluée sur des coupes coronales de cerveau avec le [¹²⁵I]PE2I (n = 14) comme illustré dans la Figure 29A. D'après la Figure 29B, la fixation spécifique du radioligand est significativement plus faible (de 71,02 ± 3,17%) dans le STI comparé au STC (6,33 ± 0,55 vs. 22,08 ± 0,65 cpm/mm², respectivement, p = 0,0078).



Figure 29. Analyse sur coupes par autoradiographie : quantification du DAT avec le [125 I]PE2I dans le striatum de rats lésés à la 6-OHDA (n = 8). (A) Représentation de la fixation totale (image du haut) et non-spécifique (image du bas) du [125 I]PE2I dans le STC et le STI. (B) Analyse quantitative de la fixation spécifique du [125 I]PE2I (cpm/mm²) dans le STC et le STI. Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± erreur standard sur la moyenne (SEM). ## p = 0,0078 (test des rangs de Wilcoxon). Abréviations : DAT (transporteur de la dopamine), 6-OHDA (6-hydroxydopamine), STC (striatum controlatéral), STI (striatum ipsilatéral).

5- Analyses sur coupes par immunofluorescence

L'immunomarquage de la TH a été quantifié dans la SN sur des coupes coronales de cerveau (n = 8) comme représenté sur la Figure 30A. Les mesures quantitatives (Figure 30B) indiquent que le nombre de cellules TH positives est significativement plus faible (de 66,45 ±

2,98%) dans la SNI comparée à la SNC (18,56 \pm 1,91 vs. 55,06 \pm 3,14 cellules TH positives, respectivement, p = 0,0078).



Figure 30. Analyses sur coupes par immunofluorescence : quantification de la TH dans la SN de rats lésés à la 6-OHDA (n = 8). (A) Représentation de l'immunomarquage de la TH dans la SNC et la SNI. (B) Analyse quantitative du nombre de cellules TH positives dans la SNC et la SNI. Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm erreur standard sur la moyenne (SEM). ## p = 0,0078 (test des rangs de Wilcoxon). Abréviations : TH (tyrosine hydroxylase), SN (substance noire), 6-OHDA (6-hydroxydopamine), SNC (substance noire controlatérale), SNI (substance noire ipsilatérale).

La GFAP a été quantifiée par immunomarquage à la fois dans le striatum et la SN sur coupes coronales de cerveau (n = 8) comme représenté respectivement dans les Figures 31A et 31C. Au niveau striatal, l'aire occupée par l'immunomarquage de la GFAP est significativement plus importante (de 81,73 ± 16,50%) dans le STI comparé au STC (8,20 ± 0,65 vs. 4,59 ± 0,28%, respectivement, p = 0,0078). Au niveau nigral, l'aire occupée par l'immunomarquage est également augmentée significativement (de 91,90 ± 19,11%) dans la SNI par rapport à la SNC (9,99 ± 0,57 vs. 5,48 ± 0,50%, respectivement, p = 0,0078).



Figure 31. Analyses sur coupes par immunofluorescence : quantification de la GFAP dans le striatum dans la SN de rats lésés à la 6-OHDA (n = 8). (A) Représentation de l'immunomarquage de la GFAP dans le STC et le STI (B) Analyse quantitative de l'aire occupée par l'immunomarquage de la GFAP (%) dans le STC et le STI. (C) Représentation de l'immunomarquage de la GFAP dans la SNC et le SNI. (D) Analyse quantitative de l'aire occupée par l'immunomarquage de la SNC et le SNI. (D) Analyse quantitative de l'aire occupée par l'immunomarquage de la GFAP (%) dans la SNC et le SNI. (D) Analyse quantitative de l'aire occupée par l'immunomarquage de la GFAP (%) dans la SNC et la SNI. Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm erreur standard sur la moyenne (SEM). ## p = 0,0078 (test des rangs de Wilcoxon). Abréviations : GFAP (glial fibrillary acidic protein), SN (substance noire), 6-OHDA (6-hydroxydopamine), STC (striatum controlatéral), STI (striatum ipsilatéral), SNC (substance noire controlatérale), SNI (substance noire ipsilatérale).

Comme pour la GFAP, le double immunomarquage CD11b/P2X7R a été quantifié sur des coupes coronales de cerveau à la fois dans le striatum et la SN (n = 8) (Figure 32A). Dans le striatum, les analyses quantitatives indiquent une augmentation significative du nombre de cellules CD11b positives (de 207,50 ± 26,53%) dans le STI comparé au STC (16,40 ± 0,83 vs. 5,63 ± 0,55 cellules CD11b positives, respectivement, p = 0,0078) (Figure 32B, graphique du haut). De la même manière, le nombre de cellules CD11b/P2X7R positives est statistiquement plus élevé (de 330,48 ± 54,31%) dans le STI par rapport au STC (11,90 ± 0,47 vs. 3,04 ± 0,34 cellules CD11b/P2X7R positives, respectivement, p = 0,0078) (Figure 32C, graphique du haut). Pour la SN, le nombre de cellules CD11b positives est significativement plus important (de 187,36 ± 15,40%) dans la SNI comparée à la SNC (12,84 ± 0,89 vs. 4,59 ± 0,44 cellules CD11b positives, respectivement, p = 0,0078). Le nombre de cellules CD11b/P2X7R

positives est également augmenté significativement (de 536, $08 \pm 135,99\%$) dans la SNI par rapport à la SNC (9,19 ± 0,46 vs. 1,91 ± 0,46 cellules CD11b/P2X7R, respectivement, p = 0,0078). Dans le STI et la SNI, les pourcentages occupés par le nombre de cellules CD11b/P2X7R par rapport au nombre total de cellules CD11b positives sont respectivement de 72,55 et 71,53%.



Figure 32. Analyse sur coupes par immunofluorescence : quantification du double immunomarquage CD11b/P2X7R dans le striatum et la SN de rats lésés à la 6-OHDA (n = 8). (A) Représentation de l'immunomarquage du CD11b, du P2X7R et du DAPI dans le STC et le STI et dans la SNC et la SNI. (B) Analyses quantitatives du nombre de cellules CD11b positives dans le STI et le STC (graphique du haut) et dans la SNC et la SNI (graphique du bas). (C) Analyses quantitatives du nombre de cellules CD11b/P2X7R positives dans le STI et le STC (graphique du bas). (C) Analyses quantitatives du nombre de cellules CD11b/P2X7R positives dans le STI et le STC (graphique du haut) et dans la SNC et la SNI (graphique du bas). Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm erreur standard sur la moyenne (SEM). ## p = 0,0078 (test des rangs de Wilcoxon). Abréviations : P2X7R (récepteur P2X7), SN (substance noire), 6-OHDA (6-hydroxydopamine), STC (striatum controlatéral), STI (striatum ipsilatéral), SNC (substance noire controlatérale), SNI (substance noire ipsilatérale).

III- Résultats de l'étude 3

Dans cette étude, les animaux ont été lésés à la 6-OHDA dans le striatum droit (n = 14) et ont été quotidiennement administrés avec le PHA543613 (6 mg/kg/jour, voie orale) et le PRE-084 (1mg/kg/jour, voie intra-péritonéale) (n = 7) ou administrés avec le véhicule (n = 7) pendant 14 jours. Le test des rotations induites par l'administration d'amphétamine a été réalisé à 13 jpl (n = 14). A 14 jpl après le dernier traitement, les animaux ont été mis à mort et les cerveaux ont été prélevés et coupés pour effectuer des analyses autoradiographiques et par immunofluorescence (n = 14).

1- Test des rotations induites par l'administration d'amphétamine

Ce test comportemental a été réalisé à 13 jpl et aucune différence significative n'a été observée entre le groupe contrôle (n = 7) et le groupe PHA/PRE (n = 7) dans le nombre de rotations (10,05 ± 1,44 vs 10,11 ± 0,91 rotations ipsilatérales/min, respectivement, p = 0,6031) (Figure 33).



Figure 33. Test des rotations induites par l'administration d'amphétamine : quantification du nombre de rotations ipsilatérales par minute chez les rats lésés à la 6-OHDA (groupe contrôle, n = 7) et après traitement au PHA543613/PRE-084 (groupe PHA/PRE, n = 7). Abréviation : 6-OHDA (6-hydroxydopamine).

2- Analyses sur coupes par autoradiographie

La densité du DAT dans le striatum a été évaluée sur coupes coronales de cerveau avec le [125 I]PE2I pour le groupe contrôle (n = 7) et le groupe PHA/PRE (n = 7) comme représenté dans la Figure 34A. D'après la Figure 34B, la fixation spécifique du radioligand dans le STC est faible et similaire entre les deux groupes expérimentaux ($21,85 \pm 0,80$ cpm/mm² pour le groupe contrôle et $21,68 \pm 0,93$ cpm/mm² pour le groupe PHA/PRE). Dans le STI, la fixation spécifique du [125 I]PE2I est significativement diminuée dans le groupe contrôle et le groupe PHA/PRE ($5,02 \pm 0,34$ vs $21,85 \pm 0,80$ cpm/mm², p = 0,0156; $8,50 \pm 1,02$ vs $21,68 \pm 0,93$ cpm/mm², p = 0,0156, respectivement). Cependant, une augmentation significative de la fixation spécifique du radioligand dans le STI a été observée pour le groupe PHA/PRE comparé au groupe contrôle (69,27% d'augmentation, p = 0,0023).

La densité striatale de la TSPO, quant à elle, a été évaluée avec le [³H]PK-11195 sur des coupes coronales de cerveau adjacentes pour les deux groupes expérimentaux (Figure 34C). Comme le montre la Figure 34D, la fixation spécifique du radioligand dans le STC est faible et uniforme entre les deux groupes expérimentaux (1,71 ± 0,05 cpm/mm² pour le groupe contrôle et 1,75 ± 0,10 cpm/mm² pour le groupe PHA/PRE). Dans le STI, la fixation spécifique du [³H]PK-11195 est significativement augmentée dans le groupe contrôle et le groupe PHA/PRE (2,95 ± 0,12 cpm/mm² vs 1,71 ± 0,05 cpm/mm², p = 0,0156; 2,65 ± 0,06 cpm/mm² vs 1,75 ± 0,10 cpm/mm², p = 0,0156, respectivement). Toutefois, une diminution significative de la fixation spécifique du radioligand dans le STI a été observée pour le groupe PHA/PRE par rapport au groupe contrôle (10,17% de diminution, p = 0,0313).



Figure 34. Analyse sur coupes par autoradiographie : quantification du DAT et de la TSPO respectivement avec le [125 I]PE2I et le [3 H]PK-11195 dans le striatum de rats lésés à la 6-OHDA (groupe contrôle, n = 7) et après traitement au PHA543613/PRE-084 (groupe PHA/PRE, n = 7). (A) Représentation de la fixation totale (image du haut) et non-spécifique (image du bas) du [125 I]PE2I dans le STC et le STI pour le groupe contrôle et pour le groupe PHA/PRE. (B) Analyses quantitatives de la fixation spécifique du [125 I]PE2I (cpm/mm²) dans le STC et le STI pour le groupe contrôle et pour le groupe PHA/PRE. (C) Représentation de la fixation totale (image du haut) et non-spécifique (image du bas) du [3 H]PK-11195 dans le STC et le STI pour le groupe contrôle et pour le groupe PHA/PRE. (D) Analyses quantitatives de la fixation spécifique du [3 H]PK-11195 (cpm/mm²) dans le STC et le STI pour le groupe contrôle et pour le groupe PHA/PRE. (D) Analyses quantitatives de la fixation spécifique du [3 H]PK-11195 (cpm/mm²) dans le STC et le STI pour le groupe contrôle et pour le groupe PHA/PRE. (D) Analyses quantitatives de la fixation spécifique du [3 H]PK-11195 (cpm/mm²) dans le STC et le STI pour le groupe contrôle et pour le groupe PHA/PRE. Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm erreur standard sur la moyenne (SEM). *p = 0,0156 (test des rangs de Wilcoxon), #p = 0,0313 (test des rangs de Mann-Withney), ##p = 0,0023 (test des rangs de Mann-Withney). Abréviations : DAT (transporteur de la dopamine), TSPO (protéine translocatrice 18 kDa), 6-OHDA (6-hydroxydopamine), STC (striatum controlatéral), STI (striatum ipsilatéral).

3- Analyses sur coupes par immunofluorescence

L'immunomarquage de la TH a été quantifié dans la SN sur des coupes coronales de cerveau pour le groupe contrôle (n = 7) (Figure 35A) et pour le groupe PHA/PRE (n = 7) (Figure 35B). Les mesures quantitatives (Figure 35C) indiquent que le nombre de cellules TH positives dans la SNC est élevé et similaire entre les deux groupes expérimentaux (67,71 ± 6,23 cellules TH positives pour le groupe contrôle et 73,04 ± 2,91 cellules TH positives pour le groupe PHA/PRE). Dans la SNI, le nombre de cellules TH positives est significativement diminué dans le groupe contrôle et le groupe PHA/PRE (19,00 ± 1,15 vs. 67,71 ± 6,23 cellules TH positives, p = 0,0156; 35,43 ± 3,69 vs. 73,04 ± 2,91 cellules TH positives, p = 0,0156, respectivement). Cependant, une augmentation significative du nombre de cellules TH positives dans la SNI a été observée pour le groupe PHA/PRE comparé au groupe contrôle (86,47% d'augmentation, p = 0,0017).



Figure 35. Analyses sur coupes par immunofluorescence : quantification de la TH dans la SN de rats lésés à la 6-OHDA (groupe contrôle, n = 7) et après traitement au PHA543613/PRE-084 (groupe PHA/PRE, n = 7). (A) Représentation de l'immunomarquage de la TH dans la SNC et la SNI pour le groupe contrôle. (B) Représentation de l'immunomarquage de la TH dans la SNC et la SNI pour le groupe PHA/PRE. (C) Analyse quantitative du nombre de cellules TH positive dans la SNC et la SNI pour le groupe contrôle et pour le groupe PHA/PRE. Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm erreur standard sur la moyenne (SEM). * *p* = 0,0156 (test des rangs de Wilcoxon), ## *p* = 0,0017 (test des rangs de Mann-Whitney). Abréviations : TH (tyrosine hydroxylase), SN (substance noire), 6-OHDA (6-hydroxydopamine), SNC (substance noire controlatérale), SNI (substance noire ipsilatérale).

Le CD11b a également été immunomarqué dans le SN sur des coupes coronales de cerveau adjacentes pour le groupe contrôle (n = 7) et pour le groupe PHA/PRE (n = 7) comme représenté respectivement dans la Figure 36A et la Figure 36B. D'après la Figure 36C, l'aire occupée par l'immunomarquage du CD11b est très faible et uniforme entre les deux groupes expérimentaux (0,46 ± 0,04% pour le groupe contrôle et 0,32 ± 0,10% pour le groupe PHA/PRE). Dans la SNI, l'aire occupée par l'immunomarquage est significativement plus importante pour le groupe contrôle et le groupe PHA/PRE (12,54 ± 0,91% vs. 0,46 ± 0,04%, *p* = 0,0156 ; 6,27 ± 1,27% vs. 0,32 ± 0,10%, *p* = 0,0156 respectivement). Toutefois, une diminution significative de l'aire occupée par l'immunomarquage du CD11b dans la SNI a été observée pour le groupe PHA/PRE par rapport au groupe contrôle (50,02% de diminution, *p* = 0,0041).



Figure 36. Analyses sur coupes par immunofluorescence : quantification du CD11b dans la SN de rats lésés à la 6-OHDA (groupe contrôle, n = 7) et après traitement au PHA543613/PRE-084 (groupe PHA/PRE, n = 7). (A) Représentation de l'immunomarquage du CD11b dans la SNC et la SNI pour le groupe contrôle. (B) Représentation de l'immunomarquage du CD11b dans la SNC et la SNI pour le groupe PHA/PRE. (C) Analyse quantitative de l'aire occupée par l'immunomarquage du CD11b (%) dans la SNC et la SNI pour le groupe le groupe contrôle et pour le groupe PHA/PRE. Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm erreur standard sur la moyenne (SEM). * p = 0,0156 (test des rangs de Wilcoxon), ## p = 0,0041 (test des rangs de Mann-Whitney). Abréviations : SN (substance noire), 6-OHDA (6-hydroxydopamine), SNC (substance noire controlatérale), SNI (substance noire ipsilatérale).

La GFAP a été immunomarquée à la fois dans le striatum et la SN pour les deux groupes expérimentaux. L'immunomarquage de la GFAP dans le striatum pour le groupe contrôle (n = 7) et pour le groupe PHA/PRE (n = 7) est représenté respectivement dans la Figure 37A et la Figure 37B. Les mesures quantitatives (Figure 37C) indiquent que l'aire occupée par

l'immunomarquage de la GFAP dans le STC est bas et similaire entre les deux groupes expérimentaux (4,50 \pm 0,24% pour le groupe contrôle et 4,01 \pm 0,30% pour le groupe PHA/PRE). Dans le STI, une augmentation significative de l'aire occupée par l'immunomarquage de la GFAP a été observée pour le groupe contrôle et le groupe PHA/PRE (10,64 \pm 0,54 vs. 4,50 \pm 0,24%, *p* = 0,0156 ; 8,14 \pm 0,93% vs. 4,01 \pm 0,30%, *p* = 0.0313). Cependant, une diminution significative de l'aire occupée par l'immunomarquage de la GFAP dans le STI a été observée pour le groupe PHA/PRE comparé au groupe contrôle (23,49% de diminution, *p* = 0,0262).



Figure 37. Analyses sur coupes par immunofluorescence : quantification de la GFAP dans le striatum de rats lésés à la 6-OHDA (groupe contrôle, n = 7) et après traitement au PHA543613/PRE-084 (groupe PHA/PRE, n = 7). (A) Représentation de l'immunomarquage de la GFAP dans la STC et la STI pour le groupe contrôle. (B) Représentation de l'immunomarquage de la GFAP dans la STC et la STI pour le groupe PHA/PRE. (C) Analyse quantitative de l'aire occupée par l'immunomarquage de la GFAP (%) dans la STC et la STI pour le groupe contrôle et pour le groupe PHA/PRE. Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm erreur standard sur la moyenne (SEM). * p = 0,0156 (test des rangs de Wilcoxon), ***** p = 0,0313 (test des rangs de Wilcoxon), # p = 0,0262 (test des rangs de Mann-Withney). Abréviations : GFAP (glial fibrillary acidic protein), 6-OHDA (6-hydroxydopamine), STC (striatum controlatéral), STI (striatum ipsilatéral).

L'immunomarquage de la GFAP dans la SN pour le groupe contrôle (n = 7) et pour le groupe PHA/PRE (n = 7) est représenté respectivement dans la Figure 38A et la Figure 38B. Comme le montre la Figure 38C, l'aire occupée par l'immunomarquage de la GFAP est bas et uniforme entre les deux groupes expérimentaux ($6,15 \pm 0,35\%$ pour le groupe contrôle et 5,65

 \pm 0,56% pour le groupe PHA/PRE). Dans la SNI, l'aire occupée par l'immunomarquage de la GFAP est significativement plus importante dans le groupe contrôle et le groupe PHA/PRE (14,37 \pm 0,69 vs. 6,15 \pm 0,35%, p = 0,0156; 12,27 \pm 0,44 vs. 5,65 \pm 0,56%, p = 0,0156, respectivement). Toutefois, une diminution significative de l'aire occupée par l'immunomarquage de la GFAP a été observée dans la SNI pour le groupe PHA/PRE par rapport au groupe contrôle (14,59% de diminution, p = 0,0379).



Figure 38. Analyses sur coupes par immunofluorescence : quantification de la GFAP dans la SN de rats lésés à la 6-OHDA (groupe contrôle, n = 7) et après traitement au PHA543613/PRE-084 (groupe PHA/PRE, n = 7). (A) Représentation de l'immunomarquage de la GFAP dans la SNC et la SNI pour le groupe contrôle. (B) Représentation de l'immunomarquage de la GFAP dans la SNC et la SNI pour le groupe PHA/PRE. (C) Analyse quantitative de l'aire occupée par l'immunomarquage de la GFAP (%) dans la SNC et la SNI pour le groupe contrôle et pour le groupe PHA/PRE. Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm erreur standard sur la moyenne (SEM). *p = 0,0156 (test des rangs de Wilcoxon), # p = 0,0379 (test des rangs de Mann-Withney). Abréviations : GFAP (glial fibrillary acidic protein), SN (substance noire), 6-OHDA (6-hydroxydopamine), SNC (substance noire controlatérale), SNI (substance noire ipsilatérale).

Quatrième partie Discussion

I- Discussion de l'étude 1

En considérant le fait que les traitements actuellement mis en place dans la MP sont symptomatiques et ne permettent pas de ralentir le processus neurodégénératif, il y a un besoin urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques (Tarazi et al., 2014). Dans ce contexte, le développement et la caractérisation de modèles animaux explorés, en particulier à l'aide des techniques de neuroimagerie comme la TEP, sont des approches pertinentes. Parmi ces modèles, certains sont basés sur l'administration systémique ou locale de neurotoxines capables d'induire une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée (Blandini et al., 2008). Plus particulièrement, l'injection de 6-OHDA dans le striatum induit une dégénérescence partielle, progressive et rétrograde des neurones dopaminergiques nigro-striataux, mimant ainsi les stades précoces de la maladie et donc mieux adaptée que les lésions totales dans l'évaluation de stratégies neuroprotectrices. Cependant, l'étendue de la lésion dépend de plusieurs paramètres expérimentaux incluant la dose totale de 6-OHDA administrée, le nombre de points d'injection et leurs coordonnées stéréotxiques (Kirik et al., 1998). Sur cette base, nous avons caractérisé un modèle chez le rat où la toxine est unilatéralement délivrée en trois points dans le striatum droit dans le but de produire une lésion partielle, stable et reproductible tout au long de la structure.

Dans cette étude, nos explorations ont été réalisées 14 jours après l'injection intrastriatale de 6-OHDA. En effet, il est reconnu que l'injection de la toxine dans cette structure induit une dégénérescence des terminaisons dopaminergiques dans les premiers jours, suivie par une perte des corps cellulaires dans la SN atteignant un niveau stable à partir de deux semaines après l'injection (Duty et Jenner, 2011). Nous avons tout d'abord analysé le comportement rotatoire des rats lésés en réponse à l'administration d'amphétamine, indiquant de manière indirecte l'intensité de la déplétion dopaminergique dans le striatum (Iancu et al., 2005 ; Tronci et al., 2012). Nous avons observés des résultats homogènes (nombre de rotations ipsilatérales) entre tous les animaux, reflétant ainsi une lésion stable et reproductible. Ces résultats ont été confirmés par l'évaluation directe *in vivo* du DAT dans le striatum par imagerie TEP. La quantification de la densité de ce transporteur au niveau striatal permet d'évaluer spécifiquement l'intégrité des terminaisons des neurones dopaminergiques (Brooks

et Pavese, 2011 ; Tatsch et Poepperl, 2013). Pour ce faire, nous avons utilisé le [¹⁸F]LBT-999, un radioligand sélectif prometteur pour la recherche clinique sur la MP (Arlicot et al., 2017). Le [¹⁸F]LBT-999 a déjà permis de quantifier de manière fiable l'intensité de la lésion dans différents modèles de lesion à la 6-OHDA chez le rat (Grealish et al., 2014 ; Sérrière et al., 2015). Nos données d'imagerie ont montré une réduction significative et homogène d'environ 65% de l'accumulation du radioligand dans le STI comparé au STC, indiquant une dégénérescence partielle et reproductible des terminaisons dopaminergiques. Ces résultats sont en accord avec la déplétion hautement significative en dopamine dans le striatum que nous avons quantifié en métabolomique chez ces mêmes animaux. De plus, l'intensité de la lésion évaluée en imagerie TEP est relativement proche de celle obtenue en autoradiographie (75%) avec le [¹²⁵I]PE2I, un radioligand sélectif du DAT (Chalon et al., 1999). La sensibilité et la résolution relatives à ces deux techniques d'imagerie pourraient expliquer cette difference de pourcentage. Au niveau nigral, nos données obtenues en immunofluorescence ont montré une réduction significative et uniforme d'environ 60% du nombre de cellules TH positives dans la SNC comparée à la SNI, indiquant une perte reproductible et partielle des corps cellulaires des neurones dopaminergiques. Ensemble, ces résultats confirment que notre modèle est caractérisé par une dégénérescence partielle et reproductible des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée suite à l'administration de la 6-OHDA.

Il est aujourd'hui reconnu que l'activation des cellules gliales comme la microglie est un phénomène accompagnant la dégénérescence des neurones dopaminergiques. En effet, une activation microgliale est observée à la fois dans les modèles animaux et chez le patient parkinsonien *in vivo* ou *post-mortem* (Thornton et Vink, 2012). Cette activation joue un rôle majeur dans le processus neurodégénératif en sécrétant des médiateurs pro-inflammatoires et cytotoxiques (Chao et al., 2014 ; Song et al., 2016). En retour, les neurones dopaminergiques en cours de dégénérescence libèrent des substances comme l'ATP favorisant l'activation des cellules microgliales (Saijo et Glass, 2011). Dans notre modèle, nous avons quantifié par autoradiographie la densité de la TSPO, protéine considérée comme un marqueur sensible de l'activation microgliale (Chen and Guilarte 2008 ; Rupprecht et al. 2010). Pour cela, nous avons utilisé le [³H]DPA-714, un radioligand hautement spécifique de la TSPO qui a récemment permis de quantifier de manière fiable l'activation microgliale striatale dans un modèle d'excitotoxicité chez le rat (Foucault-Fruchard et al. 2017). Nous avons également évalué l'activation microgliale dans la SN par immunomarquage du CD11b, une protéine de

surface surexprimée lors de l'activation de ces cellules (Roy et al., 2008). Nos résultats ont montré une augmentation importante, significative et relativement homogène de la densité de la TSPO et de l'immunomarquage du CD11b dans le STI et la SNI, indiquant une robuste activation microgliale. De ce fait, ces résultats montrent que notre modèle est caractérisé par une dégénérescence partielle et reproductible des neurones dopaminergiques nigro-striataux associée à une importante activation microgliale 14 jours après l'administration intrastriatale de 6-OHDA, en accord avec les résultats précédemment publiés par Maia et al. (2012).

Dans le but d'explorer en détail notre modèle, nous avons effectué des analyses métabolomiques dans les structures rattachées à la voie nigro-striée, à savoir le striatum et la SN. Au regard de la littérature, peu d'études métabolomiques ont été à ce jour réalisées dans des modèles animaux de MP (Gao et al., 2013a ; Zheng et al., 2016). Outre la déplétion en dopamine, nous avons observé quelques métabolites altérés dans les structures du côté ipsilatéral comparé au côté controlatéral. Parmi eux, le glucose-6-phosphate et le glucose-1phosphate, deux métabolites appartenant aux voies métaboliques du glucose, sont significativement diminués dans le STI et la SNI. Ces observations sont en accord avec plusieurs études d'imagerie TEP utilisant le [18F]FDG (glucose radiomarqué au fluor 18) dans le modèle 6-OHDA et ayant montrées un hypométabolisme dans le striatum et la SN du côté de la lésion (Casteels et al., 2008 ; Jang et al., 2012 ; Silva et al., 2013). De façon intéressante, nos analyses métabolomiques ont également montré une augmentation significative de Lcarnitine dans le STI. Cette augmentation pourrait constituer un mécanisme endogène neuroprotecteur visant à protéger les terminaisons des neurones dopaminergiques du processus dégénératif. En effet, il a été rapporté que la supplémentation de L-carnitine ou de son dérivé, l'acétyl-L-carnitine, exerce des effets anti-inflammatoires dans différents modèles animaux de maladies neurodégénératives incluant la MP (Silva-Adaya et al., 2008 ; Sarkar et al., 2015 ; Afshin-Majd et al., 2017; Ferreira and McKenna, 2017). Il est très largement reconnu que le cerveau n'utilise pas les acides gras comme substrats énergétiques (Panov et al. 2014 ; Schonfeld et al., 2013). Cependant, bien que cela soit vrai pour les neurones, la carnitine-palmitoyltransférase ou CPT, enzyme intervenant dans le transport des acides gras à longue chaîne à travers la membrane mitochondriale pour la bêta-oxydation, est fonctionnelle dans les astrocytes (Xie et al., 2016) et dans les cellules souches neurales (Knobloch et al., 2017). De ce fait, les propriétés anti-inflammatoires ou énergétiques de la L-carnitine restent encore à être élucidées dans ce modèle et pourraient constituer une approche thérapeutique innovante.

Les analyse métabolomiques ont également révélé l'altération significative de plusieurs voies métaboliques dont celle de l'arginine et de la proline, à la fois dans le striatum et la SN. Nous avons alors réalisé un diagramme de Venn afin d'identifier les métabolites de cette voie modifiés dans les deux structures et ceux retrouvés spécifiquement dans chacune des structures. Nous avons ainsi constaté que seulement trois métabolites sont communs au striatum et à la SN, suggérant que les altérations de la voie de l'arginine et de la proline différent suivant la structure. Au niveau striatal, trois métabolites sur les quatre détectés appartiennent à la voie de biosynthèse des polyamines (L-ornithine, spermine et spermidine). Les polyamines sont des composés organiques ubiquitaires intervenant dans plusieurs fonctions cellulaires comme l'apoptose et la transduction des signaux (Handa et al., 2018). Il semblerait que les polyamines soient impliquées dans la physiopathologie de la MP (Gomes-Trolin et al., 2002 ; Lewandowski et al., 2010) mais leurs rôles précis restent encore à être élucidés.

Nous avons également observé une altération significative de la voie de biosynthèse des aminoacyl-ARNt dans la SN, indiquant une perturbation importante de la synthèse protéique. En effet, les aminoacyl-ARNt sont des ARN de transfert couplés à des acides aminés intervenant dans la traduction de la séquence codante de l'ARN messager en protéine. Au sein de cette voie, nous avons remarqué une diminution de plusieurs acides aminés dont la L-phénylalanine et la L-tyrosine intervenant dans la voie de synthèse de la dopamine, en accord avec la lésion des neurones dopaminergiques. Outre cette voie, nous avons également observé une altération significative du métabolisme de l'histidine caractérisée par une augmentation de l'innervation histaminergique et de la concentration d'histamine dans la SN (Anichtchik et al., 2000 ; Rinne et al., 2002). De plus, l'histamine exerce des effets toxiques vis-à-vis des neurones dopaminergiques notamment *via* l'activation de la microglie environnante (Vizuete et al., 2000 ; Liu et al., 2007 ; Rocha et al., 2016).

Au total, nous avons mis en place et exploré un modèle de lésion partielle à la 6-OHDA chez le rat caractérisé par une dégénérescence reproductible et modérée des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée, associée à une importante neuroinflammation. Outre les altérations métaboliques connues dans la MP (métabolisme de la dopamine, métabolisme énergétique), nos analyses métabolomiques ont permis de mettre en évidence des altérations spécifiques de plusieurs métabolites et voies métaboliques (carnitine, métabolisme de l'arginine et de la proline, métabolisme de l'histidine), qui concordent avec certaines observations réalisées en clinique. Cependant, nous ne savons pas si ces altérations sont des mécanismes délétères ou au contraire, des mécanismes endogènes de protection en réponse à la lésion des neurones dopaminergiques. De ce fait, il sera nécessaire de mieux comprendre ces modifications afin de proposer de nouvelles approches thérapeutiques dans la MP.

II- Discussion de l'étude 2

Dans cette étude, nous avons évalué *in vivo* le profil d'expression des nAChR- α 7 par imagerie TEP dans les structures de la voie nigro-striée (Striatum et SN) à différents temps après administration de la 6-OHDA. Pour cela, nous avons utilisé le [¹⁸F]ASEM, un radiotraceur caractérisé par une haute affinité et sélectivité pour les nAChR- α 7 (constante d'inhibition ou Ki = 0,4 nM) (Horti et al., 2015). En considérant l'absence de données sur la répartition cérébrale du [¹⁸F]ASEM *in vivo* chez le rat, nous avons tout d'abord évalué la biodistribution cérébrale *ex vivo* du radiotraceur chez le rat sain. Les résultats ont montré une accumulation très importante du [¹⁸F]ASEM dans l'hippocampe et dans les colliculi, une accumulation intermédiaire dans le cortex préfrontal et le thalamus, une accumulation plus faible dans le striatum et une accumulation très faible dans le cervelet. De plus, l'accumulation du radiotraceur était significativement diminuée après pré-injection de MLA (antagoniste des nAChR- α 7) dans toutes les structures étudiées hormis le cervelet, démontrant ainsi la haute sélectivité et affinité du [¹⁸F]ASEM pour les nAChR- α 7 au niveau central et la pertinence de son utilisation pour des exploitations *in vivo* chez le rat. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment obtenus chez la souris (Gao et al., 2013).

Dans une seconde étape, nous avons utilisé le [¹⁸F]ASEM en imagerie TEP afin d'effectuer un suivi longitudinal des nAChR- α 7 dans le modèle de lésion partielle à la 6-OHDA chez le rat. Pour cela, nous avons effectué trois sessions d'imagerie à 3, 7 et 14 jpl où nous avons quantifié l'accumulation du radiotraceur dans les structures clés de la voie nigro-striée (striatum et SN). Les résultats ont montré une augmentation significative de la fixation du [¹⁸F]ASEM dans le STI par rapport au STC uniquement à 3 jpl, indiquant que la densité striatale des nAChR- α 7 est précocement modifiée suite à l'administration de la neurotoxine. Les résultats ont également montré une augmentation significative de la fixation du radiotraceur dans la SNI comparée à la SNC seulement à 7 jpl, suggérant que l'augmentation de la densité des nAChR- α 7 se manifeste plus tardivement dans la SN que dans le striatum après administration de la 6-OHDA. Toutefois, ces différences ne sont observées que pour un temps donné aussi bien pour le striatum que pour la SN, suggérant ainsi que ces modifications ne sont que transitoires. En effet, à 14 jpl, aucune différence n'est observée dans les deux structures.

Au niveau central, les nAChR- α 7 sont exprimés par les neurones mais sont également retrouvés au niveau des cellules gliales incluant les cellules microgliales et les astrocytes (Teaktong et al., 2003 ; Shytle et al., 2004). Dans le cadre de la MP aussi bien chez l'Homme que dans les modèles animaux, la dégénérescence des neurones dopaminergiques nigrostriataux est associée à une activation de ces cellules gliales. Leur activation se manifeste par différentes modifications morphologiques mais également par une prolifération importante (microgliose pour les cellules microgliales et astrogliose pour les astrocytes). Dans le modèle 6-OHDA, l'activation des cellules microgliales et des astrocytes peut se manifester précocement, à partir de trois jours après injection de la neurotoxine, et peut persister jusqu'à trois semaines post-injection (Hernandez-Baltazar et al., 2017). De ce fait, les modifications transitoires de la densité des nAChR- α 7 observées en imagerie TEP dans le striatum et la SN respectivement à 3 jpl et 7 jpl pourraient témoigner d'une activation des cellules microgliales et/ou des astrocytes.

Après la dernière session d'imagerie réalisée à 14 jpl, nous avons tout d'abord quantifié la perte des neurones dopaminergiques nigro-striataux en autoradiographie (densité du DAT dans le striatum avec le [¹²⁵I]PE2I) et par immunofluorescence (comptage du nombre de cellules TH positives dans la SN). Les résultats ont montré une diminution d'environ 70% de la densité du DAT dans le STI par rapport au STC et une diminution d'environ 65% du nombre de cellules TH positives dans la SNI comparée à la SNC, en accord avec une lésion partielle des neurones dopaminergiques mimant les stades précoces de la MP. Ces résultats sont également similaires à ceux obtenus dans notre première étude concernant la caractérisation du modèle, démontrant ainsi la bonne reproductibilité de la lésion.

Nous avons également quantifié l'activation des cellules gliales par immunofluorescence au niveau striatal et nigral. Pour les astrocytes, nous avons quantifié la GFAP, un marqueur conventionnel surexprimé lors de l'activation de ces cellules (Brahmachari et al., 2007). L'activation des cellules microgliales, quant à elle, a été évaluée par le nombre de cellules CD11b positives mais également par le nombre de cellules CD11b positives exprimant le P2X7R afin d'évaluer la polarisation microgliale. En effet, le P2X7R est exprimé par la microglie et a été récemment proposé comme potentiel marqueur du phénotype M1 (phénotype classique ou pro-inflammatoire) (Tronel et al., 2017). Les analyses quantitatives ont montré la présence d'une importante activation astrocytaire et microgliale à 14 jpl à la fois dans le striatum et la SN. De plus, cette activation microgliale est caractérisée par une importante population de cellules exprimant le P2X7R, donc probablement orientées en

phénotype M1 délétère pour l'environnement tissulaire et cellulaire.

Dans ce contexte, nous pouvons émettre l'hypothèse que les modifications des nAChR-α7 observées en imagerie TEP seraient liées à des réponses transitoires impliquant de la microglie M2. En effet, le phénotype M2 est impliqué dans plusieurs fonctions incluant la réparation tissulaire, la clairance des débris cellulaires et l'atténuation des processus inflammatoires (Cherry et al., 2014), créant ainsi un environnement « neuroprotecteur ». De plus, ces réponses sembleraient liées à la cinétique de la dégénérescence rétrograde des neurones dopaminergiques caractéristique du modèle. En effet, la réponse observée à 3 jpl dans le striatum pourrait être reliée à la mise en place d'un mécanisme de protection des terminaisons dopaminergiques alors que la réponse à 7 jpl dans la SN pourrait être reliée à ce processus au niveau des corps cellulaires des neurones dopaminergiques. Il semble donc y avoir une évolution temporelle des réponses microgliales caractérisée par une augmentation précoce des réponses M2 suivie par une augmentation progressive des réponses M1. Ce type de cinétique a été récemment proposé dans un modèle animal proche par Ambrosi et al. (2017). Ces auteurs ont montré que la dégénérescence des neurones dopaminergiques nigrostriataux est associée à une réponse biphasique de l'activation microgliale, caractérisée par une augmentation précoce du phénotype M2 laissant place progressivement à une augmentation du phénotype M1 (transition entre les deux phénotypes observée aux alentours de 14 jpl). En dehors de la MP, ce type de cinétique a également été observée chez l'animal en condition ischémique (Perego et al, 2011 ; Hu et al., 2012), suggérant ainsi que ces réponses microgliales biphasiques pourraient être partagées par différents troubles du SNC.

Dans cette étude, le [¹⁸F]ASEM a été pour la première fois utilisé dans le contexte de la MP au niveau pré-clinique dans le modèle de lésion partielle à la 6-OHDA chez le rat. La biodistribution *ex vivo* cérébrale chez le rat sain a permis de confirmer la haute spécificité et sélectivité du radiotraceur pour les nAChR- α 7 au niveau central. Les données obtenues en imagerie TEP ont permis de mettre en évidence des modifications de la densité de ces récepteurs dans les structures clés de la voie nigro-striée (striatum et SN), suggérant ainsi que le [¹⁸F]ASEM pourrait être potentiellement utilisé pour des études cliniques dans le cadre de la MP. Ce radiotraceur a récemment montré son efficacité à cibler les nAChR- α 7 par imagerie TEP dans le cerveau humain sain (Hillmer et al., 2017 ; Coughlin et al., 2018) mais également en condition pathologique dans le cadre de la schizophrénie (Wong et al., 2018). Nos résultats suggèrent également des réponses microgliales biphasiques associées à la cinétique de dégénérescence des neurones dopaminergiques nigro-striataux. En considérant que l'activation des nAChR- α 7 participe à la transition du phénotype M1 vers le phénotype M2 (Han et al., 2014 ; Kalkman et Feuerbach, 2016 ; Zhang et al., 2017), l'utilisation d'agonistes ciblant spécifiquement ces récepteurs pourrait donc constituer une approche neuroprotectrice prometteuse afin de réduire l'activation des cellules microgliales et d'empêcher ainsi leur transition vers un phénotype délétère.

III- Discussion de l'étude 3

En considérant que l'interaction entre les nAChR- α 7 et les σ 1R exerce des effets neuroprotecteurs dans un modèle d'étude de la MA (injection du peptide A β_{25-35}), nous avons émis l'hypothèse que l'utilisation en combinaison d'agonistes ciblant ces deux types de récepteurs pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique dans le traitement des maladies neurodégénératives incluant la MP.

Dans cette étude, nous avons donc évalué les effets d'une combinaison entre un agoniste des nAChR- α 7 et un agoniste des σ 1R dans notre modèle de lésion partielle à la 6-OHDA chez le rat. Pour les nAChR- α 7, nous avons choisi le PHA543613 (N-[(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]furo[2,3-c]pyridine-5-carboxamide), un agoniste sélectif de ces récepteurs (Ki = 8,8 nM) (Beinat et al., 2015) dont les propriétés neuroprotectrices et anti-inflammatoires ont été montrées dans différents modèles animaux incluant des modèles d'hémorragie intracérébrale et des modèles de maladies neurodégénératives comme la MA et la maladie de Huntington (Krafft et al., 2012 ; 2013 ; 2017 ; Sadigh-Eteghad, 2015 ; Foucault-Fruchard et al., 2017 ; 2018). Dans le cadre de la MP, notre équipe a récemment montré dans un modèle de lésion partielle à la 6-OHDA chez le rat que le PHA543613 (6 mg/kg) exerce une protection partielle des terminaisons striatales des neurones dopaminergiques associée à une réduction de l'activation microgliale (Sérrière et al., 2015). Dans notre étude, nous avons donc logiquement utilisé la même dose de PHA543613 et nous l'avons administré *per os* car il est caractérisé par une pénétration rapide de la BHE et par une bonne biodisponibilité orale chez le rat (> 60%) (Wishka et al., 2006 ; Faghih et al., 2008).

Concernant les σ 1R, nous avons choisi d'utiliser le PRE-084 (2-(4-Morpholino)ethyl-1phenylcyclohexane-1-carboxylate), un agoniste sélectif de ces récepteurs (Ki = 2,2 nM) (Maurice, 1999) couramment repris dans les études pré-cliniques *in vivo*. De plus, il s'agit du seul agoniste ayant fait l'objet d'une étude dans le cadre de la MP au niveau pré-clinique (Francardo et al., 2014). Comme le PHA543613, il exerce une protection partielle des neurones dopaminergiques associée à une réduction de l'activation de la microglie dans un modèle d'intoxication à la 6-OHDA (Francardo et al., 2014). Dans cette même étude, une expérience pilote a montré que la dose de 1 mg/kg induit des effets neuroprotecteurs. Nous avons donc utilisé cette dose et nous avons injecté le PRE-084 par voie intra-péritonéale car cette voie d'administration est associée à des effets neuroprotecteurs et anti-inflammatoires de l'agoniste chez le rongeur dans différents modèles (Penas et al., 2011 ; Griesmaier et al., 2012 ; Mancuso et al., 2012 ; Peviani et al., 2014 ; Dong et al., 2016).

Nos résultats n'ont pas montré de différence significative au niveau comportemental chez les animaux traités (nombres de rotations ipsilatérales effectuées après administration d'amphétamine), suggérant que le traitement n'améliore pas le déficit moteur chez les rats lésés unilatéralement à la 6-OHDA. Afin d'évaluer les effets du traitement sur la dégénérescence des neurones dopaminergiques nigro-striataux, nous avons quantifié par autoradiographie sur coupes le DAT dans le striatum dont la densité reflète l'intégrité des terminaisons de ces neurones (Shih et al., 2006). Pour cela, nous avons utilisé le [125I]PE2I, un radioligand spécifique de ce transporteur (Chalon et al., 1999). Nous avons également compté le nombre de cellules TH positives dans la SN. Nos résultats ont montré que la fixation spécifique du [¹²⁵I]PE2I dans le striatum et le nombre de cellules TH positives dans la SN sont élevés et similaires du côté controlatéral pour tous les animaux (STC et SNC, respectivement), et significativement diminués du côté ipsilatéral (STI et SNI, respectivement) comme attendu après injection de la neurotoxine. Cependant, nous avons observé que la fixation spécifique du [¹²⁵I]PE2I et le nombre de cellules TH positives du côté ipsilatéral sont significativement augmentés pour le groupe PHA/PRE comparé au groupe contrôle, indiquant que le traitement préserve partiellement l'intégrité des neurones dopaminergiques nigro-striataux. De ce fait, nos résultats montrent que la combinaison entre le PHA543613 et le PRE-084 exerce des effets neuroprotecteurs dans le modèle de lésion partielle à la 6-OHDA chez le rat.

Nous avons également évalué les effets du traitement sur la neuroinflammation, plus particulièrement sur les réactions gliales incluant l'activation des cellules microgliales et des astrocytes. Pour l'activation microgliale, nous avons quantifié par autoradiographie sur coupes la densité striatale de la TSPO dont l'expression est dramatiquement augmentée lors de l'activation de ces cellules (Kim et Yu, 2015). Dans cet objectif, nous avons utilisé le [³H]PK-11195, un radioligand spécifique de la TSPO utilisé *in vitro* chez l'Homme et chez le rat (Doble et al., 1987 ; Dubois et al., 1988). Nous avons également évalué l'activation microgliale au niveau nigral avec un immunomarquage du CD11b dont l'expression est

augmentée lors de ce processus cellulaire (Roy et al., 2006). En parallèle, nous avons quantifié l'activation des astrocytes à la fois dans le striatum et la SN *via* un immunomarquage de la GFAP. Nos résultats ont montré que tous les marqueurs cellulaires étudiés sont significativement augmentés du côté ipsilatéral pour tous les animaux (STI et SNI), indiquant que la perte des neurones dopaminergiques nigro-striataux est associée à une activation importante des cellules microgliales et des astrocytes. Toutefois, nous avons constaté une diminution significative de l'expression de ces marqueurs dans le STI et la SNI pour le groupe PHA/PRE comparé au groupe contrôle, suggérant que le traitement atténue les réactions gliales associées à la perte des neuronale. Ainsi, nos résultats montrent que la combinaison entre le PHA543613 et le PRE-084 exerce des effets anti-inflammatoires dans le modèle de lésion partielle à la 6-OHDA chez le rat.

Il s'agit de la première étude concernant l'évaluation des effets potentiellement neuroprotecteurs d'une combinaison entre un agoniste des nAChR- α 7 et un agoniste des σ 1R dans un modèle de rat mimant les stades précoces de la MP. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser le PHA543613 pour les nAChR- α 7 et le PRE-084 pour les σ 1R, deux agonistes sélectifs ayant montrés séparément des effets neuroprotecteurs et anti-inflammatoires dans des modèles proches (Francardo et al., 2014 ; Sérrière et al., 2015). Compte tenu du faible nombre d'animaux utilisés dans les deux groupes expérimentaux, nous pouvons considérer que nos résultats sont préliminaires. Dans ce contexte, ils doivent être confirmés et complétés avec d'autres analyses comme l'évaluation directe et longitudinale in vivo du DAT ou de la TSPO par des modalités de neuroimagerie comme la TEP et l'évaluation de cette combinaison sur la polarisation microgliale M1/M2. Nos données indiquent que le PHA543613 en combinaison avec le PRE-084 préserve partiellement l'intégrité des neurones dopaminergiques nigrostriataux et réduit les réactions gliales chez le rat lésé unilatéralement à la 6-OHDA, confirmant ainsi l'interaction spécifique entre les nAChR- α 7 et les σ 1R. De ce fait, la combinaison entre le PHA543613 et le PRE-084 pourrait constituer une nouvelle entité biochimique prometteuse dans le traitement de la MP.

Conclusion

L'ensemble de ce travail de thèse a consisté à mettre au point et à caractériser un modèle de lésion partielle à la 6-OHDA chez le rat, puis d'évaluer le potentiel neuroprotecteur d'une stratégie à visée anti-inflammatoire.

Dans une première étape, nous avons mis en place le modèle et exploré le processus neurodégénératif et la neuroinflammation en utilisant différentes approches expérimentales. Les résultats ont montré une dégénérescence partielle et reproductible des neurones dopaminergiques associée à une neuroinflammation marquée. En parallèle, nos analyses métabolomiques ont révélé des altérations spécifiques de plusieurs métabolites et voies métaboliques, apportant ainsi de nouveaux éléments dans la compréhension des mécanismes intervenant dans le processus neurodégénératif. Toutefois, il sera nécessaire d'explorer plus précisément ces altérations afin d'élaborer de nouvelles approches thérapeutiques.

Dans une deuxième étude, nous avons analysé dans le modèle de manière longitudinale le profil d'expression des nAChR-α7 par imagerie TEP avec le [¹⁸F]ASEM. Les résultats ont permis de mettre en évidence des modifications transitoires de la densité de ces récepteurs qui pourraient être liées à des réponses microgliales biphasiques (M2 puis M1) associées à la cinétique de la dégénérescence neuronale. Il serait donc intéressant de confirmer dans les mêmes conditions ce type de cinétique avec des analyses par immunofluorescence des populations microgliales à différents temps après administration de la neurotoxine.

Dans une troisième étude, nous avons évalué pour la première fois les effets d'une combinaison entre un agoniste des nAChR- α 7 et un agoniste des σ 1R dans le modèle de lésion partielle à la 6-OHDA. Les résultats ont permis de montrer que ce type de traitement préserve partiellement l'intégrité des neurones dopaminergiques et réduit les réactions gliales chez les rats lésés. Ces résultats devront être confirmés et complétés avec d'autres analyses comme l'évaluation sur la polarisation microgliale M1/M2. Il serait intéressant de confronter ces résultats avec ceux obtenus dans le cadre d'un traitement avec chaque agoniste indépendemment, afin de déterminer si les effets produits par la combinaison sont plus bénéfiques dans l'atténuation de la perte dopaminergique et les processus neuroinflammatoires. Il serait également intéressant d'étudier l'impact de ce type de combinaison sur le métabolome dans le but d'identifier potentiellement des voies neuroprotectrices.

Bibliographie

Α

Ajmo C. T. Jr., Vernon D. O., Collier L., Pennypacker K. R., Cuevas J. 2006. Sigma receptor activation reduces infarct size at 24 hours after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Curr Neurovasc Res*, 3 (2): 89-98.

Afshin-Majd S., Bashiri K., Kiasalari Z., Baluchnejadmojarad T., Sedaghat R., Roghani M. 2017. Acetyl-l-carnitine protects dopaminergic nigrostriatal pathway in 6-hydroxydopamineinduced model of Parkinson's disease in the rat. *Biomed Pharmacother*,89: 1-9.

Alam Z. I., Jenner A., Daniel S. E., Lees A. J., Cairns N., Marsden C. D., Jenner P., Halliwell
B. 1997. Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in
8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem*, 69 (3) : 1196-1203.

Alexander G. E., Crutcher M. D. 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci*, 13 (7) : 266-271.

Alvarez-Erviti L., Rodriguez-Oroz M. C., Cooper J. M., Caballero C., Ferrer I., Obeso J. A., Schapira A. H. 2010. Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. *Arch Neurol*, 67 (12) : 1464-1472.

Alves G., Forsaa E. B., Pedersen K. F., Dreetz Gjerstad M., Larsen J. P. 2008. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol*, 255 Suppl 5 : 18-32.

Ambrosi G., Kustrimovic N., Siani F., Rasini E., Cerri S., Ghezzi C., Dicorato G., Caputo S., Marino F., Cosentino M., Blandini F. 2017. Complex Changes in the Innate and Adaptive Immunity Accompany Progressive Degeneration of the Nigrostriatal Pathway Induced by Intrastriatal Injection of 6-Hydroxydopamine in the Rat. *Neurotox Res*, 32 (1) : 71-81.

Anichtchik O. V., Rinne J. O., Kalimo H., Panula P. 2000. An altered histaminergic innervation of the substantia nigra in Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 163(1): 20-30.

Anglade P., Vyas S., Javoy-Agid F., Herrero M. T., Michel P. P., Marquez J., Mouatt-Prigent A., Ruberg M., Hirsch E. C., Agid Y. 1997. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol*, 12(1): 25-31.

Arai H., Furuya T., Yasuda T., Miura M., Mizuno Y., Mochizuki H. 2004. Neurotoxic effects of lipopolysaccharide on nigral dopaminergic neurons are mediated by microglial activation, interleukin-1beta, and expression of caspase-11 in mice. *J Biol Chem*, 279(49) : 51647-51653.

Ares-Santos S., Granado N., Espadas I., Martinez-Murillo R., Moratalla R. 2014. Methamphetamine causes degeneration of dopamine cell bodies and terminals of the nigrostriatal pathway evidenced by silver staining. *Neuropsychopharmacology*, 39(5) : 1066-1080.

Arlicot N., Vercouillie J., Malherbe C., Bidault R., Gissot V., Maia S., Barantin L., Cottier J.P., Deloye J. B., Guilloteau D., Ribeiro M. J. 2017. PET imaging of Dopamine Transporter with 18F-LBT999: first human exploration. *J Nucl Med*, 58 : 276.

Audinat E., Arnoux I. 2014. Microglia: immune cells sculpting and controlling neuronal synapses. *Med Sci (Paris)*, 30 (2) : 153-159.

Azulay J. P., Witjas T., Eusebio A. 2017. No motor signs in Parkinson's disease. *Presse Med*, 46 (2 Pt 1) : 195-201.

B

Banati R. B., Daniel S. E., Blunt S. B. 1998. Glial pathology but absence of apoptotic nigral neurons in long-standing Parkinson's disease. *Mov Disord*, 13 (2) : 221-227.

Barcia C. 2013. Glial-mediated inflammation underlying parkinsonism. *Scientifica (Cairo)*, 2013 : 357805.

Barker R. A., Parmar M., Studer L., Takahashi J. 2017. Human Trials of Stem Cell-Derived Dopamine Neurons for Parkinson's Disease: Dawn of a New Era. *Cell Stem Cell*, 21 (5) : 569-573.

Barneoud P., Parmentier S., Mazadier M., Miquet J. M., Boireau A., Dubedat P., Blanchard J.C. 1995. Effects of complete and partial lesions of the dopaminergic mesotelencephalic system on skilled forelimb use in the rat. *Neuroscience*, 67 (4): 837-848.

Barrow T. R. 2015. Cell replacement therapy in Parkinson's disease. *BioscienceHorizons*, 8.

Barthe N. 2007. High-resolution beta imaging. J mednuc (Paris), 31 (4): 193-201.

Bartus R. T., Baumann T. L., Siffert J., Herzog C. D., Alterman R., Boulis N., Turner D. A., Stacy M., Lang A. E., Lozano A. M., Olanow C. W. 2013. Safety/feasibility of targeting the substantia nigra with AAV2-neurturin in Parkinson patients. *Neurology*, 80 (18) : 1698-1701.

Beal M. F. 2001. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*, 2 (5) : 325-334.

Beaulieu J. M., Gainetdinov R. R. 2011. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev*, 63 (1) : 182-217.

Beinat C., Banister S. D., Herrera M., Law V., Kassiou M. 2015. The therapeutic potential of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor (alpha7 nAChR) agonists for the treatment of the cognitive deficits associated with schizophrenia. *CNS Drugs*, 29(7) : 529-542.

Beitz J. M. 2014. Parkinson's disease: a review. Front Biosci (Schol Ed), 6: 65-74.

Benabid A. L. 2003. Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol*, 13(6): 696-706.

Bentea E., Verbruggen L., Massie A. 2017. The Proteasome Inhibition Model of Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis*, 7 (1) : 31-63.

Berg J., Roch M., Altschuler J., Winter C., Schwerk A., Kurtz A., Steiner B. 2015. Human adipose-derived mesenchymal stem cells improve motor functions and are neuroprotective in the 6-hydroxydopamine-rat model for Parkinson's disease when cultured in monolayer cultures but suppress hippocampal neurogenesis and hippocampal memory function when cultured in spheroids. *Stem Cell Rev*, 11 (1): 133-149.

Bernik T. R., Friedman S. G., Ochani M., DiRaimo R., Ulloa L., Yang H., Sudan S., Czura C. J., Ivanova S. M., Tracey K. J. 2002. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Exp Med*, 195 (6) : 781-788.

Bertrand D., Lee C. H., Flood D., Marger F., Donnelly-Roberts D. 2015. Therapeutic Potential of alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Pharmacol Rev*, 67 (4) : 1025-1073.

Beyer K., Domingo-Sabat M., Ariza A. 2009. Molecular pathology of Lewy body diseases. *Int J Mol Sci*, 10 (3) : 724-745.

Björklund A., Dunnett S. B. 2007. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci*, 30 (5) : 194-202.

Björklund A., Stenevi U. 1979. Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Res*, 177 (3) : 555-560.

Björklund L. M., Sanchez-Pernaute R., Chung S., Andersson T., Chen I. Y., McNaught K. S., Brownell A. L., Jenkins B. G., Wahlestedt C., Kim K. S., Isacson O. 2002. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (4) : 2344-2349.

Blandini F., Armentero M. T. 2012. Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J*, 279 (7) : 1156-1166.

Blandini F., Armentero M. T., Martignoni E. 2008. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism Relat Disord*, 14 Suppl 2 : S124-129.
Blesa J., Phani S., Jackson-Lewis V., Przedborski S. 2012. Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J Biomed Biotechnol*, 2012 : 845618.

Blum D., Torch S., Lambeng N., Nissou M., Benabid A. L., Sadoul R., Verna J. M. 2001. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 65 (2) : 135-172.

Blum-Degen D., Muller T., Kuhn W., Gerlach M., Przuntek H., Riederer P. 1995. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett*, 202 (1-2) : 17-20.

Boka G., Anglade P., Wallach D., Javoy-Agid F., Agid Y., Hirsch E. C. 1994. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 172 (1-2): 151-154.

Bonnet A. M., Hergueta T. La maladie de Parkinson (chapitre 1). In : Bonnet A. M., Hergueta T. (John Libbey), La maladie de Parkinson au jour le jour 2ème édition. Lieu d'édition : John Libbey, Septembre 2016, 224 p.

Bordet R. 2004. Central dopamine receptors: general considerations (Part 1). *Rev Neurol* (*Paris*), 160 (8-9) : 862-870.

Bordia T., McGregor M., Papke R. L., Decker M. W., McIntosh J. M., Quik M. 2015. The alpha7 nicotinic receptor agonist ABT-107 protects against nigrostriatal damage in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions. *Exp Neurol*, 263 : 277-284.

Borovikova L. V., Ivanova S., Zhang M., Yang H., Botchkina G. I., Watkins L. R., Wang H., Abumrad N., Eaton J. W., Tracey K. J. 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, 405 (6785) : 458-462.

Bouchez G., Sensebe L., Vourc'h P., Garreau L., Bodard S., Rico A., Guilloteau D., Charbord P., Besnard J. C., Chalon S. 2008. Partial recovery of dopaminergic pathway after graft of adult mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson's disease. *Neurochem Int*, 52 (7) :

1332-1342.

Brahmachari S., Fung Y. K., Pahan Y. K. 2006. Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. *J Neurosci*, 26 (18) : 4930-4939.

Breydo L., Wu J. W., Uversky V. N. 2012. Alpha-synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1822 (2) : 261-285.

Bronstein D. M., Perez-Otano I., Sun V., Mullis Sawin S. B., Chan J., Wu G. C., Hudson P. M., Kong L. Y., Hong J. S., McMillian M. K. 1995. Glia-dependent neurotoxicity and neuroprotection in mesencephalic cultures. *Brain Res*, 704 (1) : 112-116.

Brooks D. J., Pavese N. 2011. Imaging biomarkers in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 95 (4): 614-628.

Bukhatwa S., Zeng B. Y., Rose S., Jenner P. 2010. A comparison of changes in proteasomal subunit expression in the substantia nigra in Parkinson's disease, multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy. *Brain Res*, 1326 : 174-183.

С

Calabresi P., Picconi B., Tozzi A., Ghiglieri V., Di Filippo M. 2014. Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat Neurosci*, 17 (8) : 1022-1030.

Carey R. J. 1990. Dopamine receptors mediate drug-induced but not Pavlovian conditioned contralateral rotation in the unilateral 6-OHDA animal model. *Brain Res*, 515 (1-2) : 292-298.

Carman L. S., Gage F. H., Shults C. W. 1991. Partial lesion of the substantia nigra: relation between extent of lesion and rotational behavior. *Brain Res*, 553 (2) : 275-283.

Castaño A., Herrera A. J., Cano J., Machado A. 1998. Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system. *J Neurochem*, 70 (4) : 1584-1592.

Casteels C., Lauwers E., Bormans G., Baekelandt V., Van Laere K. 2008. Metabolicdopaminergic mapping of the 6-hydroxydopamine rat model for Parkinson's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 35(1): 124-134.

Caudle W. M., Guillot T. S., Lazo C. R., Miller G. W. 2012. Industrial toxicants and Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, 33 (2) : 178-188.

Cebrian C., Loike J. D., Sulzer D. 2015. Neuroinflammation in Parkinson's disease animal models: a cell stress response or a step in neurodegeneration? *Curr Top Behav Neurosci*, 22 : 237-270.

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)n ortropane as a selective and potent inhibitor of the neuronal dopamine transporter. *J Pharmacol Exp Ther*, 291 (2) : 648-654.

Chao Y., Wong S. C., Tan E. K. 2014. Evidence of inflammatory system involvement in Parkinson's disease. *Biomed Res Int*, 2014: 308654.

Chen D., Fu W., Zhuang W., Lv C., Li F., Wang X. 2017a. Therapeutic effects of intranigral transplantation of mesenchymal stem cells in rat models of Parkinson's disease. *J Neurosci Res*, 95 (3) : 907-917.

Chen M. K., Guilarte T. R. 2008. Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacol Ther*, 118(1): 1-17.

Chen W., Hopfner F., Becktepe J. S., Deuschl G. 2017b. Rest tremor revisited: Parkinson's disease and other disorders. *Transl Neurodegener*, 6 : 16.

Cherry J. D., Olschowka J. A., O'Banion M. K. 2014. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation*, 11 : 98.

Chinta S. J., Andersen J. K. 2005. Dopaminergic neurons. Int J Biochem Cell Biol, 37 (5) :

942-946.

Christine C. W., Starr P. A., Larson P. S., Eberling J. L., Jagust W. J., Hawkins R. A., VanBrocklin H. F., Wright J. F., Bankiewicz K. S., Aminoff M. J. 2009. Safety and tolerability of putaminal AADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology*, 73 (20) : 1662-1669.

Cicchetti F., Lapointe N., Roberge-Tremblay A., Saint-Pierre M., Jimenez L., Ficke B. W., Gross R. E. 2005. Systemic exposure to paraquat and maneb models early Parkinson's disease in young adult rats. *Neurobiol Dis*, 20 (2) : 360-371.

Cobos E. J., Entrena J. M., Nieto F. R., Cendan C. M., Del Pozo E. 2008. Pharmacology and therapeutic potential of sigma(1) receptor ligands. *Curr Neuropharmacol*, 6 (4) : 344-366.

Collins L. M., Toulouse A., Connor T. J., Nolan Y. M. 2012. Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, 62 (7) : 2154-2168.

Coughlin J. M., Du Y., Rosenthal H. B., Slania S., Min Koo S., Park A., Solomon G., Vranesic M., Antonsdottir I., Speck C. L., Rootes-Murdy K., Lerner A., Rowe S. P., Wang Y., Lesniak W. G., Minn I., Bakker A., Smith G. S., Dannals R. F., Kuwabara H., Horti A., Wong D. F., Pomper M. G. 2018. The distribution of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in healthy aging: An in vivo positron emission tomography study with [(18)F]ASEM. *Neuroimage*,165: 118-124.

Damont A., Garcia-Argote S., Buisson D. A., Rousseau B., Dolle F. 2015. Efficient tritiation of the translocator protein (18 kDa) selective ligand DPA-714. *J Labelled Comp Radiopharm*, 58, (1) : 1-6.

D

Dauer W., Przedborski S. 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39 (6) : 889-909.

Dawson T. M., Ko H. S., Dawson V. L. 2010. Genetic animal models of Parkinson's disease. *Neuron*, 66 (5) : 646-661.

de Lau L. M., Breteler M. M. 2006. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, 5 (6): 525-535.

Decressac M., Mattsson B., Weikop P., Lundblad M., Jakobsson J., Björklund A. 2013. TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from alpha-synuclein toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 (19) : E1817-1826.

Delamarre A., Meissner W. G. 2017. Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease. *Presse Med*, 46 (2 Pt 1) : 175-181.

Deng H., Wang P., Jankovic J. 2018. The genetics of Parkinson disease. *Ageing Res Rev*, 42: 72-85.

Dentresangle C., Le Cavorsin M., Savasta M., Leviel V. 2001. Increased extracellular DA and normal evoked DA release in the rat striatum after a partial lesion of the substantia nigra. *Brain Res*, 893 (1-2) : 178-185.

Deumens R., Blokland A., Prickaerts J. 2002. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol*, 175 (2) : 303-317.

Di Paolo T., Grégoire L., Feuerbach D., Elbast W., Weiss M., Gomez-Mancilla B. 2014. AQW051, a novel and selective nicotinic acetylcholine receptor alpha7 partial agonist, reduces 1-Dopa-induced dyskinesias and extends the duration of 1-Dopa effects in parkinsonian monkeys. *Parkinsonism Relat Disord*, 20 (11) : 1119-1123.

Dias V., Junn E., Mouradian M. M. 2013. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis*, 3 (4) : 461-491.

Dieme B., Lefevre A., Nadal-Desbarats L., Galineau L., Madji Hounoum B., Montigny F., Blasco H., Andres C. R., Emond P., Mavel S. 2017. Workflow methodology for rat brain metabolome exploration using NMR, LC-MS and GC-MS analytical platforms. *J Pharm* Biomed Anal, 142 : 270-278.

Doble A., Malgouris C., Daniel M., Daniel N., Imbault F., Basbaum A., Uzan A., Gueremy C., Le Fur G. 1987. Labelling of peripheral-type benzodiazepine binding sites in human brain with [3H]PK 11195: anatomical and subcellular distribution. *Brain Res Bull*, **18** (1) : 49-61.

Doi D., Samata B., Katsukawa M., Kikuchi T., Morizane A., Ono Y., Sekiguchi K., Nakagawa M., Parmar M., Takahashi J. 2014. Isolation of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitors by cell sorting for successful transplantation. *Stem Cell Reports*, 2 (3) : 337-350.

Dong H., Ma Y., Ren Z., Xu B., Zhang Y., Chen J., Yang B. 2016. Sigma-1 Receptor Modulates Neuroinflammation After Traumatic Brain Injury. *Cell Mol Neurobiol*, 36 (5) : 639-645.

Dubois A., Benavides J., Peny B., Duverger D., Fage D., Gotti B., MacKenzie E. T., Scatton B. 1988. Imaging of primary and remote ischaemic and excitotoxic brain lesions. An autoradiographic study of peripheral type benzodiazepine binding sites in the rat and cat. *Brain Res*, 445(1): 77-90.

Duty S., Jenner P. 2011. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol*, 164 (4) : 1357-1391.

E

Eberling J. L., Kells A. P., Pivirotto P., Beyer J., Bringas J., Federoff H. J., Forsayeth J., Bankiewicz K. S. 2009. Functional effects of AAV2-GDNF on the dopaminergic nigrostriatal pathway in parkinsonian rhesus monkeys. *Hum Gene Ther*, 20 (5) : 511-518.

Edison P., Ahmed I., Fan Z., Hinz R., Gelosa G., Ray Chaudhuri K., Walker Z., Turkheimer F. E., Brooks D. J. 2013. Microglia, amyloid, and glucose metabolism in Parkinson's disease with and without dementia. *Neuropsychopharmacology*, 38 (6) : 938-949.

Egea J., Buendia I., Parada E., Navarro E., Leon R., Lopez M. G. 2015. Anti-inflammatory role of microglial alpha7 nAChRs and its role in neuroprotection. *Biochem Pharmacol*, 97 (4) : 463-472.

Elbaz A., Bower J. H., Maraganore D. M., McDonnell S. K., Peterson B. J., Ahlskog J. E., Schaid D. J., Rocca W. A. 2002. Risk tables for parkinsonism and Parkinson's disease. *J Clin Epidemiol*, 55 (1) : 25-31.

Engeln M., Fasano S., Ahmed S. H., Cador M., Baekelandt V., Bezard E., Fernagut P. O. 2013. Levodopa gains psychostimulant-like properties after nigral dopaminergic loss. *Ann Neurol*, 74 (1): 140-144.

Eslamboli A., Cummings R. M., Ridley R. M., Baker H. F., Muzyczka N., Burger C., Mandel R. J., Kirik D., Annett L. E. 2003. Recombinant adeno-associated viral vector (rAAV) delivery of GDNF provides protection against 6-OHDA lesion in the common marmoset monkey (Callithrix jacchus). *Exp Neurol*, 184 (1) : 536-548.

Eslamboli A., Georgievska B., Ridley R. M., Baker H. F., Muzyczka N., Burger C., Mandel R. J., Annett L., Kirik D. 2005. Continuous low-level glial cell line-derived neurotrophic factor delivery using recombinant adeno-associated viral vectors provides neuroprotection and induces behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 25 (4) : 769-777.

F

Faghih R., Gopalakrishnan M., Briggs C. A. 2008. Allosteric modulators of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *J Med Chem*, 51(4) : 701-712.

Feng Y., Jankovic J., Wu Y. C. 2015. Epigenetic mechanisms in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 349 (1-2) : 3-9.

Fernandez H. H. 2012. Updates in the medical management of Parkinson disease. *Cleve Clin J Med*, 79 (1): 28-35.

Ferreira G. C., McKenna M. C. 2017. L-Carnitine and Acetyl-L-carnitine Roles and Neuroprotection in Developing Brain. *Neurochem Res*, 42(6) : 1661-1675.

Floor E., Wetzel M. G. 1998. Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. *J Neurochem*, 70 (1) : 268-275.

Fornai F., Lenzi P., Gesi M., Ferrucci M., Lazzeri G., Busceti C. L., Ruffoli R., Soldani P., Ruggieri S., Alessandri M. G., Paparelli A. 2003. Fine structure and biochemical mechanisms underlying nigrostriatal inclusions and cell death after proteasome inhibition. *J Neurosci*, 23 (26): 8955-8966.

Foucault-Fruchard L., Domene A., Page G., Windsor M., Emond P., Rodrigues N., Dolle F., Damont A., Buron F., Routier S., Chalon S., Antier D. 2017. Neuroprotective effect of the alpha 7 nicotinic receptor agonist PHA 543613 in an in vivo excitotoxic adult rat model. *Neuroscience*, 356: 52-63.

Foucault-Fruchard L., Tronel C., Bodard S., Gulhan Z., Busson J., Chalon S., Antier D. 2018. Alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor agonist treatment in a rat model of Huntington's disease and involvement of heme oxygenase-1. *Neural Regen Res*, 13(4): 737-741.

Francardo V., Bez F., Wieloch T., Nissbrandt H., Ruscher K., Cenci M. A. 2014. Pharmacological stimulation of sigma-1 receptors has neurorestorative effects in experimental parkinsonism. *Brain*, 137(Pt 7) : 1998-2014.

Freed C. R., Breeze R. E., Rosenberg N. L., Schneck S. A., Kriek E., Qi J. X., Lone T., Zhang Y. B., Snyder J. A., Wells T. H. and et al. 1992. Survival of implanted fetal dopamine cells and neurologic improvement 12 to 46 months after transplantation for Parkinson's disease. *N Engl J Med*, 327 (22) : 1549-1555.

G

Gao H. M., Jiang J., Wilson B., Zhang W., Hong J. S., Liu B. 2002. Microglial activation-

mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem*, 81 (6) : 1285-1297.

Gao H. C., Zhu H., Song C. Y., Lin L., Xiang Y., Yan Z. H., Bai G. H., Ye F. Q., Li X. K. 2013. Metabolic changes detected by ex vivo high resolution 1H NMR spectroscopy in the striatum of 6-OHDA-induced Parkinson's rat. *Mol Neurobiol*,47(1) : 123-130.

Gao Y., Kellar K. J., Yasuda R. P., Tran T., Xiao Y., Dannals R. F., Horti A. G. 2013. Derivatives of dibenzothiophene for positron emission tomography imaging of alpha7-nicotinic acetylcholine receptors. *J Med Chem*, 56 (19) : 7574-7589.

Garcia-Esparcia P., Llorens F., Carmona M., Ferrer I. 2014. Complex deregulation and expression of cytokines and mediators of the immune response in Parkinson's disease brain is region dependent. *Brain Pathol*, 24 (6) : 584-598.

Gayle D. A., Ling Z., Tong C., Landers T., Lipton J. W., Carvey P. M. 2002. Lipopolysaccharide (LPS)-induced dopamine cell loss in culture: roles of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and nitric oxide. *Brain Res Dev Brain Res*, 133 (1) : 27-35. Gerhard A. 2016. TSPO imaging in parkinsonian disorders. *Clin Transl Imaging*, 4 : 183-190.

Gerhard A., Pavese N., Hotton G., Turkheimer F., Es M., Hammers A., Eggert K., Oertel W., Banati R. B., Brooks D. J. 2006. In vivo imaging of microglial activation with 11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 21 (2) : 404-412.

German C. L., Baladi M. G., McFadden L. M., Hanson G. R., Fleckenstein A. E. 2015. Regulation of the Dopamine and Vesicular Monoamine Transporters: Pharmacological Targets and Implications for Disease. *Pharmacol Rev*, 67 (4) : 1005-1024.

Ginhoux F., Greter M., Leboeuf M., Nandi S., See P., Gokhan S., Mehler M. F., Conway S. J., Ng L. G., Stanley E. R., Samokhvalov I. M., Merad M. 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 330 (6005) : 841-845.

Glajch K. E., Fleming S. M., Surmeier D. J., Osten P. 2012. Sensorimotor assessment of the unilateral 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*, 230 (2) : 309-316.

Goldman S. M. 2014. Environmental toxins and Parkinson's disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 54 : 141-164.

Gomes-Trolin C., Nygren I., Aquilonius S. M., Askmark H. 2002. Increased red blood cell polyamines in ALS and Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 177(2) : 515-520.

Gordon S., Martinez F. O. 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, 32 (5) : 593-604.

Granado N., Escobedo I., O'Shea E., Colado I., Moratalla R. 2008a. Early loss of dopaminergic terminals in striosomes after MDMA administration to mice. *Synapse*, 62 (1) : 80-84.

Granado N., O'Shea E., Bove J., Vila M., Colado M. I., Moratalla R. 2008b. Persistent MDMA-induced dopaminergic neurotoxicity in the striatum and substantia nigra of mice. *J Neurochem*, 107 (4) : 1102-1112.

Grealish S., Diguet E., Kirkeby A., Mattsson B., Heuer A., Bramoulle Y., Van Camp N., Perrier A. L., Hantraye P., Björklund A., Parmar M. 2014. Human ESC-derived dopamine neurons show similar preclinical efficacy and potency to fetal neurons when grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Cell Stem Cell*, 15(5): 653-665.

Greenamyre J. T., Cannon J. R., Drolet R., Mastroberardino P. G. 2010. Lessons from the rotenone model of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci*, 31 (4) : 141-142 ; author reply 142-143.

Griesmaier E., Posod A., Gross M., Neubauer V., Wegleiter K., Hermann M., Urbanek M., Keller M., Kiechl-Kohlendorfer U. 2012. Neuroprotective effects of the sigma-1 receptor ligand PRE-084 against excitotoxic perinatal brain injury in newborn mice. *Exp Neurol*,

Gubellini P., Kachidian P. 2015. Animal models of Parkinson's disease: An updated overview. *Rev Neurol (Paris)*, 171 (11) : 750-761.

Gugliandolo A., Bramanti P., Mazzon E. 2017. Mesenchymal stem cell therapy in Parkinson's disease animal models. *Curr Res Transl Med*, 65 (2) : 51-60.

Guridi J., Gonzalez-Redondo R., Obeso J. A. 2012. Clinical features, pathophysiology, and treatment of levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis*, 2012 : 943159.

Η

Hagell P., Piccini P., Björklund A., Brundin P., Rehncrona S., Widner H., Crabb L., Pavese N., Oertel W. H., Quinn N., Brooks D. J., Lindvall O. 2002. Dyskinesias following neural transplantation in Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, 5 (7) : 627-628.

Han F., Wang W., Chen B., Chen C., Li S., Lu X., Duan J., Zhang Y., Zhang Y. A., Guo W., Li G. 2015. Human induced pluripotent stem cell-derived neurons improve motor asymmetry in a 6-hydroxydopamine-induced rat model of Parkinson's disease. *Cytotherapy*, 17 (5) : 665-679.

Han Z., Shen F., He Y., Degos V., Camus M., Maze M., Young W. L., Su H. 2014. Activation of alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor reduces ischemic stroke injury through reduction of pro-inflammatory macrophages and oxidative stress. *PLoS One*, 9 (8) : e105711.

Handa A. K., Fatima T., Mattoo A. K. 2018. Polyamines: Bio-Molecules with Diverse Functions in Plant and Human Health and Disease. *Front Chem*,6: 10.

Hauser R. A., Freeman T. B., Snow B. J., Nauert M., Gauger L., Kordower J. H., Olanow C.
W. 1999. Long-term evaluation of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson disease.
Arch Neurol, 56 (2): 179-187.

Hayashi T., Wakao S., Kitada M., Ose T., Watabe H., Kuroda Y., Mitsunaga K., Matsuse D., Shigemoto T., Ito A., Ikeda H., Fukuyama H., Onoe H., Tabata Y., Dezawa M. 2013. Autologous mesenchymal stem cell-derived dopaminergic neurons function in parkinsonian macaques. *J Clin Invest*, 123 (1) : 272-284.

He Q., Yu W., Wu J., Chen C., Lou Z., Zhang Q., Zhao J., Wang J., Xiao B. 2013. Intranasal LPS-mediated Parkinson's model challenges the pathogenesis of nasal cavity and environmental toxins. *PLoS One*, 8 (11) : e78418.

Hefti F., Melamed E., Wurtman R. J. 1980. Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization. *Brain Res*, 195 (1): 123-137.
Hegarty S. V., O'Keeffe G. W., Sullivan A. M. 2014. Neurotrophic factors: from neurodevelopmental regulators to novel therapies for Parkinson's disease. *Neural Regen Res*, 9 (19): 1708-1711.

Heikkila R. E., Nicklas W. J., Vyas I., Duvoisin R. C. 1985. Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. *Neurosci Lett*, 62 (3) : 389-394.

Hernandez-Baltazar D., Zavala-Flores L. M., Villanueva-Olivo A. 2017. The 6hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. *Neurologia*, 32 (8) : 533-539.

Herrera A. J., Castano A., Venero J. L., Cano J., Machado A. 2000. The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system. *Neurobiol Dis*, 7 (4) : 429-447.

Hillmer A. T., Li S., Zheng M. Q., Scheunemann M., Lin S. F., Nabulsi N., Holden D., Pracitto R., Labaree D., Ropchan J., Teodoro R., Deuther-Conrad W., Esterlis I., Cosgrove K. P., Brust P., Carson R. E., Huang Y. 2017. PET imaging of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: a comparative study of [(18)F]ASEM and [(18)F]DBT-10 in nonhuman primates, and further evaluation of [(18)F]ASEM in humans. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 44 (6) : 1042-1050.

Hoehn M. M., Yahr M. D. 1967. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology*, 17 (5) : 427-442.

Horti A. G. 2015. Development of [(18)F]ASEM, a specific radiotracer for quantification of the alpha7-nAChR with positron-emission tomography. *Biochem Pharmacol*, 97 (4) : 566-575.

Howard C. D., Keefe K. A., Garris P. A., Daberkow D. P. 2011. Methamphetamine neurotoxicity decreases phasic, but not tonic, dopaminergic signaling in the rat striatum. *J Neurochem*, 118 (4) : 668-676.

Hu X., Li P., Guo Y., Wang H., Leak R. K., Chen S., Gao Y., Chen J. 2012. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 43 (11) : 3063-3070.

Hudson J. L., van Horne C. G., Stromberg I., Brock S., Clayton J., Masserano J., Hoffer B. J., Gerhardt G. A. 1993. Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res*, 626 (1-2) : 167-174.

Hunter R. L., Cheng B., Choi D. Y., Liu M., Liu S., Cass W. A., Bing G. 2009. Intrastriatal lipopolysaccharide injection induces parkinsonism in C57/B6 mice. *J Neurosci Res*, 87 (8) : 1913-1921.

Ι

Iancu R., Mohapel P., Brundin P., Paul G. 2005. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behav Brain Res*, 162 (1) : 1-10.

Iannaccone S., Cerami C., Alessio M., Garibotto V., Panzacchi A., Olivieri S., Gelsomino G., Moresco R. M., Perani D. 2013. In vivo microglia activation in very early dementia with Lewy bodies, comparison with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 19 (1) : 47-52.

Imamura K., Hishikawa N., Sawada M., Nagatsu T., Yoshida M., Hashizume Y. 2003. Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol*, 106 (6) : 518-526.

Iravani M. M., Leung C. C., Sadeghian M., Haddon C. O., Rose S., Jenner P. 2005. The acute and the long-term effects of nigral lipopolysaccharide administration on dopaminergic dysfunction and glial cell activation. *Eur J Neurosci*, 22 (2) : 317-330.

J

Jackson-Lewis V., Przedborski S. 2007. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nat Protoc*, 2 (1) : 141-151.

Jagmag S. A., Tripathi, N., Shukla S. D., Maiti S., Khurana S. 2015. Evaluation of Models of Parkinson's Disease. *Front Neurosci*, 9 : 503.

Jang D. P., Min H. K., Lee S. Y., Kim I. Y., Park H. W., Im Y. H., Lee S., Sim J., Kim Y. B., Paek S. H., Cho Z. H. 2012. Functional neuroimaging of the 6-OHDA lesion rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 513 (2) : 187-192.

Jankovic J. 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79 (4) : 368-376.

Jha M. K., Lee W. H., Suk K. 2016. Functional polarization of neuroglia: Implications in neuroinflammation and neurological disorders. *Biochem Pharmacol*, 103 : 1-16.

Johnson M. E., Bobrovskaya L. 2015. An update on the rotenone models of Parkinson's disease: their ability to reproduce the features of clinical disease and model gene-environment interactions. *Neurotoxicology*, 46 : 101-116.

Johnston L. C., Eberling J., Pivirotto P., Hadaczek P., Federoff H. J., Forsayeth J., Bankiewicz K. S.2009. Clinically relevant effects of convection-enhanced delivery of AAV2-GDNF on the dopaminergic nigrostriatal pathway in aged rhesus monkeys. *Hum Gene Ther*, 20 (5) : 497-510.

Jučaite A. 2002. Dopaminergic modulation of cerebral activity and cognitive functions. *Medicina (Kaunas)*, 38 (4) : 357-362.

Κ

Kalkman H. O., Feuerbach D. 2016. Modulatory effects of alpha7 nAChRs on the immune system and its relevance for CNS disorders. *Cell Mol Life Sci*, 73 (13) : 2511-2530.

Kang E. J., Lee Y. H., Kim M. J., Lee Y. M., Kumar B. M., Jeon B. G., Ock S. A., Kim H. J., Rho G. J. 2013. Transplantation of porcine umbilical cord matrix mesenchymal stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. *J Tissue Eng Regen Med*, 7 (3) : 169-182.

Kaplitt M. G., Feigin A., Tang C., Fitzsimons H. L., Mattis P., Lawlor P. A., Bland R. J., Young D., Strybing K., Eidelberg D., During M. J. 2007. Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet*, 369 (9579) : 2097-2105.

Kasten M., Chade A., Tanner C. M. 2007. Epidemiology of Parkinson's disease. *Handb Clin Neurol*, 83 : 129-151.

Kells A. P., Eberling J., Su X., Pivirotto P., Bringas J., Hadaczek P., Narrow W. C., Bowers W. J., Federoff H. J., Forsayeth J., Bankiewicz K. S. 2010. Regeneration of the MPTP-lesioned dopaminergic system after convection-enhanced delivery of AAV2-GDNF. J Neurosci, 30 (28): 9567-9577.

Kikuchi T., Morizane A., Doi D., Magotani H., Onoe H., Hayashi T., Mizuma H., Takara S., Takahashi R., Inoue H., Morita S., Yamamoto M., Okita K., Nakagawa M., Parmar M., Takahashi J. 2017a. Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. Nature, 548 (7669) : 592-596.

Kikuchi T., Morizane A., Doi D., Okita K., Nakagawa M., Yamakado H., Inoue H., Takahashi R., Takahashi J. 2017b. Idiopathic Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells function as midbrain dopaminergic neurons in rodent brains. *J Neurosci Res*, 95 (9) : 1829-1837.

Kim E. J., Yu S. W. 2015. Translocator protein 18 kDa (TSPO): old dogma, new mice, new structure, and new questions for neuroprotection. *Neural Regen Res*,10 (6) : 878-880.

Kirik D., Rosenblad C., Björklund A. 1998. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol*, 152 (2) : 259-277.

Kirik D., Rosenblad C., Burger C., Lundberg C., Johansen T. E., Muzyczka N., Mandel R. J., Björklund A. 2002. Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. *J Neurosci*, 22 (7) : 2780-2791.

Kish S. J., Shannak K., Hornykiewicz O. 1988. Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *N Engl J Med*, 318 (14) : 876-880.

Klein C., Westenberger A. 2012. Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2 (1) : a008888.

Knobloch M., Pilz G. A., Ghesquiere B., Kovacs W. J., Wegleiter T., Moore D. L., Hruzova M., Zamboni N., Carmeliet P., Jessberger S. 2017. A Fatty Acid Oxidation-Dependent Metabolic Shift Regulates Adult Neural Stem Cell Activity. *Cell Rep*, 20 (9) : 2144-2155.

Knott C., Stern G., Wilkin G. P. 2000. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol Cell Neurosci*, 16 (6) : 724-739.

Koprich J. B., Johnston T. H., Reyes M. G., Sun X., Brotchie J. M. 2010. Expression of

human A53T alpha-synuclein in the rat substantia nigra using a novel AAV1/2 vector produces a rapidly evolving pathology with protein aggregation, dystrophic neurite architecture and nigrostriatal degeneration with potential to model the pathology of Parkinson's disease. *Mol Neurodegener*, 5 : 43.

Kordower J. H., Brundin P. 2009. Lewy body pathology in long-term fetal nigral transplants: is Parkinson's disease transmitted from one neural system to another? *Neuropsychopharmacology*, 34 (1) : 254.

Kowall N. W., Hantraye P., Brouillet E., Beal M. F., McKee A. C., Ferrante R. J. 2000. MPTP induces alpha-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons. *Neuroreport*, 11 (1) : 211-213.

Krafft P. R., Altay O., Rolland W. B., Duris K., Lekic T., Tang J., Zhang J. H. 2012. alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonism confers neuroprotection through GSK-3beta inhibition in a mouse model of intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 43 (3) : 844-850.

Krafft P. R., Caner B., Klebe D., Rolland W. B., Tang J., Zhang J. H. 2013. PHA-543613 preserves blood-brain barrier integrity after intracerebral hemorrhage in mice. *Stroke*, 44 (6) : 1743-1747.

Krafft P. R., McBride D., Rolland W. B., Lekic T., Flores J. J., Zhang J. H. 2017. alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Stimulation Attenuates Neuroinflammation through JAK2-STAT3 Activation in Murine Models of Intracerebral Hemorrhage. *Biomed Res Int*, 2017 : 8134653.

Kraft A. D., Harry G. J. 2011. Features of microglia and neuroinflammation relevant to environmental exposure and neurotoxicity. *Int J Environ Res Public Health*, 8 (7) : 2980-3018.

Kreutzberg G. W. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 19 (8): 312-318.

Landry Y., Gies J. P. Transmissions dopaminergiques (chapitre 17). In : Landry Y., Gies J. P. (Dunod), Pharmacologie des cibles à 1 thérapeutique 3ème édition. Lieu d'édition : Dunod, Juin 2014, 544 p.

Lambeng N., Hourez R., Torch S., Verna J. M. (2002). Biochemical and molecular mechanisms of neuronal cell death in the experimental neurotoxic models of Parkinson's disease. *Med Sci (Paris)*,18 (4) : 457-466.

Lanciego J. L., Luquin N., Obeso J. A. 2012. Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2 (12) : a009621.

Lauwers E., Debyser Z., Van Dorpe J., De Strooper B., Nuttin B., Baekelandt V. 2003. Neuropathology and neurodegeneration in rodent brain induced by lentiviral vector-mediated overexpression of alpha-synuclein. *Brain Pathol*, 13 (3) : 364-372.

Le W., Sayana P., Jankovic J. 2014. Animal models of Parkinson's disease: a gateway to therapeutics? *Neurotherapeutics*, 11 (1) : 92-110.

Legendre P., Le Corronc H. 2014. Microglial cells and development of the embryonic central nervous system. *Med Sci (Paris)*, 30 (2) : 147-152.

Lehnen D., Barral S., Cardoso T., Grealish S., Heuer A., Smiyakin A., Kirkeby A., Kollet J., Cremer H., Parmar M., Bosio A., Knobel S. 2017. IAP-Based Cell Sorting Results in Homogeneous Transplantable Dopaminergic Precursor Cells Derived from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 9 (4) : 1207-1220.

Leviel V. 2001. The reverse transport of DA, what physiological significance? *Neurochem Int*, 38 (2) : 83-106.

Lewitt P. A. 2008. Levodopa for the treatment of Parkinson's disease. *N Engl J Med*, 359 (23) : 2468-2476.

Lewandowski N. M., Ju S., Verbitsky M., Ross B., Geddie M. L., Rockenstein E., Adame A., Muhammad A., Vonsattel J. P., Ringe D., Cote L., Lindquist S., Masliah E., Petsko G. A., Marder K., Clark L. N., Small S. A. 2010. Polyamine pathway contributes to the pathogenesis of Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (39) : 16970-16975.

LeWitt P. A., Rezai A. R., Leehey M. A., Ojemann S. G., Flaherty A. W., Eskandar E. N., Kostyk S. K., Thomas K., Sarkar A., Siddiqui M. S., Tatter S. B., Schwalb J. M., Poston K. L., Henderson J. M., Kurlan R. M., Richard I. H., Van Meter L., Sapan C. V., During M. J., Kaplitt M. G., Feigin A. 2011. AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet Neurol*, 10 (4) : 309-319.

Lim K. L., Tan J. M. 2007. Role of the ubiquitin proteasome system in Parkinson's disease. *BMC Biochem*, 8 Suppl 1 : S13.

Lin J. Y., Xie C. L., Zhang S. F., Yuan W., Liu Z. G. 2017. Current Experimental Studies of Gene Therapy in Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci*, 9 : 126.

Lindvall O., Brundin P., Widner H., Rehncrona S., Gustavii B., Frackowiak R., Leenders K. L., Sawle G., Rothwell J. C., Marsden C. D. et al. 1990. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science*, 247 (4942) : 574-577.

Lindvall O., Sawle G., Widner H., Rothwell J. C., Björklund A., Brooks D., Brundin P., Frackowiak R., Marsden C. D., Odin P. et al. 1994. Evidence for long-term survival and function of dopaminergic grafts in progressive Parkinson's disease. Ann Neurol, 35 (2) : 172-180.

Ling Z., Gayle D. A., Ma S. Y., Lipton J. W., Tong C. W., Hong J. S., Carvey P. M. 2002. In utero bacterial endotoxin exposure causes loss of tyrosine hydroxylase neurons in the postnatal rat midbrain. *Mov Disord*, 17 (1) : 116-124.

Ling Z. D., Chang Q., Lipton J. W., Tong C. W., Landers T. M., Carvey P. M. 2004. Combined toxicity of prenatal bacterial endotoxin exposure and postnatal 6-hydroxydopamine in the adult rat midbrain. *Neuroscience*, 124 (3) : 619-628. Liu C. Q., Chen Z., Liu F. X., Hu D. N., Luo J. H. 2007. Involvement of brain endogenous histamine in the degeneration of dopaminergic neurons in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neuropharmacology*, 53 (7) : 832-841.

Liu G. J., Middleton R. J., Hatty C. R., Kam W. W., Chan R., Pham T., Harrison-Brown M., Dodson E., Veale K., Banati R. B. 2014. The 18 kDa translocator protein, microglia and neuroinflammation. *Brain Pathol*, 24 (6) : 631-653.

Lo Bianco C., Ridet J. L., Schneider B. L., Deglon N., Aebischer P. 2002. alpha -Synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (16) : 10813-10818.

Luo Y., Hoffer A., Hoffer B., Qi X. 2015. Mitochondria: A Therapeutic Target for Parkinson's Disease? *Int J Mol Sci*, 16 (9) : 20704-20730.

Lynch-Day M. A., Mao K., Wang K., Zhao M., Klionsky D. J. 2012. The role of autophagy in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2 (4) : a009357.

Μ

Madji Hounoum B., Mavel S., Coque E., Patin F., Vourc'h P., Marouillat S., Nadal-Desbarats L., Emond P., Corcia P., Andres C. R., Raoul C., Blasco H. 2017. Wildtype motoneurons, ALS-Linked SOD1 mutation and glutamate profoundly modify astrocyte metabolism and lactate shuttling. *Glia*, 65 (4) : 592-605.

Maia S., Arlicot N., Vierron E., Bodard S., Vergote J., Guilloteau D., Chalon S. 2012. Longitudinal and parallel monitoring of neuroinflammation and neurodegeneration in a 6hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Synapse*, 66 (7) : 573-583.

Maiti P., Manna J., Dunbar G. L. 2017. Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments. *Transl Neurodegener*, 6 : 28.

Mancuso R., Olivan S., Rando A., Casas C., Osta R., Navarro X. 2012. Sigma-1R agonist improves motor function and motoneuron survival in ALS mice. *Neurotherapeutics*, 9 (4) :

814-826.

Marks W. J. Jr., Bartus R. T., Siffert J., Davis C. S., Lozano A., Boulis N., Vitek J., Stacy M., Turner D., Verhagen L., Bakay R., Watts R., Guthrie B., Jankovic J., Simpson R., Tagliati M., Alterman R., Stern M., Baltuch G., Starr P. A., Larson P. S., Ostrem J. L., Nutt J., Kieburtz K., Kordower J. H., Olanow C. W. 2010. Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol*, 9 (12) : 1164-1172.

Marks W. J. Jr., Ostrem J. L., Verhagen L., Starr P. A., Larson P. S., Bakay R. A., Taylor R., Cahn-Weiner D. A., Stoessl A. J., Olanow C. W., Bartus R. T. 2008. Safety and tolerability of intraputaminal delivery of CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *Lancet Neurol*, 7 (5) : 400-408.

Mathieu P., Roca V., Gamba C., Del Pozo A., Pitossi F. 2012. Neuroprotective effects of human umbilical cord mesenchymal stromal cells in an immunocompetent animal model of Parkinson's disease. *J Neuroimmunol*, 246 (1-2) : 43-50.

Maurice T., Phan V. L., Noda Y., Yamada K., Privat A., Nabeshima T. 1999. The attenuation of learning impairments induced after exposure to CO or trimethyltin in mice by sigma (sigma) receptor ligands involves both sigma1 and sigma2 sites. *Br J Pharmacol*, 127 (2) : 335-342.

McCormack A. L., Thiruchelvam M., Manning-Bog A. B., Thiffault C., Langston J. W., Cory-Slechta D. A., Di Monte D. A. 2002. Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis*, 10 (2) : 119-127.

McGeer P. L., Itagaki S., Boyes B. E., McGeer E. G. 1988. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, 38 (8) : 1285-1291.

McNaught K. S., Belizaire R., Jenner P., Olanow C. W., Isacson O. 2002. Selective loss of

20S proteasome alpha-subunits in the substantia nigra pars compacta in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 326 (3) : 155-158.

McNaught K. S., Perl D. P., Brownell A. L., Olanow C. W. 2004. Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 56 (1) : 149-162.

Meiser J., Weindl D., Hiller K. 2013. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun Signal*, 11 (1): 34.

Meredith G. E., Kang U. J. 2006. Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. *Mov Disord*, 21 (10) : 1595-1606.

Meredith G. E., Rademacher D. J. 2011. MPTP mouse models of Parkinson's disease: an update. *J Parkinsons Dis*, 1 (1) : 19-33.

Millar N. S., Gotti C. 2009. Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, 56 (1) : 237-246.

Miller G. W. 2007. Paraquat: the red herring of Parkinson's disease research. *Toxicol Sci*, 100 (1): 1-2.

Mills C. D., Kincaid K., Alt J. M., Heilman M. J., Hill A. M. 2000. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*, 164 (12) : 6166-6173.

Mogi M., Harada M., Kondo T., Riederer P., Inagaki H., Minami M., Nagatsu T. 1994. Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factoralpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci Lett*, 180 (2) : 147-150.

Mogi M., Harada M., Narabayashi H., Inagaki H., Minami M., Nagatsu T. 1996. Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 211 (1): 13-16.

Moreau C., Defebvre L. Signes moteurs (chapitre 7). In : Moreau C., Defebvre L. (Elsevier Masson), La maladie de Parkinson 3ème édition. Lieu d'édition : Elsevier Masson, Septembre 2015, 240 p.

Morrow B. A., Roth R. H., Redmond D. E., Elsworth J. D. 2011. Impact of methamphetamine on dopamine neurons in primates is dependent on age: implications for development of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 189 : 277-285.

Muramatsu S., Fujimoto K., Kato S., Mizukami H., Asari S., Ikeguchi K., Kawakami T., Urabe M., Kume A., Sato T., Watanabe E., Ozawa K., Nakano I. 2010. A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol Ther*, 18 (9) : 1731-1735.

Ν

Nandipati S., Litvan I. 2016. Environmental Exposures and Parkinson's Disease. *Int J Environ Res Public Health*, 13 (9).

Nieoullon A. La maladie de Parkinson (chapitre 1). In : Nieoullon A. (De Boeck supérieur), Vaincre la maladie de Parkinson ?. Lieu d'édition : De Boeck supérieur, Mars 2017, 288 p.

Nguyen L., Lucke-Wold B. P., Mookerjee S. A., Cavendish J. Z., Robson M. J., Scandinaro A. L., Matsumoto R. R. 2015. Role of sigma-1 receptors in neurodegenerative diseases. *J Pharmacol Sci*, 127 (1): 17-29.

Niethammer M., Tang C. C., LeWitt P. A., Rezai A. R., Leehey M. A., Ojemann S. G., Flaherty A. W., Eskandar E. N., Kostyk S. K., Sarkar A., Siddiqui M. S., Tatter S. B., Schwalb J. M., Poston K. L., Henderson J. M., Kurlan R. M., Richard I. H., Sapan C. V., Eidelberg D., During M. J., Kaplitt M. G., Feigin A. 2017. Long-term follow-up of a randomized AAV2-GAD gene therapy trial for Parkinson's disease. *JCI Insight*, 2 (7) : e90133.

Noelker C., Stuckenholz V., Reese J. P., Alvarez-Fischer D., Sankowski R., Rausch T., Oertel W. H., Hartmann A., van Patten S., Al-Abed Y., Bacher M. 2013. CNI-1493 attenuates

neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration in the acute MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neurodegener Dis*, 12 (2) : 103-110.

Nussbaum R. L., Polymeropoulos M. H. 1997. Genetics of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, 6 (10) : 1687-1691.

0

Oliveras-Salva M., Van der Perren A., Casadei N., Stroobants S., Nuber S., D'Hooge R., Van den Haute C., Baekelandt V. 2013. rAAV2/7 vector-mediated overexpression of alphasynuclein in mouse substantia nigra induces protein aggregation and progressive dosedependent neurodegeneration. *Mol Neurodegener*, 8: 44.

Ono Y., Tanaka H., Takata M., Nagahara Y., Noda Y., Tsuruma K., Shimazawa M., Hozumi I., Hara H. 2014. SA4503, a sigma-1 receptor agonist, suppresses motor neuron damage in in vitro and in vivo amyotrophic lateral sclerosis models. *Neurosci Lett*, 559: 174-178.

Orihuela R., McPherson C. A., Harry G. J. 2016. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol*, 173 (4) : 649-665.

Ouchi Y., Yoshikawa E., Sekine Y., Futatsubashi M., Kanno T., Ogusu T., Torizuka T. 2005.
Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 57 (2): 168-175.

Р

Palfi S., Gurruchaga J. M., Ralph G. S., Lepetit H., Lavisse S., Buttery P. C., Watts C., Miskin J., Kelleher M., Deeley S., Iwamuro H., Lefaucheur J. P., Thiriez C., Fenelon G., Lucas C., Brugieres P., Gabriel I., Abhay K., Drouot X., Tani N., Kas A., Ghaleh B., Le Corvoisier P., Dolphin P., Breen D. P., Mason S., Guzman N. V., Mazarakis N. D., Radcliffe P. A., Harrop R., Kingsman S. M., Rascol O., Naylor S., Barker R. A., Hantraye P., Remy P., Cesaro P., Mitrophanous K. A. 2014. Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. Lancet, 383 (9923) : 1138-1146.

Pandey S., Srivanitchapoom P. 2017. Levodopa-induced Dyskinesia: Clinical Features, Pathophysiology, and Medical Management. *Ann Indian Acad Neurol*, 20 (3) : 190-198.

Panov A., Orynbayeva Z., Vavilin V., Lyakhovich V. 2014. Fatty acids in energy metabolism of the central nervous system. *Biomed Res Int*, 2014 : 472459.

Park I. H., Zhao R., West J. A., Yabuuchi A., Huo H., Ince T. A., Lerou P. H., Lensch M. W., Daley G. Q. 2008. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 451 (7175) : 141-146.

Parkinson J. 2002. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 14
(2): 223-236; discussion 222.

Parpura V., Verkhratsky A. 2012. Astrocytes revisited: concise historic outlook on glutamate homeostasis and signaling. *Croat Med J*, 53 (6) : 518-528.

Pavlov V. A., Wang H., Czura C. J., Friedman S. G., Tracey K. J. 2003. The cholinergic antiinflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Mol Med*, 9 (5-8): 125-134.

Paxinos G., Watson C. 2009. The Rat Brain in Stereotaxic coordinates. Elsevier Academic Press, San Diego.

Penas C., Pascual-Font A., Mancuso R., Fores J., Casas C., Navarro X. 2011. Sigma receptor agonist 2-(4-morpholinethyl)1 phenylcyclohexanecarboxylate (Pre084) increases GDNF and BiP expression and promotes neuroprotection after root avulsion injury. *J Neurotrauma*, 28 (5): 831-840.

Penttinen A. M., Suleymanova I., Albert K., Anttila J., Voutilainen M. H., Airavaara M. 2016. Characterization of a new low-dose 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease in rat. *J Neurosci Res*, 94 (4) : 318-328. Perego C., Fumagalli S., De Simoni M. G. 2011. Temporal pattern of expression and colocalization of microglia/macrophage phenotype markers following brain ischemic injury in mice. *J Neuroinflammation*, 8 : 174.

Perese D. A., Ulman J., Viola J., Ewing S. E., Bankiewicz K. S. 1989. A 6-hydroxydopamineinduced selective parkinsonian rat model. *Brain Res*, 494 (2) : 285-293.

Perlow M. J., Freed W. J., Hoffer B. J., Seiger A., Olson L., Wyatt R. J. 1979. Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science*, 204 (4393) : 643-647.

Peschanski M., Defer G., N'Guyen J. P., Ricolfi F., Monfort J. C., Remy P., Geny C., Samson Y., Hantraye P., Jeny R. et al. 1994. Bilateral motor improvement and alteration of L-dopa effect in two patients with Parkinson's disease following intrastriatal transplantation of foetal ventral mesencephalon. *Brain*, 117 (Pt 3) : 487-499.

Peviani M., Salvaneschi E., Bontempi L., Petese A., Manzo A., Rossi D., Salmona M., Collina S., Bigini P., Curti D. 2014. Neuroprotective effects of the Sigma-1 receptor (S1R) agonist PRE-084, in a mouse model of motor neuron disease not linked to SOD1 mutation. *Neurobiol Dis*, 62 : 218-232.

Pfeiffer R. F. 2016. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 22 Suppl 1 : S119-122.

Poewe W. 2008. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Eur J Neurol*, 15 Suppl 1 : 14-20.

Poewe W., Seppi K., Tanner C. M., Halliday G. M., Brundin P., Volkmann J., Schrag A. E., Lang A. E. 2017. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers*, 3 : 17013.

Popescu B. O., Toescu E. C., Popescu L. M., Bajenaru O., Muresanu D. F., Schultzberg M., Bogdanovic N. 2009. Blood-brain barrier alterations in ageing and dementia. *J Neurol Sci*, 283 (1-2): 99-106. Porter C. C., Totaro J. A., Stone C. A. 1963. Effect of 6-hydroxydopamine and some other compounds on the concentration of norepinephrine in the hearts of mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 140 : 308-316.

Posadas I., Lopez-Hernandez B., Cena V. 2013. Nicotinic receptors in neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol*, 11 (3) : 298-314.

Prakash N., Wurst W. 2006. Development of dopaminergic neurons in the mammalian brain. *Cell Mol Life Sci*, 63 (2) : 187-206.

Prinz M., Tay T. L., Wolf Y., Jung S. 2014. Microglia: unique and common features with other tissue macrophages. *Acta Neuropathol*, 128 (3) : 319-331.

Przedborski S., Levivier M., Jiang H., Ferreira M., Jackson-Lewis V., Donaldson D., Togasaki D. M. 1995. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience*, 67 (3) : 631-647.

Q

Qin L., Wu X., Block M. L., Liu Y., Breese G. R., Hong J. S., Knapp D. J., Crews F. T. 2007.
Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*, 55
(5): 453-462.

Quik M., O'Neill M., Perez X. A. 2007. Nicotine neuroprotection against nigrostriatal damage: importance of the animal model. *Trends Pharmacol Sci*, 28 (5) : 229-235.

Quik M., Perez X. A., Bordia T. 2012. Nicotine as a potential neuroprotective agent for Parkinson's disease. *Mov Disord*, 27 (8) : 947-957.

Quik M., Zhang D., McGregor M., Bordia T. 2015. Alpha7 nicotinic receptors as therapeutic targets for Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol*, 97 (4) : 399-407.

R

Reeve A., Simcox E., Turnbull D. 2014. Ageing and Parkinson's disease: why is advancing age the biggest risk factor? *Ageing Res Rev*, 14 : 19-30.

Renaud J., Therien H. M., Plouffe M., Martinoli M. G. 2015. Neuroinflammation: Dr Jekyll or Mr Hyde?]. *Med Sci (Paris)*, 31 (11) : 979-988.

Riachi N. J., Dietrich W. D., Harik S. I. 1990. Effects of internal carotid administration of MPTP on rat brain and blood-brain barrier. *Brain Res*, 533 (1): 6-14.

Rinne J. O., Anichtchik O. V., Eriksson K. S., Kaslin J., Tuomisto L., Kalimo H., Roytta M., Panula P. 2002. Increased brain histamine levels in Parkinson's disease but not in multiple system atrophy. *J Neurochem*, 81 (5) : 954-960.

Rocha S. M., Saraiva T., Cristovao A. C., Ferreira R., Santos T., Esteves M., Saraiva C., Je G., Cortes L., Valero J., Alves G., Klibanov A., Kim Y. S., Bernardino L. 2016. Histamine induces microglia activation and dopaminergic neuronal toxicity via H1 receptor activation. *J Neuroinflammation*, 13 (1) : 137.

Roy A., Fung Y. K., Liu X., Pahan K. 2006a. Up-regulation of microglial CD11b expression by nitric oxide. *J Biol Chem*, 281 (21) : 14971-14980.

Roy A., Jana A., Yatish K., Freidt M. B., Fung Y. K., Martinson J. A., Pahan K. 2008. Reactive oxygen species up-regulate CD11b in microglia via nitric oxide: Implications for neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med*, 45 (5) : 686-699.

Roy N. S., Cleren C., Singh S. K., Yang L., Beal M. F., Goldman S. A. 2006b. Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat Med*, 12 (11) : 1259-1268.

Rubinsztein D. C. 2006. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*, 443 (7113) : 780-786.

Rupprecht R., Papadopoulos V., Rammes G., Baghai T. C., Fan J., Akula N., Groyer G.,

Adams D., Schumacher M. 2010. Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov*, 9 (12) : 971-988.

Ruscher K., Wieloch T. 2015. The involvement of the sigma-1 receptor in neurodegeneration and neurorestoration. *J Pharmacol Sci*, 127 (1) : 30-35.

S

Sadigh-Eteghad S., Talebi M., Mahmoudi J., Babri S., Shanehbandi D. 2015. Selective activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor by PHA-543613 improves Abeta25-35-mediated cognitive deficits in mice. *Neuroscience*, 298 : 81-93.

Saijo K., Glass C. K. 2011. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 11 (11) : 775-787.

Samata B., Doi D., Nishimura K., Kikuchi T., Watanabe A., Sakamoto Y., Kakuta J., Ono Y., Takahashi J. 2016. Purification of functional human ES and iPSC-derived midbrain dopaminergic progenitors using LRTM1. *Nat Commun*, 7 : 13097.

Sarkar S., Gough B., Raymick J., Beaudoin M. A., Ali S. F., Virmani A., Binienda Z. K. 2015. Histopathological and electrophysiological indices of rotenone-evoked dopaminergic toxicity: Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine. *Neurosci Lett*, 606 : 53-59.

Sauer H., Oertel W. H. 1994. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience*, 59 (2) : 401-415.

Schapira A. H., Jenner P. 2011. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord*, 26 (6) : 1049-1055.

Schapira A. H., Chaudhuri K. R., Jenner P. 2017. Non-motor features of Parkinson disease. *Nat Rev Neurosci*, 18 (7) : 435-450. Schonfeld P., Reiser G. 2013. Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy? Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 33 (10) : 1493-1499.

Schwerk A., Altschuler J., Roch M., Gossen M., Winter C., Berg J., Kurtz A., Akyuz L., Steiner B. 2015. Adipose-derived human mesenchymal stem cells induce long-term neurogenic and anti-inflammatory effects and improve cognitive but not motor performance in a rat model of Parkinson's disease. *Regen Med*, 10 (4) : 431-446.

Serriere S., Domene A., Vercouillie J., Mothes C., Bodard S., Rodrigues N., Guilloteau D., Routier S., Page G., Chalon S. 2015. Assessment of the Protection of Dopaminergic Neurons by an alpha7 Nicotinic Receptor Agonist, PHA 543613 Using (18)F]LBT-999 in a Parkinson's Disease Rat Model. *Front Med (Lausanne)*, 2: 61.

Serriere S., Tauber C., Vercouillie J., Guilloteau D., Deloye J. B., Garreau L., Galineau L., Chalon S. 2014. In vivo PET quantification of the dopamine transporter in rat brain with (1)(8)F]LBT-999. *Nucl Med Biol*, 41 (1) : 106-113.

Shih M. C., Hoexter M. Q., Andrade L. A., Bressan R. A. 2006. Parkinson's disease and dopamine transporter neuroimaging: a critical review. *Sao Paulo Med J*, 124 (3) : 168-175.

Shimizu K., Ohtaki K., Matsubara K., Aoyama K., Uezono T., Saito O., Suno M., Ogawa K., Hayase N., Kimura K., Shiono H. 2001. Carrier-mediated processes in blood--brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. *Brain Res*, 906 (1-2) : 135-142.

Shimoji M., Pagan F., Healton E. B., Mocchetti I. 2009. CXCR4 and CXCL12 expression is increased in the nigro-striatal system of Parkinson's disease. *Neurotox Res*, 16 (3) : 318-328.

Shytle R. D., Mori T., Townsend K., Vendrame M., Sun N., Zeng J., Ehrhart J., Silver A. A., Sanberg P. R., Tan J. 2004. Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors. *J Neurochem*, 89 (2) : 337-343.

Silva M. D., Glaus C., Hesterman J. Y., Hoppin J., Puppa G. H., Kazules T., Orcutt K. M.,

Germino M., Immke D., Miller S. 2013. Regional, kinetic [(18)F]FDG PET imaging of a unilateral Parkinsonian animal model. *Am J Nucl Med Mol Imaging*, 3 (2) : 129-141.

Silva-Adaya D., Perez-De La Cruz V., Herrera-Mundo M. N., Mendoza-Macedo K., Villeda-Hernandez J., Binienda Z., Ali S. F., Santamaria A. 2008. Excitotoxic damage, disrupted energy metabolism, and oxidative stress in the rat brain: antioxidant and neuroprotective effects of L-carnitine. *J Neurochem*, 105 (3) : 677-689.

Simola N., Morelli M., Carta A. R. 2007. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotox Res*, 11 (3-4) : 151-167.

Sofroniew M. V. 2014. Astrogliosis. Cold Spring Harb Perspect Biol, 7 (2): a020420.

Sofroniew M. V., Vinters H. V. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 119 (1): 7-35.

Song J., Kim J. 2016. Degeneration of Dopaminergic Neurons Due to Metabolic Alterations and Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci*, 8 : 65.

Spencer D. D., Robbins R. J., Naftolin F., Marek K. L., Vollmer T., Leranth C., Roth R. H., Price L. H., Gjedde A., Bunney B. S. et al. 1992. Unilateral transplantation of human fetal mesencephalic tissue into the caudate nucleus of patients with Parkinson's disease. *N Engl J Med*, 327 (22) : 1541-1548.

Stuckenholz V., Bacher M., Balzer-Geldsetzer M., Alvarez-Fischer D., Oertel W. H., Dodel R. C., Noelker C. 2013. The alpha7 nAChR agonist PNU-282987 reduces inflammation and MPTP-induced nigral dopaminergic cell loss in mice. *J Parkinsons Dis*, 3 (2) : 161-172.

Suzuki S., Kawamata J., Matsushita T., Matsumura A., Hisahara S., Takata K., Kitamura Y., Kem W., Shimohama S. 2013. 3-(2,4-Dimethoxy)benzylidene]-anabaseine dihydrochloride protects against 6-hydroxydopamine-induced parkinsonian neurodegeneration through alpha7 nicotinic acetylcholine receptor stimulation in rats. *J Neurosci Res*, 91 (3) : 462-471.

Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. 2007.
Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131 (5): 861-872.

Takahashi K., Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126 (4) : 663-676.

Tan J. M., Wong E. S., Lim K. L. 2009. Protein misfolding and aggregation in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*, 11 (9) : 2119-2134.

Tang Y., Le W. 2016. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*, 53 (2) : 1181-1194.

Tanner C. M., Ottman R., Goldman S. M., Ellenberg J., Chan P., Mayeux R., Langston J. W. 1999. Parkinson disease in twins: an etiologic study. *JAMA*, 281 (4) : 341-346.

Tarazi F. I., Sahli Z. T., Wolny M., Mousa S. A. 2014. Emerging therapies for Parkinson's disease: from bench to bedside. *Pharmacol Ther*, 144 (2) : 123-133.

Tatsch K., Poepperl G. 2013. Nigrostriatal dopamine terminal imaging with dopamine transporter SPECT: an update. *J Nucl Med*, 54 (8) : 1331-1338.

Teaktong T., Graham A., Court J., Perry R., Jaros E., Johnson M., Hall R., Perry E. 2003. Alzheimer's disease is associated with a selective increase in alpha7 nicotinic acetylcholine receptor immunoreactivity in astrocytes. *Glia*, 41 (2) : 207-211.

Teismann P., Tieu K., Cohen O., Choi D. K., Wu D. C., Marks D., Vila M., Jackson-Lewis V., Przedborski S. 2003. Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 18 (2): 121-129.

Theurey P., Pizzo P. 2018. The Aging Mitochondria. Genes (Basel), 9 (1).

Thornton E., Vink R. 2012. Treatment with a substance P receptor antagonist is neuroprotective in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of early Parkinson's disease. *PLoS One*, 7(4): e34138.

Thrash B., Thiruchelvan K., Ahuja M., Suppiramaniam V., Dhanasekaran M. 2009.
Methamphetamine-induced neurotoxicity: the road to Parkinson's disease. *Pharmacol Rep*, 61
(6): 966-977.

Tieu K. 2011. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 1 (1) : a009316.

Trenkwalder C., Berg D., Rascol O., Eggert K., Ceballos-Baumann A., Corvol J. C., Storch A., Zhang L., Azulay J. P., Broussolle E., Defebvre L., Geny C., Gostkowski M., Stocchi F., Tranchant C., Derkinderen P., Durif F., Espay A. J., Feigin A., Houeto J. L., Schwarz J., Di Paolo T., Feuerbach D., Hockey H. U., Jaeger J., Jakab A., Johns D., Linazasoro G., Maruff P., Rozenberg I., Sovago J., Weiss M., Gomez-Mancilla B. 2016. A Placebo-Controlled Trial of AQW051 in Patients With Moderate to Severe Levodopa-Induced Dyskinesia. *Mov Disord*, 31 (7) : 1049-1054.

Tronci E., Francardo V. 2018. Animal models of L-DOPA-induced dyskinesia: the 6-OHDAlesioned rat and mouse. *J Neural Transm (Vienna)*, 125 (8) : 1137-1144.

Tronel C., Largeau B., Santiago Ribeiro M. J., Guilloteau D., Dupont A. C., Arlicot N. 2017. Molecular Targets for PET Imaging of Activated Microglia: The Current Situation and Future Expectations. *Int J Mol Sci*, 18 (4).

Turrens J. F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 552 (Pt 2) : 335-344.

U

Ungerstedt U. 1968. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol*, 5 (1) : 107-110.

Valdes P., Schneider B. L. 2016. Gene Therapy: A Promising Approach for Neuroprotection in Parkinson's Disease? *Front Neuroanat*, 10 : 123.

Vawter M. P., Dillon-Carter O., Tourtellotte W. W., Carvey P., Freed W. J. 1996. TGFbeta1 and TGFbeta2 concentrations are elevated in Parkinson's disease in ventricular cerebrospinal fluid. *Exp Neurol*, 142 (2) : 313-322.

Venneti S., Lopresti B. J., Wiley C. A. 2006. The peripheral benzodiazepine receptor (Translocator protein 18kDa) in microglia: from pathology to imaging. *Prog Neurobiol*, 80 (6) : 308-322.

Vizuete M. L., Merino M., Venero J. L., Santiago M., Cano J., Machado A. 2000. Histamine infusion induces a selective dopaminergic neuronal death along with an inflammatory reaction in rat substantia nigra. *J Neurochem*, 75 (2) : 540-552.

W

Walter B. L., Vitek J. L. 2004. Surgical treatment for Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, 3 (12): 719-728.

Wang B., Abraham N., Gao G., Yang Q. 2016. Dysregulation of autophagy and mitochondrial function in Parkinson's disease. *Transl Neurodegener*, 5 : 19.

Wang H., Yu M., Ochani M., Amella C. A., Tanovic M., Susarla S., Li J. H., Wang H., Yang H., Ulloa L., Al-Abed Y., Czura C. J., Tracey K. J. 2003. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, 421 (6921) : 384-388.

Wang N., Liang H., Zen K. 2014. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1m2 polarization balance. *Front Immunol*, 5 : 614.

Wang Q., Liu Y., Zhou J. 2015. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as

therapeutic target. Transl Neurodegener, 4:19.

Wang Y., Yang J., Li H., Wang X., Zhu L., Fan M., Wang X. 2013. Hypoxia promotes dopaminergic differentiation of mesenchymal stem cells and shows benefits for transplantation in a rat model of Parkinson's disease. *PLoS One*, 8 (1) : e54296.

Warren Olanow C., Bartus R. T., Baumann T. L., Factor S., Boulis N., Stacy M., Turner D. A., Marks W., Larson P., Starr P. A., Jankovic J., Simpson R., Watts R., Guthrie B., Poston K., Henderson J. M., Stern M., Baltuch G., Goetz C. G., Herzog C., Kordower J. H., Alterman R., Lozano A. M., Lang A. E. 2015. Gene delivery of neurturin to putamen and substantia nigra in Parkinson disease: A double-blind, randomized, controlled trial. *Ann Neurol*, 78 (2): 248-257.

Wenning G. K., Odin P., Morrish P., Rehncrona S., Widner H., Brundin P., Rothwell J. C., Brown R., Gustavii B., Hagell P., Jahanshahi M., Sawle G., Björklund A., Brooks D. J., Marsden C. D., Quinn N. P., Lindvall O. 1997. Short- and long-term survival and function of unilateral intrastriatal dopaminergic grafts in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 42 (1): 95-107.

Wishka D. G., Walker D. P., Yates K. M., Reitz S. C., Jia S., Myers J. K., Olson K. L., Jacobsen E. J., Wolfe M. L., Groppi V. E., Hanchar A. J., Thornburgh B. A., Cortes-Burgos L. A., Wong E. H., Staton B. A., Raub T. J., Higdon N. R., Wall T. M., Hurst R. S., Walters R. R., Hoffmann W. E., Hajos M., Franklin S., Carey G., Gold L. H., Cook K. K., Sands S. B., Zhao S. X., Soglia J. R., Kalgutkar A. S., Arneric S. P., Rogers B. N. 2006. Discovery of N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]furo[2,3-c]pyridine-5-carboxamide, an agonist of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor, for the potential treatment of cognitive deficits in schizophrenia: synthesis and structure--activity relationship. *J Med Chem*, 49 (14) : 4425-4436.

Wong D. F., Kuwabara H., Horti A. G., Roberts J. M., Nandi A., Cascella N., Brasic J., Weerts E. M., Kitzmiller K., Phan J. A., Gapasin L., Sawa A., Valentine H., Wand G., Mishra C., George N., McDonald M., Lesniak W., Holt D. P., Azad B. B., Dannals R. F., Kem W., Freedman R., Gjedde A. 2018. Brain PET Imaging of alpha7-nAChR with [18F]ASEM: Reproducibility, Occupancy, Receptor Density, and Changes in Schizophrenia. *Int J* Neuropsychopharmacol, 21 (7): 656-667.

Worley B., Powers R. 2013. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Curr Metabolomics*, 1 (1): 92-107.

Х

Xie Z., Jones A., Deeney J. T., Hur S. K., Bankaitis V. A. 2016. Inborn Errors of Long-Chain Fatty Acid beta-Oxidation Link Neural Stem Cell Self-Renewal to Autism. *Cell Rep*, 14 (5) : 991-999.

Xilouri M., Brekk O. R., Landeck N., Pitychoutis P. M., Papasilekas T., Papadopoulou-Daifoti Z., Kirik D., Stefanis L. 2013. Boosting chaperone-mediated autophagy in vivo mitigates alpha-synuclein-induced neurodegeneration. *Brain*, 136 (Pt 7) : 2130-2146.

Xiong N., Yang H., Liu L., Xiong J., Zhang Z., Zhang X., Jia M., Huang J., Zhang Z., Mohamed A. A., Lin Z., Wang T. 2013. bFGF promotes the differentiation and effectiveness of human bone marrow mesenchymal stem cells in a rotenone model for Parkinson's disease. *Environ Toxicol Pharmacol*, 36 (2) : 411-422.

Xu L., Pu J. 2016. Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease: From Pathogenetic Dysfunction to Potential Clinical Application. *Parkinsons Dis*, 2016 : 1720621.

Y

Yan M., Sun M., Zhou Y., Wang W., He Z., Tang D., Lu S., Wang X., Li S., Wang W., Li H. 2013. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopamine neurons mediated by the Lmx1a and neurturin in vitro: potential therapeutic application for Parkinson's disease in a rhesus monkey model. *PLoS One*, 8 (5) : e64000.

Yang R., Chen L., Wang H., Xu B., Tomimoto H., Chen L. 2012. Anti-amnesic effect of neurosteroid PREGS in Abeta25-35-injected mice through sigmal receptor- and alpha7nAChR-mediated neuroprotection. *Neuropharmacology*, 63 (6) : 1042-1050.
Yasuhara T., Kameda M., Sasaki T., Tajiri N., Date I. 2017. Cell Therapy for Parkinson's Disease. *Cell Transplant*, 26 (9) : 1551-1559.

Yu J., Vodyanik M. A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J. L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G. A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin II, Thomson J. A. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318 (5858) : 1917-1920.

Ζ

Zecca L., Zucca F. A., Wilms H., Sulzer D. 2003. Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics. *Trends Neurosci*, 26 (11) : 578-580.

Zeng X. S., Geng W. S., Jia J. J. 2018. Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. *ASN Neuro*, 10 : 1759091418777438.

Zhang D., McGregor M., Bordia T., Perez X. A., McIntosh J. M., Decker M. W., Quik M. 2015. alpha7 nicotinic receptor agonists reduce levodopa-induced dyskinesias with severe nigrostriatal damage. *Mov Disord*, 30 (14) : 1901-1911.

Zhang D., McGregor M., Decker M. W., Quik M. 2014. The alpha7 nicotinic receptor agonist ABT-107 decreases L-Dopa-induced dyskinesias in parkinsonian monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*, 351 (1) : 25-32.

Zhang J., Stanton D. M., Nguyen X. V., Liu M., Zhang Z., Gash D., Bing G. 2005. Intrapallidal lipopolysaccharide injection increases iron and ferritin levels in glia of the rat substantia nigra and induces locomotor deficits. *Neuroscience*, 135 (3) : 829-838.

Zhang Q., Lu Y., Bian H., Guo L., Zhu H. 2017. Activation of the alpha7 nicotinic receptor promotes lipopolysaccharide-induced conversion of M1 microglia to M2. *Am J Transl Res*, 9 (3): 971-985.

Zhou Y., Sun M., Li H., Yan M., He Z., Wang W., Wang W., Lu S. 2013. Recovery of behavioral symptoms in hemi-parkinsonian rhesus monkeys through combined gene and stem cell therapy. *Cytotherapy*, 15 (4) : 467-480.

Zheng H., Zhao L., Xia H., Xu C., Wang D., Liu K., Lin L., Li X., Yan Z., Gao H. 2016. NMR-Based Metabolomics Reveal a Recovery from Metabolic Changes in the Striatum of 6-OHDA-Induced Rats Treated with Basic Fibroblast Growth Factor. *Mol Neurobiol*, 53 (10) : 6690-6697.

Ziegler M. 2006. Advanced Parkinson's disease. *Psychol Neuropsychiatr Vieil*, 4 Spec No 1: S5-10.

Zoli M., Pistillo F., Gotti C. 2015. Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. *Neuropharmacology*, 96 (Pt B) : 302-311.

Annexe 1

Article accepté en lien avec la thèse :

Steven Vetel, Sophie Sérrière, Johnny Vercouillie, Jackie Vergote, Gabrielle Chicheri, Jean-Bernard Deloye, Frédéric Dollé, Sylvie Bodard, Claire Tronel, Lydie Nadal-Desbarats, Antoine Lefèvre, Patrick Emond, Sylvie Chalon. Extensive exploration of a novel rat model of Parkinson's disease using partial 6-hydroxydopamine lesion of dopaminergic neurons suggests new therapeutic approaches. Accepté dans Synapse le 15/10/2018.



Extensive exploration of a novel rat model of Parkinson's disease using partial 6-hydroxydopamine lesion of dopaminergic neurons suggests new therapeutic approaches

Journal:	Synapse		
Manuscript ID	SYN-18-0053.R2		
Wiley - Manuscript type:	Research Article		
Date Submitted by the Author:	n/a		
Complete List of Authors:	Vetel, Steven; UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France Sérrière, Sophie; UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France Vercouillie, Johnny; UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France; Inserm CIC1415 Vergote, Jackie; UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France Chicheri, Gabrielle; UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France Deloye, Jean-Bernard; Zionexa, Paris, France Dollé, Frédéric; CEA, Institut des Sciences du Vivant Frédéric Joliot, SHFJ, Université Paris-Saclay Bodard, Sylvie; UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France Tronel, Claire; UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France Nadal-Desbarats, Lydie; UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France Lefèvre, Antoine; UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France Emond, Patrick; UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France Emond, Patrick; UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France; CHRU, Tours, France Chalon, Sylvie; UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France		
Keywords:	Neuroinflammation, PET imaging, metabolomics, dopamine transporter, TSPO		
Abstract:	Parkinson's disease (PD) is characterized by the degeneration of dopaminergic (DA) neurons constituting the nigrostriatal pathway. Neuroinflammation, related to microglial activation, plays an important role in this process. Exploration of animal models of PD using neuroimaging modalities allows to better understand the pathophysiology of the disease. Here, we fully explored a moderate lesion model in the rat in which 6-hydroxydopamine was unilaterally		

delivered in 3 sites along the striatum. The degenerative process was assessed through in vivo Positron Emission Tomography (PET) imaging and in vitro autoradiographic quantitation of the striatal dopamine transporter (DAT) and immunostaining of tyrosine hydroxylase (TH). The microglial activation was studied through in vitro autoradiographic quantitation of the 18 kDa translocator protein (TSPO) in the striatum and CD11b staining in the SN. In addition, a targeted metabolomics exploration was performed in both these structures using mass spectrometry coupled to HPLC. Our results showed a reproducible decrease in the striatal DAT density associated with a reduction in the number of TH-positive cells in the SN and striatum, reflecting a robust moderate degeneration of nigrostriatal DA neurons. In addition, we observed strong microglia activation in both the striatum and SN ipsilateral to the lesion, highlighting that this moderate degeneration of DA neurons was associated with a marked neuroinflammation. Our metabolomics studies revealed alterations of specific metabolites and metabolic pathways such as carnitine, arginine/proline and histidine metabolisms. These results bring new insights in the PD mechanism knowledge and new potential targets for future therapeutic strategies.

×

Extensive exploration of a novel rat model of Parkinson's disease using partial 6hydroxydopamine lesion of dopaminergic neurons suggests new therapeutic approaches

Steven Vetel¹, Sophie Sérrière¹, Johnny Vercouillie^{1,2}, Jackie Vergote¹, Gabrielle Chicheri¹, Jean-Bernard Deloye³, Frédéric Dollé⁴, Sylvie Bodard¹, Claire Tronel¹, Lydie Nadal-Desbarats¹, Antoine Lefèvre¹, Patrick Emond^{1,5}, Sylvie Chalon^{1*}

¹UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France
 ²INSERM CIC 1415, University Hospital, Tours, France
 ³Zionexa, 42 avenue de la Grande Armée, 75017 Paris, France
 ⁴CEA, Institut des Sciences du Vivant Frédéric Joliot, Service hospitalier Frédéric Joliot, Université Paris-Saclay, Orsay, France
 ⁵CHRU Tours, France

*Corresponding author at: UMR Inserm U1253, UFR de Médecine, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours Cedex 01, France, e-mail: <u>sylvie.chalon@univ-tours.fr</u>

Acknowledgements

We thank the Laboratories Cyclopharma for providing fluor-18 and Julie Busson for technical assistance. This manuscript was edited by an English-speaking scientist. This work was supported by the European Union's Seventh Framework Program (FP7/2007-2013) under grant agreement n°278850 (INMiND), by Labex IRON (ANR-11-LABX-18-01) and by Inserm.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is characterized by the degeneration of dopaminergic (DA) neurons constituting the nigrostriatal pathway. Neuroinflammation, related to microglial activation, plays an important role in this process. Exploration of animal models of PD using neuroimaging modalities allows to better understand the pathophysiology of the disease. Here, we fully explored a moderate lesion model in the rat in which 6-hydroxydopamine was unilaterally delivered in 3 sites along the striatum. The degenerative process was assessed through in vivo Positron Emission Tomography (PET) imaging and in vitro autoradiographic quantitation of the striatal dopamine transporter (DAT) and immunostaining of tyrosine hydroxylase (TH). The microglial activation was studied through in vitro autoradiographic quantitation of the 18 kDa translocator protein (TSPO) in the striatum and CD11b staining in the SN. In addition, a targeted metabolomics exploration was performed in both these structures using mass spectrometry coupled to HPLC. Our results showed a reproducible decrease in the striatal DAT density associated with a reduction in the number of THpositive cells in the SN and striatum, reflecting a robust moderate degeneration of nigrostriatal DA neurons. In addition, we observed strong microglia activation in both the striatum and SN ipsilateral to the lesion, highlighting that this moderate degeneration of DA neurons was associated with a marked neuroinflammation. Our metabolomics studies revealed alterations of specific metabolites and metabolic pathways such as carnitine, arginine/proline and histidine metabolisms. These results bring new insights in the PD mechanism knowledge and new potential targets for future therapeutic strategies.

Key words: Neuroinflammation; PET imaging; metabolomics; dopamine transporter; TSPO

1. INTRODUCTION

Parkinson's Disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder after Alzheimer's disease and affects approximately 4.5 million people worldwide, with that number estimated to double by 2030 (Nasrallah and Dubroff 2013). PD is mainly characterized by the gradual loss of dopaminergic (DA) neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc), leading to dopamine depletion in the striatum. These neurons constitute the nigrostriatal DA pathway which plays an essential role in the control of voluntary motor movement (Chinta and Andersen 2005). While 5% of PD cases are inherited, 95% have no apparent genetic etiology (referred to as "sporadic PD") (Dauer and Przedborski 2003). Patients suffering from PD exhibit motor features that can be grouped under the acronym TRAP: Tremor at rest, Rigidity, Akinesia, and Postural instability (Jankovic 2008). Nowadays, it is widely accepted that PD is also characterized by non-motor symptoms such as sensory abnormalities, behavioral changes, sleep disturbances, and autonomic dysfunction (Pfeiffer 2016). Although several risks factors have been identified such as aging and long-term exposition to pesticides, the processes that lead to the loss of DA neurons are not yet fully understood. Many post-mortem brain imaging and fluid biomarker studies indicate that neuroinflammation is an important feature of PD (Poewe et al. 2017). Neuroinflammation is mainly characterized by microglial activation which induces the release of a large group of pro-inflammatory cytokines including tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) that contribute to the degeneration of DA neurons (Wang et al. 2015). Moreover, DA neurons in the SNpc are particularly susceptible to microglial-mediated neurotoxicity due to the high density of microglia in this brain area (Collins et al. 2012). Consequently, targeting

neuroinflammation constitutes a promising therapeutic strategy for PD.

Although all facets of PD are nearly impossible to model in animals (Vingill et al. 2017), these models are invaluable tools to gain knowledge of mechanisms involved in the pathological process and to evaluate new therapeutic approaches. In this context, the recent development of non-invasive imaging methods in small animals gives the unique opportunity to follow at the same time a number of various parameters such as brain activity, neurotransmission and neuroinflammation during the course of the disease, and the effects of potential treatments. In this field, positron emission tomography (PET) has already demonstrated its usefulness, particularly in 6hydroxydopamine (6-OHDA) lesion models of PD in rodents (Casteels et al. 2008; Fricke et al. 2016; Molinet-Dronda et al. 2015). Although these models have been well-recognized and widely used, most use direct injections of the toxin into the SNpc or medial forebrain bundle (MFB), producing a rapid and massive (> 90%) degeneration of DA neurons (Gubellini and Kachidian 2015) that reflect late stages of PD (Glajch et al. 2012). By contrast, administration of 6-OHDA in the striatum produces a progressive and moderate lesion corresponding to early stages of the disease (Kirik et al. 1998; Deumens et al. 2002), appearing therefore better adapted for the evaluation of potential treatments. Several modalities of striatal 6-OHDA administration have already been described, using different doses and injection sites. The administration of low dose in 3 different sites of the rat striatum was recently shown to induce a stable and reliable moderate lesion as assessed by rotational behavior and number of intact dopaminergic cells (Penttinen et al. 2016).

In this study, we fully characterized a close moderate 6-OHDA lesion model suitable

188

for neuroimaging modalities, especially using PET. To this aim, we explored the degeneration of DA neurons by in vivo PET imaging with [¹⁸F]LBT-999, a dopamine transporter (DAT) tracer useful for PET human studies (Arlicot et al. 2017; Ribeiro et al. 2017). These imaging findings were compared to other characteristics of the model, such as the microglia activation and brain metabolome which were explored through in vitro analyses.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals

All procedures were conducted in accordance with the European Community Council Directive 2010/63/EU for laboratory animal care and the experimental procedure was validated by the Regional Ethical Committee (Authorization N°00434.02). Experiments were carried out on adult male Wistar rats (Charles River, France) weighting 300 ± 5 g (n = 22) at the beginning of the experiments. Animals were housed in groups of two per cage in a temperature ($21 \pm 1^{\circ}$ C) and humidity ($55 \pm 5\%$) controlled environment under a 12-h light/dark cycle, with food and water available *ad libitum*.

2.2. 6-OHDA lesion

Twenty minutes before surgery, rats were injected intra-peritoneally with pargyline hydrochloride (50 mg/kg, Abcam, Paris, France) in order to prevent 6-OHDA oxidation by monoamine oxidase. Then, they were anesthetized with isoflurane (4%, 500 mL/min, Baxter, France), placed on a stereotaxic frame (Stoelting, Phymep, Paris, France) and maintained under isoflurane 2.5% (500 mL/min) during surgery. Body temperature was monitored and kept as constant as possible (37°C) using a

thermal probe. Lesion was obtained by intrastriatal injection of 6-OHDA hydrochloride (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). A total of 12 µg of 6-OHDA was administered in three areas of the right striatum (2 mg/mL in 0.01% ascorbic acid dissolved in saline, pH 4.5, i.e. 4 µg in 2 µL for each area) using a 25 µL Hamilton Gastight syringe (Hamilton, Massy, France) with a 30-gauge needle (Phymep, Paris, France). Stereotaxic coordinates from Bregma (Figure 1) were: AP1 = +1.6 mm, L1 = -2.8 mm, P1 = -6 mm; AP2 = 0.0 mm, L2 = -4.1 mm, P2 = -5.5 mm; AP3 = -1.2 mm, L3 = -4.5 mm, P3 = -5.5 mm, according to the rat brain Atlas of Paxinos and Watson (2009). The 6-OHDA solution was perfused at the rate of 0.5 µL/min. After each injection, the needle was kept in place for 5 minutes to minimize backflow of the solution. Following surgery, the rats were given buprenorphine (0.05 mg/kg sub-cutaneously) for post-operative pain.

2.3. Amphetamine-induced rotations test

At 13 days post-lesion, all rats received an intra-peritoneal injection of damphetamine sulfate (3 mg/kg) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and were placed in automatic rotometer bowls (Imetronic, Pessac, France). Fifteen minutes after injection, the number of ipsilateral rotation was measured for 2 hours. Full rotation was determined as a complete, uninterrupted 360° turn.

2.4. PET imaging study

2.4.1. Radiotracer preparation

No-carrier added [18 F]LBT-999 was prepared as previously described (Sérrière et al. 2014) and obtained with a radiochemical purity > 98% and a specific activity comprised between 30 and 190 GBq/µmol.

2.4.2. PET imaging and data analyses

PET imaging was performed at 14 days post-lesion (n = 8) using a microPET/CT SuperArgus system (Sedecal, Madrid, Spain), according to a previously published method (Sérrière et al. 2014). Before PET acquisition, a 5-minute computed tomography scan was acquired for attenuation correction. A bolus injection of 37 MBq/300 g body weight of [18 F]LBT-999 in saline was administered into the tail vein of anesthetized rats, and acquisition lasted 50 min. PET images were analyzed with the region of interests (ROIs) for the left striatum (Contralateral-Striatum (C-ST), i.e non lesioned striatum), right striatum (Ipsilateral-Striatum (I-ST), i.e lesioned striatum), and Cerebellum (CE). In this study, the Standard Uptake Value ratio (SUVr) was used as quantitative criterion. All SUVrs were calculated using the CE as reference region.

2.5. Metabolomics study

2.5.1. Brain tissue preparation

After PET imaging, at 14 days post-lesion, animals (n = 8) were killed by decapitation and the following four ROIs were removed: C-ST, I-ST, contralateral-substantia nigra (C-SN), and ipsilateral-substantia nigra (I-SN). As previously described by Diémé et al. (2017), samples were weighted and lyophilized for 48 hours in a FreeZone[®] Freeze Dry Systems 4.5 I Benchtop lyophilizer (Labcono[®], Kansas City, Mo, USA) and milled to a fine powder (from 40 mg of fresh tissue for striatum and 6 mg for SN, around 10 mg and 1 mg of powder were obtained for each structure, respectively). For the striatum, 3 mg of each lyophilized sample was weighed for further extraction while for the SN, the entire lyophilized-tissue was extracted. After lyophilization,

samples were extracted twice with 1.5 mL of acetonitrile/milliQ water (1/1). After centrifugation liquid phases were isolated and evaporated. Dried residues were kept at -80°C before liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) analysis.

2.5.2. LC-HRMS analysis

The dried residues were reconstituted in 150 μ L MeOH/H₂O (1/1). As previously described by Diémé et al. (2017), LC-HRMS analysis was performed using a UPLC Ultimate 3000 system (Dionex, Sunnyvale, Calif., USA), coupled to a Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Germany) and operating in positive (ESI+) and negative (ESI-) electrospray ionization modes. Chromatography was carried out with a Phenomenex Kinetex 1.7 μ m XB-C18 (150 mm x 2.10 mm) and 100 Å UHPLC column. Mobile phase A consisted of 0.1% formic acid in water and mobile phase B consisted of 0.1% formic acid in methanol. The gradient operated at a flow rate of 0.4 mL/min over a run time of 30 min. During the full-scan acquisition, which ranged from 60 to 900 m/z, the instrument operated at 70 000 resolution (m/z = 200). In order to equilibrate the chromatographic system, twenty quality controls (QCs) (obtained by mixing an equal volume of all samples) were injected. The sequence of samples for analysis was randomized and QCs were analyzed every 10 samples and at the end of the run. Data quality was checked based on QCs results by principal component analysis PCA.

2.5.3. Targeted data processing

A library of standard compounds (Mass Spectroscopy Metabolite Library of standards MS ML®, IROA technologies) was analysed with the same gradient of mobile phases

prepared according to Damont et al. (2015) and obtained with a specific activity of 2.01 TBq/mmol. Six brain sections per animal were studied. Brain sections were allowed to equilibrate at room temperature (RT) for 3 hours and were incubated with 100 pmol/L [¹²⁵I]PE2I in phosphate buffer pH 7.4 at RT for 90 minutes or with 1 nmol/L [³H]DPA-714 in Tris-HCl buffer pH 7.4 at RT for 60 minutes. Nonspecific binding was assessed in the presence of 100 µmol/L cocaine chlorhydrate (Cooper Industrie, Melun, France) for [¹²⁵I]PE2I and 1 µmol/L PK-11195 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) for [³H]DPA-714, respectively. Sections were washed twice in ice-cold buffer $(4^{\circ}C)$ for 5 minutes, then briefly in sterile water at 4°C and dried overnight at RT. Dry sections were made conductive by an application of metal electric tape (3M, Euromedex, Strasbourg, France) on the free side and then placed in the gas chamber of the β-imagerTM 2000 (Biospace Lab, Paris, France). Acquisitions were collected for 4 hours. Two anatomical ROIs for striatum (C-ST and I-ST) were selected manually and identified using the rat brain Atlas of Paxinos and Watson (2009). Using the β -vision software (Biospace Lab, Paris, France), the level of bound radioactivity was directly determined by counting the number of γ -rays for $[^{125}I]PE2I$ or β -particles for $[^{3}H]DPA-714$ emitted from the delineated areas. Radioactivity was quantitated using an image analyzer (M3-vision Biospace Instruments). The radioligand signal in ROIs was measured for each rat and expressed as counts per minute per square millimeter (cpm/mm²). Specific binding was determined by subtracting non-specific binding from the total binding.

2.6.3. Immunofluorescence

For immunostaining of tyrosine hydroxylase (TH) in both the striatum and SN and microglia using CD11b in the SN, brain sections were post-fixed (using PFA 4%, 30

minutes) and blocked (using 5% normal goat serum, 0.3% Triton 100X in 0.1M PBS, 3 hours at RT). Then, sections were incubated with anti-TH (1/1000; Abcam ab112, Paris, France) or an anti-CD11b (1/500; Merck Millipore CBL1512, Saint-Quentin en Yvelines, France) primary antibody overnight at 4°C followed by an incubation with a fluorescence-coupled secondary antibody for 1 hour at RT: either a goat anti-rabbit (Alexa 555; Abcam ab150086, Paris, France) or a goat anti-mouse (Alexa 488; Abcam ab150113) at a dilution of 1/500. Finally, nuclei were counterstained using 4'-6-diamino-2-phenylindole (DAPI) (1/10000; Sigma-Aldrich D9542, Saint-Quentin Fallavier, France) and sections were mounted using a mounting medium for fluorescent staining (Abcam Ab103746, Paris, France). TH and CD11b labeling were visualized using a Leica DM5500 B fluorescence microscope (Germany) with an ORCA-R2 camera (Hamamatsu Photonics, Massy, France). Pictures were analyzed using ImageJ Software. For TH labeling in the striatum, the percentage of the area stained by TH was automatically measured in each ROI in both the C-ST and I-ST. In the SN, the number of TH positive cells was manually counted in the C-SN and the I-SN. For CD11b labeling, a ROI of SN was designed for each section in both C-SN and I-SN. In these ROIs, the percentage of the area stained by CD11b was automatically measured.

2.7. Statistical analysis

All results were expressed as mean ± standard error mean (SEM). For PET imaging, autoradiographic and immunofluorescence analysis, comparisons between C-ST and I-ST, and between C-SN and I-SN were performed using the Wilcoxon test twotailed. Statistical analyses were carried out with the GraphPad Prism software version 6. For the metabolomics study, multivariate analysis was performed using the Simca-

P⁺-13 software (Umetrics, Umea, Sweden). Non-parametric tests were performed using MetaboAnalyst (www.metaboanalyst.ca) in order to select significant metabolites. As we were in a multiple testing cases, a non-parametric test was performed with an adjusted p-value (set at 0.05) with a False Discovery Rate (FDR) adjusted procedure (based on the Benjamini-Hochberg adjustment). Criteria for metabolite selection for further data processing were: variable importance in projection (VIP) score in multivariate analysis >0.5, fold change (FC) ratio <0.75 or >1.25 and a *p*-value < 0.05. These metabolites were introduced in pathways analysis module in Metaboanalyst based on the latest version of KEEG, given a metabolic pathway analysis (MetPA). Pathways of interest were those showing a p-value < 0.05from the pathway enrichment analysis.

3. RESULTS 3.1. Amphetamine-induced rotations test

The amphetamine-induced rotations test was performed at 13 days post-lesion. All animals (n = 22) displayed a turning behavior, with an average of 8.73 \pm 0.67 ipsilateral rotations per minute, demonstrating the 6-OHDA lesion.

3.2. PET imaging study

PET imaging of DAT with $[^{18}F]LBT-999$ (n = 7, 1 rat was excluded due to an injection problem) was performed at 14 days post-lesion. PET brain static images obtained between 30 and 50 minutes post-injection (Figure 2A) revealed that the accumulation of [¹⁸F]LBT-999 was much lower in the I-ST compared to the C-ST. The time activity curves (Figure 2B) showed a rapid uptake of [¹⁸F]LBT-999 in all the ROIs (C-ST, I-ST and CE) after intravenous bolus injection. In the CE, the uptake

decreased rapidly and remained low and stable from 20 minutes post-injection. In contrast, the uptake (SUV) remained high and stable in the C-ST compared to the I-ST at 50 minutes post-injection (4.39 ± 0.31 vs. 1.47 ± 0.18). Analysis of SUVr to the CE obtained between 30 and 50 minutes post-injection (Figure 2C) showed a statistically significant reduction in the I-ST compared to the C-ST (1.69 ± 0.21 vs. 4.68 ± 0.38 , p < 0.05). In all, the SUVr in the I-ST was 64.46 ± 1.68 % lower than the SUVr in the C-ST, reflecting the intensity of the lesion.

3.3. Metabolomics study

Analyses of the metabolome of the striatum and SN were performed by LC-HRMS targeted analysis. The score plots resulting from the OPLS-DA for the striatum (n =8) and the PLS-DA for the SN (n = 7, 1 sample was inoperable because of extraction problem) are represented in Figure 3A and 3B, respectively. Each model was defined by a descriptive value (R^2Y = robustness of the model) and a predictive value (Q^2 = predictive capacity of the model). R²Y was high for both the striatum and SN (0.90 and 0.84, respectively) but Q^2 was lower for the SN than for the striatum (0.53 and 0.78, respectively). However, a Q^2 0.4 was considered as acceptable for a biological model (Worley and Powers 2013). Both OPLS-DA and PLS-DA showed a clear separation between the cerebral structures originating from the ipsilateral and contralateral hemispheres (I-ST vs C-ST and I-SN vs C-SN). Multivariate and univariate analysis (Table 1) identified several metabolites based on their VIP score (VIP score > 0.5), FC ratio (0.75 < FC ratio > 1.25) and p-value (p < 0.05). For the striatum, 4 metabolites were identified: dopamine (lower in I-ST vs. C-ST), glucose-1-phosphate (lower in I-ST vs. C-ST), L-carnitine (higher in I-ST vs. C-ST), and indole-3-acetic-acid (lower in I-ST vs. C-ST). For the SN, only one metabolite was

identified: glucose-6-phosphate (lower in I-SN vs. C-SN). The metabolite pathway analysis showed a highly significant alteration of the arginine and proline metabolism both in the striatum and SN (supplementary Table 1 & Table 2). The Venn diagram of this pathway highlighted specific alteration according to the brain structure (supplementary Figure 1). In addition, in the SN highly significant modifications were found in aminoacyl-tRNA biosynthesis and histidine metabolism (supplementary Table 2).

3.4. Autoradiographic and immunofluorescence analysis

The DAT density was evaluated on coronal brain sections by [¹²⁵I]PE2I binding (n = 14) as illustrated in Figure 4A. As shown in Figure 4B, the specific binding of [¹²⁵I]PE2I was significantly reduced in the I-ST compared to the C-ST (4.66 \pm 0.33 vs. 19.91 \pm 0.77 cpm/mm², respectively, p = 0.0001). The mean percentage of lesion was 76.35 \pm 1.71%. The TSPO density was assessed by [³H]DPA-714 binding on adjacent brain sections from each animal as illustrated in Figure 4C. The specific binding of [³H]DPA-714 (Figure 4D) was significantly higher in the I-ST compared to the C-ST (3.12 \pm 0.33 vs. 1.60 \pm 0.15 cpm/mm², respectively, p = 0.0001). The TSPO related to [³H]DPA-714 binding was 93.98 \pm 7.24% higher in the I-ST than in the C-ST.

The staining of TH was performed on coronal brain sections in both the C-ST and I-ST (n = 14) as illustrated in Figure 5A. Quantitative measurements in these ROIs (Figure 5B) showed that the area occupied by TH staining was significantly lower (by 71.26 \pm 2.34%) in the I-ST compared to the C-ST (13.92 \pm 1.16 vs. 48.45 \pm 0.43%, respectively, p = 0.0001). The staining of TH was also carried out on coronal brain sections in the SN (n = 14) (Figure 6A). Quantitative measurements in these ROIs

(Figure 6B) showed that the number of TH-positive cells was statistically significantly lower (by $63.87 \pm 1.57\%$) in the I-SN compared to the C-SN (23.64 ± 1.60 vs. 65.14 ± 2.62 TH-positive cells, respectively, p = 0.0001). Immunostaining of CD11b was also performed (Figure 6C) on adjacent brain sections. As illustrated in Figure 6D, quantitative measurements showed that the area occupied by CD11b staining was statistically significantly higher (by $2690 \pm 330\%$) in the I-SN compared to the C-SN (10.64 ± 0.83 vs $0.44 \pm 0.04\%$, respectively, p = 0.0001).

4. DISCUSSION

Since current PD treatments do not provide adequate neuroprotection and are unable to slow down the progression of PD, there is an urgent need to reach novel therapeutic strategies (Tarazi et al. 2014). In this context, the development and characterization of animal models of PD enabling the evaluation of these treatments especially using neuroimaging modalities is paramount. Toxic models of PD are based on systemic or local administration of neurotoxins which induce degeneration of the nigrostriatal DA system (Blandini et al. 2008). Among these models, the injection of 6-OHDA (Ungerstedt 1968) in the striatum produces a specific retrograde, progressive, and moderate lesion of nigrostriatal DA neurons. This type of lesion mimicking early stages of PD appears more adapted than total lesions for the evaluation of potential neuroprotective strategies. However, the extension of the lesion depends on several experimental parameters including the total dose of injected toxin and the site of injection (Kirik et al. 1998). On this basis, we used a model in which the 6-OHDA is unilaterally delivered in 3 sites in the striatum, in order to achieve a moderate and stable lesion along the structure.

Our experiments were conducted at 14 days post-lesion, as it is known that the intra-

striatal injection of 6-OHDA induces the degeneration of pre-synaptic nerve terminals within first days of injection, followed by a loss of dopaminergic cell bodies in the SN reaching a stable level from 2 weeks (Duty and Jenner 2011). We first assessed the rotational behavior of lesioned rats following amphetamine administration, which reflects the intensity of striatal dopamine depletion (Iancu et al. 2005; Tronci et al. 2012) and observed reproducible results among animals, indicative of a stable and reliable lesion. This observation was confirmed through direct in vivo evaluation of the striatal DAT using PET imaging, which provides assessment of dopaminergic nerve terminals (Brooks and Pavese 2011; Tatsch and Poepperl 2013). For this aim, we used the [¹⁸F]LBT-999, a selective radioligand of DAT used as promising tracer in clinical research (Arlicot et al. 2017), which has proven its usefulness in 6-OHDAlesioned rats to quantitate the degree of lesion (Grealish et al. 2014; Serriere et al. 2015). Accumulation of [¹⁸F]LBT-999 in the lesioned striatum was significantly lower than in the non-lesioned tissue, demonstrating a reproducible decrease in the DAT density reflecting the moderate (i.e., 70%) intensity of the lesion. This finding was in agreement with the significant dopamine depletion that we measured in the ipsilateral striatum using LC-HRMS targeted analysis. The intensity of the lesion as measured by PET imaging in the striatum was similar to that we obtained both using autoradiographic experiments with the in vitro specific radioligand of DAT [¹²⁵I]PE2I (Chalon et al. 1999) and using TH immunostaining. The ipsilateral SN showed a significant (60%) and reproducible reduction in the number of TH-positive cells, reflecting a depletion of DA neurons cell bodies. Overall, these findings demonstrated that this model was characterized by a reproducible and moderate lesion of DA neurons that can be assessed by PET imaging.

In association with the loss of DA neurons, activation of CNS immune cells such as

microglia is typically observed in animal models of PD and in the SN of PD patients both in PET scan and post-mortem studies (Thornton and Vink 2012). Microglial activation, one of the major hallmarks of neuroinflammation, induces the release of pro-inflammatory and cytotoxic molecules which contribute to DA neurons degeneration (Chao et al. 2014; Song and Kim 2016). At the same time, dying DA neurons release substances such as ATP which promote microglial activation (Saijo and Glass 2011). This bi-directional interaction between microglia and DA neurons is known to fuel the neurodegenerative process. In our model, we quantitated the striatal density of the 18kDa TSPO which is considered as a sensitive marker of microglial activation (Chen and Guilarte 2008; Rupprecht et al. 2010) using [3H]DPA-714, a highly sensitive radioligand of TSPO which has demonstrated its usefulness to assess striatal microglial activation in a rat model of brain excitotoxicity (Foucault-Fruchard et al. 2017). In parallel, microglial activation was assessed in the SN using immunostaining of CD11b, a surface protein which is overexpressed during activation of these cells (Roy et al. 2008). We observed robust microglial activation in both the striatum and SN ipsilateral to the lesion, indicating that the partial degeneration of nigrostriatal DA neurons was associated with marked neuroinflammation, in agreement with previously obtained data (Maia et al. 2012).

In order to better characterize the animal model, we performed a metabolomics analysis of brain structures involved in the nigrostriatal DA pathway, i.e., the striatum and SN. To our knowledge, only a few metabolomics studies have been performed in preclinical models of PD (Gao et al. 2013; Zheng et al. 2016). Dopamine depletion in the ipsilateral striatum was accompanied with a significant decrease in two metabolites associated with glucose pathways, glucose-1-phosphate in the ipsilateral striatum and glucose-6-phosphate in the ipsilateral SN. These results are in agreement

with [¹⁸F]-FDG PET imaging studies performed in 6-OHDA models indicating an hypometabolism in the striatum and SN on the lesioned side (Casteels et al. 2008; Jang et al. 2012; Silva et al. 2013). Interestingly, we observed a significant increase in free carnitine in the ipsilateral striatum but not in the SN. This increase could be an endogenous mechanism aimed at protecting dopaminergic nerve endings. In this context, L-carnitine and its acetylated derivative acetyl-L-carnitine have been shown to have anti-inflammatory properties when used as supplement in different animal models of neurodegenerative disorders (Silva-Adaya et al. 2008; Sarkar et al. 2015; Afshin-Majd et al. 2017: Ferreira and McKenna 2017). It is widely supposed that brain did not use fatty acids as energy substrates (Panov et al. 2014; Schonfeld et al. 2013). However, although this is true for neurons, the carnitine palmitoyl transferase (CPT) system, which allows the entry of long-chain fatty acids into the mitochondria for ß-oxidation, is functional in astrocytes (Panov et al. 2014; Jernberg et al. 2017) and in embryonic (Xie et al. 2016) and adult (Knobloch et al. 2017) neural stem cells. The role of carnitine in its anti-inflammatory or energetic functions remains to be elucidated in this model and may constitute for the future a starting point for the development of innovative therapeutic.

Beside single significant metabolites, the arginine and proline pathway was found to be altered both in the striatum and SN. Three metabolites involved in the polyamines biosynthesis were specifically modified in the striatum (L-Ornithine, Spermine and Spermidine). Polyamines are ubiquitous molecules involved in apoptosis, cell division and signal transduction (Handa et al. 2018) although its precise role remains to be elucidated. Accumulating evidences suggest that polyamines pathway is involved in the pathogenesis of PD (Gomes-Trolin et al. 2002; Lewandowski et al. 2010). In the SN, a highly significant modification was found in aminoacyl-tRNA biosynthesis

involving L-Phenylalanine and L-Tyrosine and in the histidine metabolism in agreement with the lesion. In this later pathway, an increased level of histamine was observed, as already reported PD subjects (Anichtchik et al. 2000; Rinne et al. 2002). It can be pointed out that histamine can have neurotoxic effect (Vizuete et al. 2000; Rocha et al. 2016; Liu et al. 2007). These results show that, alongside dopaminergic and energetic (glucose consumption) deregulation already known in PD, other alterations are observed (carnitine, polyamines, amino acids).

In conclusion, we extensively explored a robust 6-OHDA lesion model of PD in the rat which was characterized by a reproducible and moderate degeneration of DA neurons associated with a marked neuroinflammation, mimicking the early stages of the disease. The density of DA neurons was reliably quantitated in vivo by PET. Microglia activation was assessed herein using the TSPO ligand DPA-714, in vitro, but this ligand is also useful for clinical (Hamelin et al. 2016) and rat (Kong et al. 2016; Ory et al. 2016; Thomas et al. 2016) PET imaging.

Our original metabolomics studies highlighted the alteration of specific metabolites and metabolic pathways. It is not clear whether these modifications are deleterious or compensatory protective endogenous mechanisms consecutive to the lesion. In this context, further experiments will be necessary to evidence potential beneficial impact induced by the modulation of the carnitine, arginine/proline and/or histidine metabolism.

REFERENCES

- Afshin-Majd, S., Bashiri, K., Kiasalari, Z., Baluchnejadmojarad, T., Sedaghat, R., Roghani, M. 2017. Acetyl-l-carnitine protects dopaminergic nigrostriatal pathway in

6-hydroxydopamine-induced model of Parkinson's disease in the rat. *Biomed Pharmacother*, 89: 1-9. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.02.007.

- Anichtchik, O. V., Rinne, J. O., Kalimo, H., Panula, P. 2000. An altered histaminergic innervation of the substantia nigra in Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 163: 20-30. DOI: 10.1006/exnr.2000.7362.

Arlicot, N., Vercouillie, J., Malherbe, C., Bidault, R., Gissot, V., Maia, S., Barantin,
L., Cottier, J. P., Deloye, J. B., Guilloteau, D., Ribeiro, M. J. 2017. PET imaging of
Dopamine Transporter with 18F-LBT999: first human exploration. *J Nucl Med*, 58:
276.

- Blandini, F., Armentero, M. T., Martignoni, E. 2008. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism Relat Disor*, 14 Suppl 2, S124-S129. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2008.04.015.

- Brooks, D. J., Pavese, N. 2011. Imaging biomarkers in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 95: 614-628. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2011.08.009.

- Casteels, C., Lauwers, E., Bormans, G., Baekelandt, V., Van Laere, K. 2008. Metabolic-dopaminergic mapping of the 6-hydroxydopamine rat model for Parkinson's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 35: 124-134. DOI: 10.1007/s00259-007-0558-3.

- 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)-2β-carbomethoxy-3 β-(4'-methylphenyl)nortropane as a selective and potent inhibitor of the neuronal dopamine transporter. *J Pharmacol Exp Ther*, 291: 648-654.

- Chao, Y., Wong, S. C., Tan, E. K. 2014. Evidence of inflammatory system involvement in Parkinson's disease. *Biomed Res Int*, 2014: 308654. DOI: 10.1155/2014/308654.

- Chen, M. K., Guilarte, T. R. 2008. Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacol Ther*, 118: 1-17. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2007.12.004.

Chinta, S. J., Andersen, J. K. 2005. Dopaminergic neurons. *Int J Biochem Cell Biol*, 37: 942-946. DOI: 10.1016/j.biocel.2004.09.009.

- Collins, L. M., Toulouse, A., Connor, T. J., Nolan, Y. M. 2012. Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, 62: 2154-2168. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2012.01.028.

- Damont, A., Garcia-Argote, S., Buisson, D. A., Rousseau, B., Dolle, F. 2015. Efficient tritiation of the translocator protein (18 kDa) selective ligand DPA-714. *J Labelled Comp Radiopharm*, 58: 1-6. DOI: 10.1002/jlcr.3252.

- Dauer, W., Przedborski, S. 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39: 889-909.

- Deumens, R., Blokland, A., Prickaerts, J. 2002. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol*, 175: 303-317. DOI: 10.1006/exnr.2002.7891.

- Diémé, B., Lefèvre, A., Nadal-Desbarats, L., Galineau, L., Madji Hounoum, B., Montigny, F., Blasco, H., Andres, C. R., Emond, P., Mavel, S. 2017. Workflow methodology for rat brain metabolome exploration using NMR, LC-MS and GC-MS analytical platforms. *J Pharm Biomed Anal*, 142: 270-278. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.03.068.

- Duty, S., Jenner, P. 2011. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol*, 164: 1357-1391. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01426.x.

- Ferreira, G. C., McKenna, M. C. 2017. L-Carnitine and Acetyl-L-carnitine Roles

and Neuroprotection in Developing Brain. *Neurochem Res*, 42: 1661-1675. DOI: 10.1007/s11064-017-2288-7.

Foucault-Fruchard, L., Doméné, A., Page, G., Windsor, M., Emond, P., Rodrigues, N., Dolle, F., Damont, A., Buron, F., Routier, S., Chalon, S., Antier, D. 2017.
Neuroprotective effect of the alpha 7 nicotinic receptor agonist PHA 543613 in an in vivo excitotoxic adult rat model. *Neuroscience*, 356: 52-63. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2017.05.019.

- Fricke, I. B., Viel, T., Worlitzer, M. M., Collmann, F. M., Vrachimis, A., Faust, A., Wachsmuth, L., Faber, C., Dolle, F., Kuhlmann, M. T., Schafers, K., Hermann, S., Schwamborn, J. C., Jacobs, A. H. 2016. 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease-like degeneration generates acute microgliosis and astrogliosis in the nigrostriatal system but no bioluminescence imaging-detectable alteration in adult neurogenesis. *Eur J Neurosci*, 43: 1352-1365, DOI: 10.1111/ejn.13232.

- Gao, H. C., Zhu, H., Song, C. Y., Lin, L., Xiang, Y., Yan, Z. H., Bai, G. H., Ye, F. Q., Li, X. K. 2013. Metabolic changes detected by ex vivo high resolution 1H NMR spectroscopy in the striatum of 6-OHDA-induced Parkinson's rat. *Mol Neurobio*, 47: 123-130. DOI: 10.1007/s12035-012-8336-z.

- Glajch, K. E., Fleming, S. M., Surmeier, D. J., Osten, P. 2012. Sensorimotor assessment of the unilateral 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*, 230: 309-316. DOI: 10.1016/j.bbr.2011.12.007.

- Gomes-Trolin, C., Nygren, I., Aquilonius, S. M., Askmark, H. 2002. Increased red blood cell polyamines in ALS and Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 177: 515-520.

- Grealish, S., Diguet, E., Kirkeby, A., Mattsson, B., Heuer, A., Bramoulle, Y., Van Camp, N., Perrier, A. L., Hantraye, P., Bjorklund, A., Parmar, M. 2014. Human ESC-derived dopamine neurons show similar preclinical efficacy and potency to fetal

neurons when grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Cell Stem Cell*, 15: 653-665. DOI: 10.1016/j.stem.2014.09.017.

- Gubellini, P., Kachidian, P. 2015. Animal models of Parkinson's disease: An updated overview. *Rev Neurol (Paris)*, 171: 750-761. DOI: 10.1016/j.neurol.2015.07.011.

- Hamelin, L., Lagarde, J., Dorothee, G., Leroy, C., Labit, M., Comley, R. A., de Souza, L. C., Corne, H., Dauphinot, L., Bertoux, M., Dubois, B., Gervais, P., Colliot, O., Potier, M. C., Bottlaender, M., Sarazin, M. IMABio team Clinical. 2016. Early and protective microglial activation in Alzheimer's disease: a prospective study using 18F-DPA-714 PET imaging. *Brain*, 139: 1252-1264. DOI: 10.1093/brain/aww017.

- Handa, A. K., Fatima, T., Mattoo, A. K. 2018. Polyamines: Bio-Molecules with Diverse Functions in Plant and Human Health and Disease. *Front Chem*, 6: 10. DOI: 10.3389/fchem.2018.00010.

- Iancu, R., Mohapel, P., Brundin, P., Paul, G. 2005. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behav Brain Res*, 162: 1-10. DOI: 10.1016/j.bbr.2005.02.023.

- Jang, D. P., Min, H. K., Lee, S. Y., Kim, I. Y., Park, H. W., Im, Y. H., Lee, S., Sim, J., Kim, Y. B., Paek, S. H., Cho, Z. H. 2012. Functional neuroimaging of the 6-OHDA lesion rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 513: 187-192. DOI: 10.1016/j.neulet.2012.02.034.

- Jankovic, J. 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol* Neurosurg. *Psychiatry*, 79: 368-376. DOI: 10.1136/jnnp.2007.131045.

- Jernberg, J. N., Bowman, C. E., Wolfgang, M. J., Scafidi, S. 2017. Developmental regulation and localization of carnitine palmitoyltransferases (CPTs) in rat brain. *J Neurochem*, 142: 407-419. DOI: 10.1111/jnc.14072.

- Kirik, D., Rosenblad, C., Bjorklund, A. 1998. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol*, 152: 259-277. DOI: 10.1006/exnr.1998.6848.

- Knobloch, M., Pilz, G. A., Ghesquiere, B., Kovacs, W. J., Wegleiter, T., Moore, D. L., Hruzova, M., Zamboni, N., Carmeliet, P., Jessberger, S. 2017. A Fatty Acid Oxidation-Dependent Metabolic Shift Regulates Adult Neural Stem Cell Activity. *Cell Rep*, 20: 2144-2155. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.08.029.

Kong, X., Luo, S., Wu, J. R., Wu, S., De Cecco, C. N., Schoepf, U. J., Spandorfer,
A. J., Wang, C. Y., Tian, Y., Chen, H. J., Lu, G. M., Yang, G. F., Zhang, L. J. 2016.
(18)F-DPA-714 PET Imaging for Detecting Neuroinflammation in Rats with Chronic Hepatic Encephalopathy. *Theranostics*, 6: 1220-1231. DOI: 10.7150/thno.15362.

- Lewandowski, N. M., Ju, S., Verbitsky, M., Ross, B., Geddie, M. L., Rockenstein, E., Adame, A., Muhammad, A., Vonsattel, J. P., Ringe, D., Cote, L., Lindquist, S., Masliah, E., Petsko, G. A., Marder, K., Clark, L. N., Small, S. A. 2010. Polyamine pathway contributes to the pathogenesis of Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 16970-16975. DOI: 10.1073/pnas.1011751107.

- Liu, C. Q., Chen, Z., Liu, F. X., Hu, D. N., Luo, J. H. 2007. Involvement of brain endogenous histamine in the degeneration of dopaminergic neurons in 6hydroxydopamine-lesioned rats. *Neuropharmacology*, 53: 832-841. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2007.08.014.

- Madji Hounoum, B., Mavel, S., Coque, E., Patin, F., Vourc'h, P., Marouillat, S., Nadal-Desbarats, L., Emond, P., Corcia, P., Andres, C. R., Raoul, C., Blasco, H. 2017. Wildtype motoneurons, ALS-Linked SOD1 mutation and glutamate profoundly modify astrocyte metabolism and lactate shuttling. *Glia*, 65: 592-605. DOI: 10.1002/glia.23114.

- Maia, S., Arlicot, N., Vierron, E., Bodard, S., Vergote, J., Guilloteau, D., Chalon, S. 2012. Longitudinal and parallel monitoring of neuroinflammation and neurodegeneration in a 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Synapse*, 66: 573-583. DOI: 10.1002/syn.21543.

Molinet-Dronda, F., Gago, B., Quiroga-Varela, A., Juri, C., Collantes, M., Delgado, M., Prieto, E., Ecay, M., Iglesias, E., Marin, C., Penuelas, I., Obeso, J. A. 2015.
Monoaminergic PET imaging and histopathological correlation in unilateral and bilateral 6-hydroxydopamine lesioned rat models of Parkinson's disease: a longitudinal in-vivo study. *Neurobiol Dis*, 77: 165-172. DOI: 10.1016/j.nbd.2015.01.007.

Nasrallah, I., Dubroff, J. 2013. An overview of PET neuroimaging. *Semin Nucl Med*,
43: 449-461. DOI: 10.1053/j.semnuclmed.2013.06.003.

- Ory, D., Postnov, A., Koole, M., Celen, S., de Laat, B., Verbruggen, A., Van Laere, K., Bormans, G., Casteels, C. 2016. Quantification of TSPO overexpression in a rat model of local neuroinflammation induced by intracerebral injection of LPS by the use of [(18)F]DPA-714 PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 43: 163-172. DOI: 10.1007/s00259-015-3172-9.

- Panov, A., Orynbayeva, Z., Vavilin, V., Lyakhovich, V. 2014. Fatty acids in energy metabolism of the central nervous system. *Biomed Res Int*, 2014: 472459. DOI: 10.1155/2014/472459.

- Paxinos, G., Watson, C. 2009. The Rat Brain in Stereotaxic coordinates. Elsevier Academic Press, San Diego.

- Penttinen, A. M., Suleymanova, I., Albert, K., Anttila, J., Voutilainen, M. H., Airavaara, M. 2016. Characterization of a new low-dose 6-hydroxydopamine model

208

of Parkinson's disease in rat. J Neurosci Res, 94: 318-328. DOI: 10.1002/jnr.23708.

- Pfeiffer, R. F. 2016. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 22 Suppl 1, S119-S122. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2015.09.004.

Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkmann, J., Schrag, A. E., Lang, A. E. 2017. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers*, 3: 17013.
DOI: 10.1038/nrdp.2017.13.

- Ribeiro, M. J., Vercouillie, J., Arlicot, N., Mondon, K., Gissot, V., Maia, S., Barantin, L., Cottier, J. P., Deloye, J. B., Guilloteau, D. 2017. A simplified method for the diagnosis of striatal dopaminergic dysfunction using PET with a new fluorine DAT tracer, the 18F-LBT-999. *J Nucl Med*, 58: 413.

Rinne, J. O., Anichtchik, O. V., Eriksson, K. S., Kaslin, J., Tuomisto, L., Kalimo,
 H., Roytta, M., Panula, P. 2002. Increased brain histamine levels in Parkinson's
 disease but not in multiple system atrophy. *J Neurochem*, 81: 954-960.

- Rocha, S. M., Saraiva, T., Cristovao, A. C., Ferreira, R., Santos, T., Esteves, M., Saraiva, C., Je, G., Cortes, L., Valero, J., Alves, G., Klibanov, A., Kim, Y. S., Bernardino, L. 2016. Histamine induces microglia activation and dopaminergic neuronal toxicity via H1 receptor activation. *J Neuroinflammation*, 13: 137. DOI: 10.1186/s12974-016-0600-0.

Roy, A., Jana, A., Yatish, K., Freidt, M. B., Fung, Y. K., Martinson, J. A., Pahan. K.
2008. Reactive oxygen species up-regulate CD11b in microglia via nitric oxide: Implications for neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med*, 45: 686-699. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.026.

- Rupprecht, R., Papadopoulos, V., Rammes, G., Baghai, T. C., Fan, J., Akula, N., Groyer, G., Adams, D., Schumacher, M. 2010. Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug* Discov, 9: 971-988. DOI: 10.1038/nrd3295.

- Saijo, K., Glass, C. K. 2011. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 11: 775-787. DOI: 10.1038/nri3086.

- Sarkar, S., Gough, B., Raymick, J., Beaudoin, M. A., Ali, S. F., Virmani, A., Binienda, Z. K. 2015. Histopathological and electrophysiological indices of rotenoneevoked dopaminergic toxicity: Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine. *Neurosci Lett*, 606: 53-59. DOI : 10.1016/j.neulet.2015.08.044.

- Schönfeld, P., Reiser, G. 2013. Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy? Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 33: 1493-1499. DOI: 10.1038/jcbfm.2013.128.

- Sérrière, S., Tauber, C., Vercouillie, J., Guilloteau, D., Deloye, J. B., Garreau, L., Galineau, L., Chalon, S. 2014. In vivo PET quantification of the dopamine transporter in rat brain with [(1)(8)F]LBT-999. *Nucl Med Biol*, 41: 106-113. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2013.09.007.

Sérrière, S., Doméné, A., Vercouillie, J., Mothes, C., Bodard, S., Rodrigues, N., Guilloteau, D., Routier, S., Page, G., Chalon, S. 2015. Assessment of the Protection of Dopaminergic Neurons by an alpha7 Nicotinic Receptor Agonist, PHA 543613 Using [(18)F]LBT-999 in a Parkinson's Disease Rat Model. *Front Med (Lausanne)*, 2: 61. DOI: 10.3389/fmed.2015.00061.

- Silva, M. D., Glaus, C., Hesterman, J. Y., Hoppin, J., Puppa, G. H., Kazules, T., Orcutt, K. M., Germino, M., Immke, D., Miller, S. 2013. Regional, kinetic [(18)F]FDG PET imaging of a unilateral Parkinsonian animal model. *Am J Nucl Med Mol Imaging*, 3: 129-141.

- Silva-Adaya, D., Perez-De La Cruz, V., Herrera-Mundo, M. N., Mendoza-Macedo,

K., Villeda-Hernandez, J., Binienda, Z., Ali, S. F., Santamaria, A. 2008. Excitotoxic damage, disrupted energy metabolism, and oxidative stress in the rat brain: antioxidant and neuroprotective effects of L-carnitine. *J Neurochem*, 105: 677-689. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.05174.x.

 Song, J., Kim, J. 2016. Degeneration of Dopaminergic Neurons Due to Metabolic Alterations and Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci*, 8: 65. DOI: 10.3389/fnagi.2016.00065.

- Tarazi, F. I., Sahli, Z. T., Wolny, M., Mousa, S. A. 2014. Emerging therapies for Parkinson's disease: from bench to bedside. *Pharmacol Ther*, 144: 123-133. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.05.010.

- Tatsch, K., Poepperl, G. 2013. Nigrostriatal dopamine terminal imaging with dopamine transporter SPECT: an update. *J Nucl Med*, 54: 1331-1338. DOI: 10.2967/jnumed.112.105379.

- Thomas, C., Vercouillie, J., Doméné, A., Tauber, C., Kassiou, M., Guilloteau, D., Destrieux, C., Sérrière, S., Chalon, S. 2016. Detection of Neuroinflammation in a Rat Model of Subarachnoid Hemorrhage Using [18F]DPA-714 PET Imaging. *Mol Imaging*, 15. DOI: 10.1177/1536012116639189.

- Thornton, E., Vink, R. 2012. Treatment with a substance P receptor antagonist is neuroprotective in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of early Parkinson's disease. PLoS One 7, e34138. DOI: 10.1371/journal.pone.0034138.

- Tronci, E., Shin, E., Bjorklund, A., Carta, M. 2012. Amphetamine-induced rotation and L-DOPA-induced dyskinesia in the rat 6-OHDA model: a correlation study. *Neurosci Res*, 73: 168-172. DOI: 10.1016/j.neures.2012.03.004.

- Ungerstedt, U. 1968. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol*, 5: 107-110.

- Vingill, S., Connor-Robson, N., Wade-Martins, R. 2017. Are rodent models of Parkinson's disease behaving as they should?. *Behav Brain Res.* DOI: 10.1016/j.bbr.2017.10.021.

- Vizuete, M. L., Merino, M., Venero, J. L., Santiago, M., Cano, J., Machado, A. 2000. Histamine infusion induces a selective dopaminergic neuronal death along with an inflammatory reaction in rat substantia nigra. *J Neurochem*, 75: 540-552.

- Wang, Q., Liu, Y., Zhou, J. 2015. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. *Transl Neurodegener*, 4: 19. DOI: 10.1186/s40035-015-0042-0.

- Worley, B., Powers, R. 2013. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Curr Metabolomics*, 1: 92-107. DOI: 10.2174/2213235X11301010092.

- Xie, Z., Jones, A., Deeney, J. T., Hur, S. K., Bankaitis, V. A. 2016. Inborn Errors of Long-Chain Fatty Acid beta-Oxidation Link Neural Stem Cell Self-Renewal to Autism. *Cell Rep*, 14: 991-999. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.01.004.

- Zheng, H., Zhao, L., Xia, H., Xu, C., Wang, D., Liu, K., Lin, L., Li, X., Yan, Z., Gao, H. 2016. NMR-Based Metabolomics Reveal a Recovery from Metabolic Changes in the Striatum of 6-OHDA-Induced Rats Treated with Basic Fibroblast Growth Factor. *Mol Neurobiol*, 53: 6690-6697. DOI: 10.1007/s12035-015-9579-2.

Table 1. Metabolites identified by multivariate and univariate analysis in thestriatum and SN with VIP score > 0.50, 0.75 < FC ratio > 1.25 and a p-value <</td>0.05. Abbreviations: SN (Substantia Nigra), C-ST (Contralateral-Striatum), I-ST(Ipsilateral-Striatum), C-SN (Contralateral-Substantia Nigra), I-SN (Ipsilateral-Substantia Nigra).

Metabolite	VIP score	FC ratio	<i>p</i> -value			
Striatum						
Dopamine	2.37	0.44	0.002			
Glucose-1-phosphate	0.53	0.58	0.038			
L-Carnitine	1.91	1.32	0.001			
Indole-3-acetic acid	2.28	0.56	0.007			
SN						
Glucose-6-phosphate	0.93	0.57	0.037			

VIP score = Variable Importance in Projection. FC ratio = Fold Change ratio (I-ST/C-ST and I-SN/C-SN). *p*-value = Wilcoxon rank-sum test at 95% confidence level.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Stereotaxic coordinates of 6-OHDA injection in the right striatum (delimited by a red line) according to the rat brain Atlas of Paxinos and Watson (2009). Abbreviation: 6-OHDA (6-hydroxydopamine).

Figure 2. PET imaging study: quantification of DAT with [¹⁸F]LBT-999 in 6-OHDAlesioned rats (n = 7). PET brain static axial image (upper side) and coronal image (lower side) with [¹⁸F]LBT-999 co-registered with the MRI-template (A). Mean timeactivity curves of [¹⁸F]LBT-999 SUVs in the C-ST, I-ST and CE (B). Quantitative measurements of SUVrs to CE in C-ST and I-ST (C). Data are represented as mean \pm SEM. * p < 0.05 (Wilcoxon test). Abbreviations: 6-OHDA (6-hydroxydopamine), PET (Positron Emission Tomography), DAT (Dopamine Transporter), MRI-Template (Magnetic Resonance Imaging-Template), SUV (Standard Uptake Value), C-ST (Contralateral-Striatum), I-ST (Ipsilateral-Striatum), CE (Cerebellum), SUVr (Standard Uptake Value ratio to CE).

Figure 3. Metabolome score plots following OPLS-DA for striatum (A) (n = 8) and PLS-DA for SN (B) (n = 7) extract by LC-HRMS targeted analysis. Cerebral structures from the contralateral hemisphere (C-ST and C-SN) are represented by blue circles and structures from the ipsilateral hemisphere (I-ST and I-SN) by red circles. The descriptive and predictive performance characteristics of the models are $R^2Y =$ 0.90 and $Q^2 = 0.78$ for striatum; $R^2Y = 0.84$ and $Q^2 = 0.53$ for SN. Abbreviations: OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Scare-Discriminant Analysis), PLS-DA (Partial Least Scare-Discriminant Analysis), LC-HRMS (Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry), SN (Substantia Nigra), C-ST (Contralateral-

Striatum), I-ST (Ipsilateral-Striatum), C-SN (Contralateral-Substantia Nigra), I-SN (Ipsilateral-Substantia Nigra).

Figure 4. Autoradiographic studies: analysis of DAT and TSPO with [¹²⁵I]PE2I and [³H]DPA-714 on coronal brain sections of 6-OHDA-lesioned rats (n = 14). Representative total (upper side) and non-specific (lower side) binding of [¹²⁵I]PE2I in C-ST and I-ST (A). Quantitative measurements of DAT density expressed as specific binding of [¹²⁵I]PE2I in C-ST and I-ST (B). Representative total (upper side) and non-specific (lower side) binding of [³H]DPA-714 in C-ST and I-ST (C). Quantitative measurements of TSPO density expressed as specific binding of [³H]DPA-714 in C-ST and I-ST (D). Data are represented as mean \pm SEM. *** p = 0.0001 (Wilcoxon test). Abbreviations: 6-OHDA (6-hydroxydopamine), DAT (Dopamine Transporter), TSPO (18 kDa Translocator Protein), C-ST (Contralateral-Striatum), I-ST (Ipsilateral-Striatum).

Figure 5. Immunofluorescence analysis of TH on coronal brain sections of 6-OHDAlesioned rats (n = 14). (A). Representative immunostaining of TH in C-ST and I-ST (B). Quantitative measurements of area occupied by TH in C-ST and I-ST. Data are represented as mean \pm SEM. *** p = 0.0001 (Wilcoxon test).

Abbreviations: 6-OHDA (6-hydroxydopamine), TH (Tyrosine Hydroxylase), C-ST (Contralateral-Striatum), I-SN (Ipsilateral-Striatum).

Figure 6. Immunofluorescence studies: analysis of TH and CD11b on coronal brain sections of 6-OHDA-lesioned rats (n = 14). Representative immunostaining of TH in C-SN and I-SN (A). Quantitative measurements of TH positive cells in C-SN and I-
SN (B). Representative immunostaining of CD11b in C-SN and I-SN (C). Quantitative measurements of area occupied by CD11b in C-SN and I-SN (D). Data are represented as mean \pm SEM. *** p = 0.0001 (Wilcoxon test). Abbreviations: 6-OHDA (6-hydroxydopamine), TH (Tyrosine Hydroxylase), C-SN (Contralateral-Substantia Nigra), I-SN (Ipsilateral-Substantia Nigra).

for Review Only





AP1 = +1.6 mm ; L1 = -2.8 mm ; P1 = -6 mm



AP2 = 0.0 mm ; L2 = -4.1 mm ; P2 = -5.5 mm











Synapse









B





٤

I-SN

C-SN

9

B





Elements only in Striatum (4) : L-Ornithine Spermidine Fumarate Spermine

Elements only in SN (9) : L-Glutamine Citrulline L-Aspartate L-Arginine L-Arginine L-Proline Guanidinoacetate Guanidinoacetate Creatine 4-Aminobutanoate 4-Guanidobutanoate Common elements in Striatum and SN (3) : L-Glutamic acid S-(5'-Adenosyl)-L-Methionine Creatine phosphate

Supplementary data

FC ratio	0,91	0,93	0,96	1,39	1,15	1,87	2,20
Metabolites	L-Ornithine	L-Glutamic acid	S-(5'-Adenosyl)-L-Methionine	Spermidine	Fumarate	Creatine phosphate	Spermine
FDR	0,0090661						
Match Status	<u>7144</u>						
Metabolic pathway	Arginine and Proline metabolism						

Table 1. Significant metabolic pathways in the striatum.

Abbreviations : FDR = False Discovery Rate ; FC ratio = Fold Change ratio (I-ST/C-ST), I-ST (Ipsilateral-Striatum), C-ST (Contralateral-Striatum).

Supplementary data

					Metabolic pathway	Match status	FDR	Metabolites	FC ratio
					Arginine and	12/44	1,7372.10-4	L-Glutamine	0,66
Metabolic pathway	Match status	FDR	Metabolites	FC ratio	Proline metabolism			Citrulline	0,69
Aminoacyl-tRNA	16/67	5,1749.10-5	L-Asparagine	0,67				L-Aspartate	0,67
			L-Histidine	0,69				L-Arginine	0,65
			L-Phenylalanine	0,49				L-Glutamic acid	0,63
			L-Arginine	0,65				L-Proline	0,70
			L-Glutamine	0,66				Guanidinoacetate	0,61
			Glycine	0,74				Creatine	0,64
			L-Aspartate	0,67				4-Aminobutanoate	0,72
			L-Serine	0,77				S-(5'-Adenosyl)-L-Methionine	0,70
			L-Methionine	0,47				Creatine phosphate	0,86
			L-Alanine	0,67				4-Guanidobutanoate	0,66
			L-Lysine	0,68					
		-	L-Threonine	0.70	Metabolic pathway	Match status	FDR	Metabolites	FC ratio
		_	L-Tryptophan	0,50	Histidine	6/15	0,0025404	L-Glutamic acid	0,63
		-	L-Tyrosine	0,57				L-Histidine	0,69
		-	L-Proline	0.70				Histamine	4,72
		-	L-Glutamic acid	0,63				Carnosine	0,67
								L-Aspartate	0,67
								N-Methyl-L-Histidine	0,73

Table 2. Significant metabolic pathways in the SN.

Abbreviations : FDR = False Discovery Rate, FC ratio = Fold Change ratio (I-SN/C-SN), SN (Substantia Nigra), I-SN (Ipsilateral-Substantia Nigra), C-SN (Contralateral-Substantia Nigra)





Steven VETEL



Neuroinflammation et neuroprotection dans un modèle de maladie de Parkinson précoce (lésion à la 6-hydroxydopamine chez le rat)

Résumé

Les stratégies thérapeutiques mises en place dans la maladie de Parkinson sont symptomatiques et ne permettent pas de ralentir la progression de la maladie, nécessitant le développement de nouvelles approches neuroprotectrices. La neuroinflammation joue un rôle majeur dans le processus neurodégénératif où elle se manifeste précocement par l'activation de cellules gliales (microglie et astrocytes). En s'appuyant sur l'utilisation de modèles animaux mimant les stades précoces de la maladie, l'élaboration de strategies thérapeutiques à visée anti-inflammatoire constitue donc une approche thérapeutique prometteuse. Ce travail de thèse a consisté à mettre au point et à caractériser un modèle de lésion partielle à la 6-hydroxydopamine chez le rat afin d'évaluer les effets d'une stratégie thérapeutique originale basée sur l'utilisation en combinaison d'un agoniste des récepteurs nicotiniques α7 et d'un agoniste des récepteurs o1. En utilisant différentes approches expérimentales, nous avons tout d'abord évalué le processus neurodégénératif et la neuroinflammation dans le modèle que nous avons mis en place. Nos résultats ont montré une dégénérescence partielle et reproductible des neurones dopaminergiques nigro-striataux associée à une importante neuroinflammation. Nos analyses métabolomiques ont également révélé plusieurs altérations spécifiques, apportant ainsi de nouvelles informations sur les mécanismes intervenant dans le processus neurodégénératif. En s'appuyant sur l'utilisation de la tomographie par émission de positrons, nous avons ensuite évalué longitudinalement le profil d'expression des récepteurs nicotiniques α7 dans les structures clés de la voie nigrostriée. Nos résultats ont montré des modifications transitoires de la densité de ces récepteurs pouvant être liées à des réponses microgliales biphasiques en association avec la cinétique de la dégénérescence neuronale. Ainsi, ces résultats renforcent l'idée de cibler spécifiquement les récepteurs nicotiniques a7 dans l'atténuation des processus neuroinflammatoires. Nous avons enfin évalué les effets de notre stratégie thérapeutique dans le modèle et nos résultats ont permis de montrer que ce type de combinaison préserve partiellement l'intégrité des neurones dopaminergiques nigro-striataux et réduit les réactions gliales chez les animaux lésés. Bien qu'il sera nécessaire de confirmer et de compléter ces résultats avec d'autres analyses, ce type de combinaison pourrait constituer une nouvelle entité biochimique prometteuse dans le traitement de la maladie de Parkinson.

Mots clés : Maladie de Parkinson, 6-hydroxydopamine, neuroinflammation, récepteurs nicotiniques α7, récepteurs σ1.

Résumé en anglais

Currently, therapeutic strategies in Parkinson's disease are symptomatic and the progression of the disease is uncontrolled, requiring the development of new neuroprotective approaches. Neuroinflammation plays a major role in the neurodegenerative process where it occurs early through the activation of glial cells (microglia and astrocytes). Based on the use of animal models mimicking the early stages of the disease, the development of anti-inflammatory strategies is therefore a promising therapeutic approach. This thesis work consisted in the development and the characterisation of a partial 6-hydroxydopamine lesion model in rats in order to evaluate the effects of an original therapeutic strategy based on the combined use of a a7 nicotinic receptors agonist and a o1 receptors agonist. Using different experimental approaches, we first evaluated the neurodegenerative and neuroinflammation processes in the model that we developped. Our results showed a partial and reproductible degeneration of nigro-striatal dopaminergic neurons associated with a marked neuroinflammation. Our metabolic analyses have also revealed several specific alterations, providing new insight on the mechanisms involved in the neurodegenerative process. Using positron emission tomography imaging, we then evaluated longitudinally the expression profile of α 7 nicotinic receptors in the key structures of the nigro-striatal pathway. Our results showed transient changes in the density of these receptors that may be linked to biphasic microglial responses in association with the kinetics of neuronal degeneration. Thus, these results reinforce the hypothesis of specifically targeting α 7 nicotinic receptors in order to reduce the neuroinflammatory processes. Finally, we evaluated the effects of our therapeutic strategy in the model and our results showed that this type of combination partially preserves the integrity of nigro-striatal dopaminergic neurons and reduces glial reactions in lesioned animals. Although it is necessary to confirm and extend these results, this type of combination could represent a promising new pharmacological approach in the treatment of Parkinson's disease.

Key words: Parkinson's disease, 6-hydroxydopamine, neuroinflammation, α7 nicotinic receptors, σ1 receptor.