

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
CHRISTINE ROBITAILLE

NEURORÉGÉNÉRATION DOPAMINERGIQUE PAR L'INHIBITION DES
CALPAÏNES DANS LE CONTEXTE DE LA MALADIE DE PARKINSON

AVRIL 2014

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

*Savoir s'étonner à propos est le premier pas fait
sur la route de la découverte*

-Louis Pasteur

AVANT-PROPOS

La beauté et la complexité du corps humain m'ont toujours fasciné. C'est donc sans hésitation que j'ai orienté mes études dans le domaine de la biologie médicale, une quête dans l'infiniment petit afin de démystifier les secrets de cette fabuleuse machine. Aux commandes siège le cerveau, qui tout en finesse et en subtilités, bouillonne de possibilités. Afin d'approfondir mes connaissances à son sujet, j'ai rejoint le Groupe de Recherche en Neurosciences de l'UQTR pendant mon baccalauréat. La recherche sur la production des mouvements volontaires et plus particulièrement sur la maladie de Parkinson ont piqué ma curiosité pendant les dernières années. Je tiens à témoigner ma reconnaissance aux personnes qui, chacune à leur façon, ont contribué à la réussite de mon projet de maîtrise en neuropharmacologie.

Je remercie sincèrement M. Michel Cyr, mon directeur de recherche, pour m'avoir accordé sa confiance et avoir toujours soutenu mes efforts. Sa grande disponibilité et sa rigueur scientifique m'ont beaucoup inspirée. Je remercie également Mme Geneviève Bureau, assistante de recherche du laboratoire, pour l'amitié, les judicieux conseils et le partage de ses connaissances et de ses expériences professionnelles. À Laure Chagniel, candidate au doctorat, un exemple de rigueur et de détermination, merci pour la petite étincelle qui m'a permis de faire mon entrée dans le monde de la recherche. Je ne peux passer sous silence le soutien et les encouragements de mes amis et collègues: Julie Allyson, Yan Bergeron, Audrée De Montigny. Un merci spécial à Eve Dontigny avec qui j'ai persévétré à travers les hauts et les bas de cette grande aventure à la maîtrise. Je suis également reconnaissante envers le FRSQ qui a soutenu ces années d'études en m'accordant la bourse de formation de maîtrise.

Merci à mes parents pour leur présence et leur soutien dans mon cheminement académique. Vous m'avez bien outillée pour que j'arrive à me dépasser et à devenir qui je suis aujourd'hui. À mon conjoint Gilbert, je te suis infiniment reconnaissante pour ta patience et ton écoute, mes plus tendres et sincères remerciements.

RÉSUMÉ

L'élaboration d'un mouvement harmonieux requiert de fins ajustements qui sont orchestrés par les ganglions de la base. Le neurotransmetteur dopamine est un important acteur dans la modulation de cette commande motrice. La dopamine est normalement synthétisée par les neurones de la substance noire *pars compacta*, lesquels émettent des projections vers le striatum. Dans le contexte pathologique qu'est la maladie de Parkinson, ces neurones dopaminergiques meurent prématûrement, donnant lieu à des tremblements caractéristiques ainsi qu'à la bradykinésie. Le rehaussement du niveau de dopamine dans le striatum améliore les symptômes parkinsoniens, tel que démontré lors du classique traitement pharmacologique par la L-DOPA. Plusieurs études ont observé l'existence de neurones immunoréactifs pour la tyrosine hydroxylase (TH-ir) dans un striatum privé en dopamine chez des animaux modèles ainsi que chez des patients parkinsoniens. La TH est une enzyme déterminante de la voie de synthèse de la dopamine. Il est maintenant accepté dans la littérature scientifique que ces neurones TH-ir sont biologiquement fonctionnels mais il reste beaucoup à découvrir en ce qui a trait aux mécanismes menant à leur apparition. Le cœur du projet de maîtrise présenté dans ce mémoire est d'investiguer l'effet de l'inhibition des protéines calpaines sur l'apparition des neurones TH-ir dans le striatum de rats hé miparkinsoniens lésés à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) et traités avec la L-DOPA. La technique de double immunofluorescence a été utilisée afin de caractériser l'origine des neurones TH-ir en marquant spécifiquement à la fois TH ainsi que la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), le marqueur nucléaire neuronal (NeuN), la protéine cytosolique calbindine (CB), l'enzyme choline acétyltransférase (ChAT) ou la protéine de cytosquelette doublecortine (DCX). Chez les rats hé miparkinsoniens traités à la L-DOPA, l'ensemble des cellules TH-ir exprime le marqueur NeuN, ce qui démontre leur phénotype neuronal. De plus, la majorité d'entre elles expriment également la CB, un marqueur des neurones de projection du striatum. L'ajout d'une infusion locale et chronique de MDL28170, un inhibiteur des calpaines, augmente fortement la présence des neurones TH-ir au sein du striatum et leur caractérisation révèle que 70% d'entre eux expriment le marqueur neuronal NeuN alors que 38% sont positifs pour DCX, un marqueur de précurseurs neuronaux en migration. Ces travaux démontrent que l'inhibition des calpaines peut stimuler l'apparition de neurones TH-ir et qu'ils pourraient en partie résulter de la migration de précurseurs neuronaux vers le striatum. La promotion de ce type cellulaire visant à compenser la chute de la dopamine au niveau du striatum pourrait s'avérer être une stratégie ingénieuse dans une nouvelle approche de traitement pour la maladie de Parkinson.

Mots-clés: Maladie de Parkinson, Striatum, Calpaines, Neurogénèse, MDL28170, L-DOPA, Tyrosine hydroxylase, 6-hydroxydopamine

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	III
RÉSUMÉ.....	IV
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS	X
CHAPITRE I	1
INTRODUCTION.....	1
1.1 Le système dopaminergique	1
1.1.1 Neurophysiologie de la dopamine	1
1.1.2 Métabolisme dopaminergique.....	2
1.1.3 Récepteurs et voies de signalisation dopaminergiques.....	4
1.2 La dopamine et le contrôle des mouvements volontaires.....	5
1.2.1 Neuroanatomie des ganglions de la base	5
1.2.2 Histologie fonctionnelle du striatum.....	7
1.2.3 Organisation fonctionnelle des ganglions de la base	7
1.3 La maladie de Parkinson.....	9
1.3.1 Un bref historique	9
1.3.2 Épidémiologie.....	10
1.3.3 Signes cliniques	10
1.3.4 Aspects neuropathologiques	12
1.3.5 Pathogénèse	13
1.3.6 Approches thérapeutiques.....	15
1.4 Nouvelle approche thérapeutique: la neurorégénération	17
1.4.1 Des neurones dopaminergiques au sein du striatum.....	19
1.4.2 Les calpaïnes: une cible potentielle pour la neurorégénération	21
CHAPITRE II	24
HYPOTHÈSES DE RECHERCHE	24
CHAPITRE III.....	27

MÉTHODOLOGIE ET APPROCHE SCIENTIFIQUE	27
3.1 Procédures expérimentales <i>in vivo</i>	27
3.1.1 Animaux.....	27
3.1.2 Design expérimental	27
3.1.3 Injections intracérébrales de 6-OHDA	28
3.1.4 Évaluation comportementale de la lésion dopaminergique	29
3.1.5 Inhibition intrastriatale des calpaïnes	30
3.1.6 Traitement chronique à la L-DOPA	31
3.1.7 Sacrifice des animaux	31
3.2 Analyses histologiques	32
3.2.1 Immunofluorescence.....	32
3.2.2 Stéréologie	34
3.2.3 Analyses statistiques	37
CHAPITRE IV	38
RÉSULTATS.....	38
4.1 Validation de la lésion dopaminergique	38
4.2 L'inhibition intrastriatale des calpaïnes augmente le nombre de neurones TH-ir du striatum chez les rats lésés à la 6-OHDA et traités à la L-DOPA	42
4.3 Caractérisation du phénotype des neurones TH-ir du striatum	44
CHAPITRE V.....	48
DISCUSSION	48
5.1 Validation du modèle de rat hémiparkinsonien	48
5.2 Les neurones TH-ir dans le striatum du rat lésé à la 6-OHDA et traité à la L-DOPA	50
5.3 L'inhibition des calpaïnes favorise la formation de neurones TH-ir dans le striatum chez le rat hémiparkinsonien traité à la L-DOPA	53
5.4 Conclusion et perspectives d'avenir	58
ANNEXE A	61
MÉTHODOLOGIE COMPLÉMENTAIRE.....	61
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	64

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
Figure 1.1 Les systèmes dopaminergiques centraux.....	2
Figure 1.2 Représentation schématique du métabolisme de la dopamine dans les neurones dopaminergiques du SNC.....	3
Figure 1.3 Voies de signalisations sous-jacentes aux récepteurs dopaminergiques des familles D1- <i>like</i> et D2- <i>like</i>	4
Figure 1.4 Schéma d'un plan coronal du cerveau montrant les principales composantes anatomiques des ganglions de la base.....	6
Figure 1.5 Schématisation de la boucle motrice des ganglions de la base chez A, le sujet sain et de son fonctionnement altéré en B, dans la maladie de Parkinson.....	9
Figure 1.6 Signes cliniques menant au diagnostic de la MP.....	11
Figure 1.7 Plan coronal d'une section de cerveau comprenant la substance noire <i>pars compacta</i>	13
Figure 3.1 Représentation schématique du design expérimental chez le rat.	28
Figure 3.2 Exemple de test du cylindre.	29
Figure 3.3 Exemple de chirurgie stéréotaxique chez le rat.....	30
Figure 4.1 Validation comportementale de la lésion dopaminergique induite par la 6-OHDA.	39
Figure 4.2 Validation histologique de la lésion dopaminergique.	41
Figure 4.3 L'inhibition intrastriatale des calpaïnes combinée au traitement à la L-DOPA augmente le marquage de TH par immunofluorescence dans le striatum de rats lésés à la 6-OHDA.	43

Figure 4.4	Caractérisation par immunofluorescence des neurones TH-ir du striatum des rats lésés à la 6-OHDA et traités avec la L-DOPA et le MDL28170.	46
Figure 5.1	Mesure de l'intensité de la mort cellulaire induite par le MPTP.....	59
Figure 5.2	Décompte des neurones TH-ir du striatum chez la souris MPTP. ...	60

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
Tableau 3.1 Anticorps primaires utilisés pour la technique d'immunofluorescence	34
Tableau 4.1 Phénotype moléculaire des neurones TH-ir du striatum chez les rats lésés à la 6-OHDA et traités avec la L-DOPA seule ou combinée au MDL28170	45

LISTE DES ABRÉVIATIONS

6-OHDA	6-hydroxydopamine
AC	adénylate cyclase
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ANOVA	analyse de la variance
AP	antéropostérieur
ATP	adénosine triphosphate
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BHE	barrière hémato-encéphalique
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
CB	calbindine
ChAT	choline acetyl-transférase
COMT	catéchol-O-méthyltransférase
CREB	protéine de liaison à l'élément de réponse de l'AMPc
DARPP-32	<i>dopamine and AMPc regulated phosphoprotein of 32 kDa</i>
DAT	transporteur de la dopamine
DCX	doublecortine
DV	dorso-ventral
GABA	acide γ -aminobutyrique
GAD67	<i>glutamic acid decarboxylase 67</i>
GDNF	<i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GFAP	protéine acide fibrillaire gliale

GPe	globus pallidus externe
GPi	globus pallidus interne
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphénylalanine
MAO	monoamine oxydase
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MFB	faisceau médian du télencéphale (de l'anglais <i>medial forebrain bundle</i>)
ML	médial-latéral
MP	maladie de Parkinson
MPP+	1-méthyl-4-phénylpyridinium
MPPP	1-méthyl-4-phényl-4-propionoxypiperidine
MPTP	1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
NeuN	<i>neuronal nuclei</i>
NGS	<i>normal goat serum</i>
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NSC	cellule souche neuronale
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PKA	protéine kinase A
PLC	phospholipase C
PINK1	<i>PTEN-induced putative kinase 1</i>
S.E.M.	erreur standard de la moyenne
SNc	substance noire <i>pars compacta</i>
SNC	système nerveux central
SNr	substance noire <i>pars reticulata</i>

STN	noyau sous-thalamique
SVZ	zone subventriculaire
TH	tyrosine hydroxylase
TH-ir	immunoréactif pour la tyrosine hydroxylase
VMAT	transporteur vésiculaire des monoamines
VTA	aire tegmentale ventrale

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le système dopaminergique

1.1.1 Neurophysiologie de la dopamine

La dopamine est un neurotransmetteur de faible poids moléculaire appartenant à la classe des catécholamines. On la regroupe également parmi les monoamines avec la sérotonine et la noradrénaline. Au niveau du système nerveux central (SNC), ce messager chimique joue le rôle de neuromédiateur dans plusieurs circuits neuronaux. La dopamine cérébrale est issue en majorité des neurones de la substance noire *pars compacta* (SNC), de l'aire tegmentale ventrale (VTA) et du noyau arqué de l'hypothalamus. Ces neurones projettent vers plusieurs structures du cerveau, constituant ainsi les trois principaux systèmes dopaminergiques centraux: la voie nigro-striatale ou nigrostriée (entre la SNC et le striatum), impliquée dans la motricité automatique, la voie mésocorticolimbique (entre le VTA et le noyau accumbens, les tubercules olfactifs, l'amygdale, l'hippocampe et des régions corticales), impliquée dans les émotions, la mémoire, le plaisir, la motivation et différentes autres fonctions cognitives ainsi que la voie tubéro-infundibulaire (entre l'hypothalamus et l'éminence médiane), où la dopamine joue un rôle neuroendocrinien en régulant la libération de la prolactine (Landry et Gies, 2003) (Figure 1.1). Dans le SNC, la dopamine est également le précurseur de la noradrénaline dans les neurones noradrénergiques et adrénnergiques.

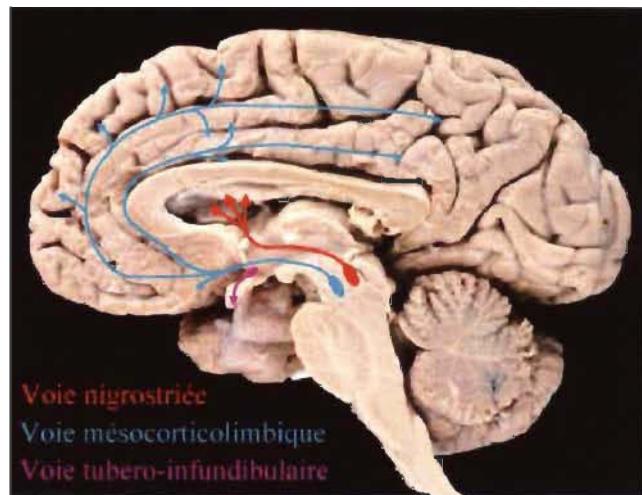


Figure 1.1 Les systèmes dopaminergiques centraux.

Au niveau du système nerveux périphérique, la dopamine est le précurseur de la noradrénaline dans les neurones postganglionnaires du système sympathique de même que dans les cellules chromaffines de la médullosurrénale. La dopamine sous forme sulfoconjuguée exerce des fonctions paracrines à titre de neurohormone. Elle est présente en concentration significative dans la circulation sanguine et exerce son effet sur plusieurs récepteurs catécholaminergiques ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$ et $D1$) situés sur de nombreux tissus périphériques.

1.1.2 Métabolisme dopaminergique

La biosynthèse de la dopamine est faite à partir de l'acide aminé tyrosine. L'enzyme tyrosine hydroxylase (TH) catalyse la transformation de la tyrosine en L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA), laquelle est ensuite transformée en dopamine par la DOPA-décarboxylase. Dans le SNC, ces réactions biochimiques ont lieu dans le cytoplasme des neurones dopaminergiques. Il est à noter que l'hydroxylation de la tyrosine par la TH est l'étape limitante du taux de synthèse de la dopamine. C'est la disponibilité et l'activité de cette enzyme, régulée par son état de phosphorylation, qui détermine les quantités de dopamine produites, indépendamment de la quantité de tyrosine disponible ou ingérée. Une fois synthétisée, la dopamine est stockée à l'intérieur des neurones dans des vésicules synaptiques par l'intermédiaire des

transporteurs vésiculaires des monoamines VMAT-1 et -2. Dans une synapse dopaminergique, la libération du neurotransmetteur a lieu par exocytose calcium-dépendante. Suite à la transduction du signal, il se produit un phénomène de recapture de la dopamine par son transporteur sélectif (DAT) situé sur le neurone présynaptique. C'est ainsi que 80% de la dopamine présente dans la fente synaptique est inactivée. Le catabolisme de la dopamine est réalisé par deux enzymes : la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) présente dans le cytoplasme du neurone postsynaptique ou dans la fente synaptique elle-même et la monoamine oxydase (MAO) de type A mais surtout de type B, laquelle est localisée sur la membrane externe mitochondriale du neurone présynaptique (Figure 1.2).

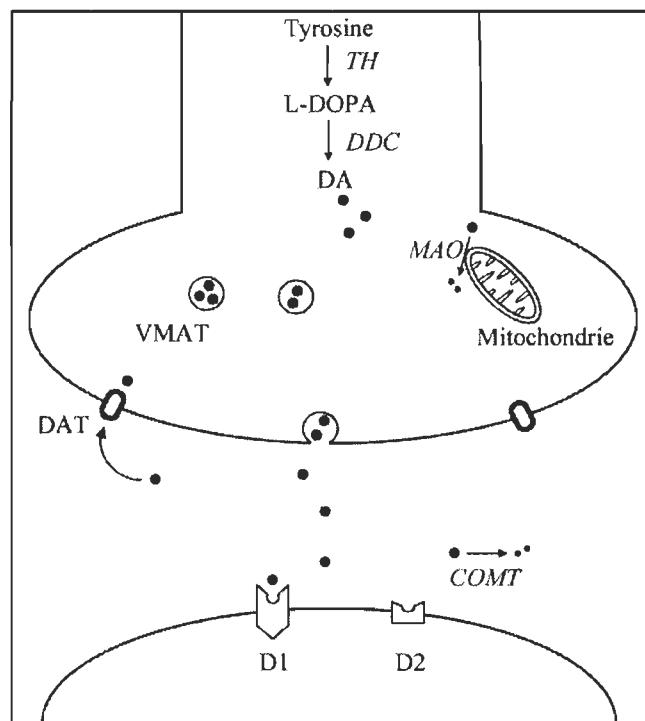


Figure 1.2 Représentation schématique du métabolisme de la dopamine dans les neurones dopaminergiques du SNC.

1.1.3 Récepteurs et voies de signalisation dopaminergiques

La dopamine est le ligand endogène de cinq types de récepteurs métabotropiques, qui, comme leur nom l'indique, sont constitués de protéines de structure hélicoïdale à sept passages transmembranaires couplées à une protéine G hétérotrimérique. Elle est considérée comme un neuromodulateur à médiation lente puisque le processus de transduction du signal menant à l'obtention d'une réponse physiologique prend quelques secondes. Les cinq types de récepteurs dopaminergiques se répartissent en deux familles selon leurs caractéristiques structurales et pharmacologiques: les récepteurs *D1-like* (D1 et D5) et les récepteurs *D2-like* (D2, D3 et D4) (Figure 1.3).

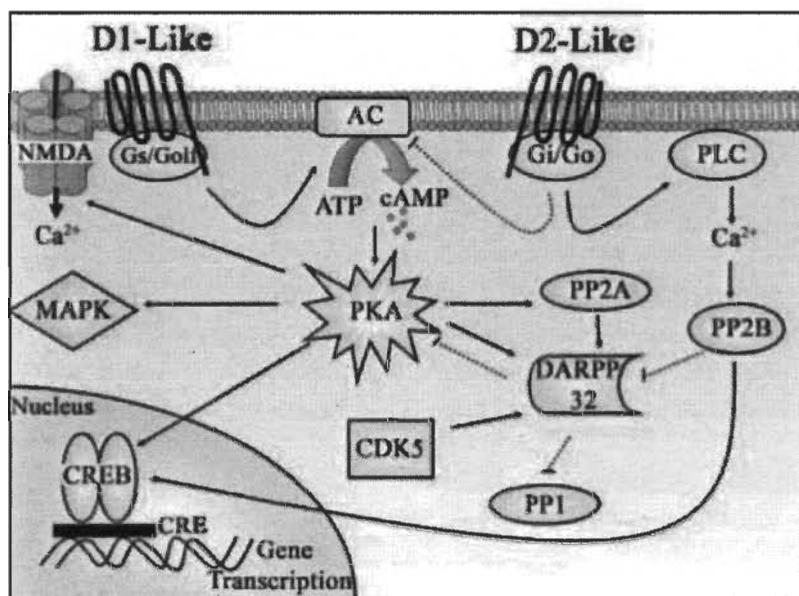


Figure 1.3 Voies de signalisations sous-jacentes aux récepteurs dopaminergiques des familles *D1-like* et *D2-like*.
(tiré de Lebel *et al.*, 2007)

Les récepteurs *D1-like* sont couplés à une protéine Gs (stimulatrice) et leur stimulation induit la formation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) par activation de l'adénylate cyclase (AC). L'augmentation intracellulaire d'AMPc active la protéine kinase A (PKA). Parmi les substrats de PKA, il y a la protéine de liaison à l'élément de réponse de l'AMPc (CREB), qui permet la transcription de gènes cibles,

des canaux ioniques tels le récepteur du N-méthyl-D-aspartate (NMDA) qui augmente la concentration intracellulaire de Ca^{2+} favorable à l'exocytose de la dopamine, les *mitogen activated protein kinase* (MAPK), la protéine phosphatase A2 de même que la *dopamine and cAMP regulated phosphoprotein of 32 KDa* (DARPP-32) qui sont impliqués dans diverses cascades de signalisation cellulaire. Au niveau central, cette famille de récepteurs se situent dans le striatum, le noyau accumbens, les tubercules olfactifs et la *pars reticulata* de la substance noire (SNr).

Les récepteurs de la famille *D2-like* sont quant à eux couplés à une protéine Gi/o (inhibitrice) et leurs voies de signalisation associées sont plus diversifiées que celles de la famille *D1-like*. La stimulation de ces récepteurs diminue l'activité de l'AC et par le fait même diminue le taux d'AMPc, ce qui rend PKA inactive. Elle active aussi la phospholipase C (PLC) responsable de l'activation de la calcineurine. Cette protéine mobilise le calcium cytoplasmique, rendant l'exocytose plus difficile et donc diminuant la neurotransmission. Au niveau postsynaptique, la réponse se traduit par une hyperpolarisation des neurones et une diminution de leur potentiel d'action. Au niveau présynaptique, les récepteurs de cette famille sont présents sur les terminaisons dopaminergiques et jouent un rôle d'autorécepteur, entraînant un rétrocontrôle négatif sur libération de la dopamine. Au niveau central, les récepteurs *D2-like* se situent approximativement dans les mêmes régions anatomiques que ceux de la famille *D1-like* (Landry et Gies, 2003, Lebel *et al.*, 2007, Lebel et Cyr, 2011).

1.2 La dopamine et le contrôle des mouvements volontaires

1.2.1 Neuroanatomie des ganglions de la base

La production d'un mouvement volontaire harmonieux dépend de l'activation ordonnée dans l'espace et le temps de plusieurs contractions musculaires, lesquelles sont finement régies par un ensemble de structures du système nerveux central. L'initiation du mouvement débute au niveau des subdivisions du cortex moteur. Ensuite, l'information subit une modulation via un relais dans les circuits pré moteurs. Cette

intégration se fait au niveau des ganglions de la base et du cervelet afin d'assurer la coordination et l'élaboration d'un signal qui sera acheminé à la moelle épinière vers les tissus musculaires pour permettre l'exécution du mouvement. Les ganglions de la base, aussi appelés noyaux gris centraux, sont un ensemble de noyaux de substance grise sous-corticale, constitué du striatum, du pallidum, de la substance noire aussi appelée *substantia nigra* ou *locus niger* de même que du noyau sous-thalamique (STN). De ces structures, on distingue plusieurs sous-noyaux: le striatum est alors formé du noyau caudé, du putamen et du noyau accumbens, le pallidum est constitué du globus pallidus interne (GPi), du globus pallidus externe (GPe) et d'un segment ventral et on distingue la *pars compacta* et la *pars reticulata* de la substance noire (Groenewegen, 2003, Kolb et Whishaw, 2008) (Figure 1.4).

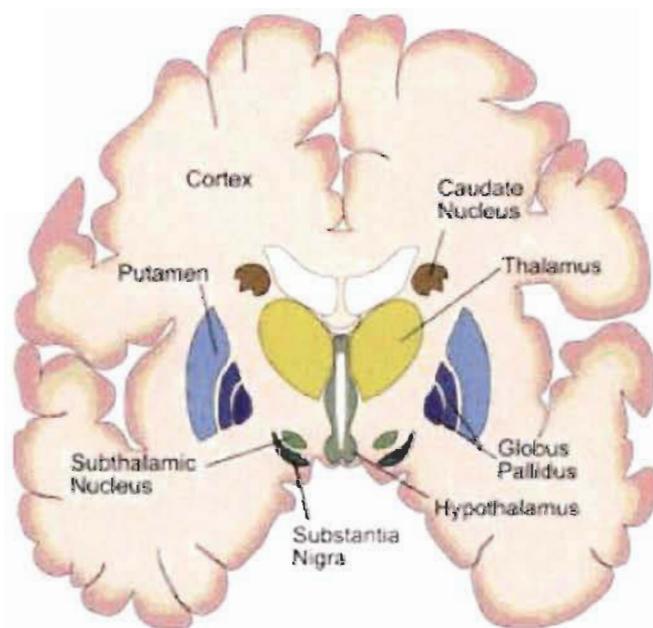


Figure 1.4 Schéma d'un plan coronal du cerveau montrant les principales composantes anatomiques des ganglions de la base.

De nos jours, on sait que les ganglions de la base sont organisés en circuits moteurs, oculomoteurs, cognitifs et limbiques et qu'ils ont un impact non seulement sur l'exécution des mouvements volontaires, mais aussi sur l'aspect émotionnel et cognitif des comportements moteurs (Smith *et al.*, 1998, Middleton et Strick, 2000).

1.2.2 Histologie fonctionnelle du striatum

Le striatum, noyau majeur des ganglions de la base, est un carrefour où transite l'information entre plusieurs structures cérébrales et il est constitué d'un réseau de plusieurs types de neurones interconnectés. Selon leur cible axonale, on y distingue tout d'abord les neurones de projection et les interneurones. Les neurones de projection sont de taille moyenne et possèdent une multitude d'épines dendritiques, c'est pourquoi on les appelle en anglais *medium spiny neurons*. Ils constituent plus de 90% de la population neuronale du striatum (DiFiglia *et al.*, 1976, Chang *et al.*, 1982). Ils utilisent l'acide γ -aminobutyrique (GABA) comme neurotransmetteur principal et expriment la protéine de liaison au calcium calbindine (CB). Ils sont également subdivisés en deux populations: les neurones de la voie de projection directe, exprimant la substance P et la dynorphine de même que le récepteur D1 ainsi que les neurones de la voie de projection indirecte, exprimant l'enképhaline de même que le récepteur D2. Les interneurones du striatum sont d'une part cholinergiques et d'autre part GABAergiques. Les interneurones cholinergiques sont de grande taille et peuvent être reconnus par l'expression de l'enzyme choline acétyltransférase (ChAT), laquelle est nécessaire à la synthèse de l'acétylcholine. Les interneurones GABAergiques peuvent également être classés en trois groupes selon les neuropeptides et les protéines de liaison au calcium qu'ils expriment: a) parvalbumine, b) somatostatine, neuropeptide Y et oxyde nitrique synthase et c) calrétinine (Kawaguchi *et al.*, 1995).

1.2.3 Organisation fonctionnelle des ganglions de la base

Le striatum constitue la porte d'entrée des circuits moteurs des ganglions de la base en recevant les nombreuses afférences du cortex pré moteur et des cortex moteurs dans sa région dorsolatérale de même que des afférences du thalamus, de l'hippocampe et de l'amygdale, lesquelles sont toutes excitatrices puisqu'elles utilisent le glutamate comme neurotransmetteur. Le transfert des informations thalamiques et corticales vers le striatum est modulé par des afférences dopaminergiques et sérotoninergiques en provenance respectivement de la SNC et des noyaux du raphé. La dopamine assure

l'intégration de la séquence complexe d'évènements neuronaux afin d'assurer la fluidité des informations corticales à travers les ganglions de la base (Lewis et Barker). À partir du striatum émergent deux voies de projections distinctes, qu'on nomme la voie de projection directe et la voie de projection indirecte, qui assurent le transit de l'information vers le GPi et la SNr. Elles transmettent alors l'information finale au thalamus, en créant ainsi une boucle striato-thalamo-corticale qui facilite l'exécution d'un mouvement (Alexander *et al.*, 1990). C'est au fin contrôle antagoniste mais complémentaire qu'exerce la dopamine sur ces deux voies de projection que l'on doit la finesse de l'exécution des mouvements.

La voie de projection directe, aussi nommée striatonigrale, établit une connexion inhibitrice directe entre le striatum et les neurones constituants le GPi et la SNr. Ils font à leur tour une synapse GABAergique avec le thalamus, qui retourne une efférence excitatrice en direction du striatum et du cortex. La voie de projection indirecte, aussi nommée striatopallidale, doit son nom au relais qu'elle établit avec le GPe et le STN avant de projeter au GPi et à la SNr. Du striatum, des projections inhibitrices innervent le GPe, lequel envoie également des projections inhibitrices au STN. De cet endroit, des efférences excitatrices vont faire synapse avec le GPi et la SNr qui inhibent ensuite le thalamus qui lui retourne des afférences glutamatergiques au striatum et au cortex (Parent et Hazrati, 1995, Cenci, 2007).

La stimulation dopaminergique que reçoit le striatum en provenance des neurones de la SNC est à l'origine d'une fine modulation de l'information nerveuse aboutissant à la production d'un mouvement. Dès lors, il s'avère évident qu'un dérèglement de la transmission dopaminergique entraîne des troubles de motricité. La dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la SNC brise l'équilibre entre les voies de projections directe et indirecte du striatum, menant à l'apparition des symptômes moteurs de la maladie de Parkinson (MP) (DeLong, 1990) (Figure 1.5).

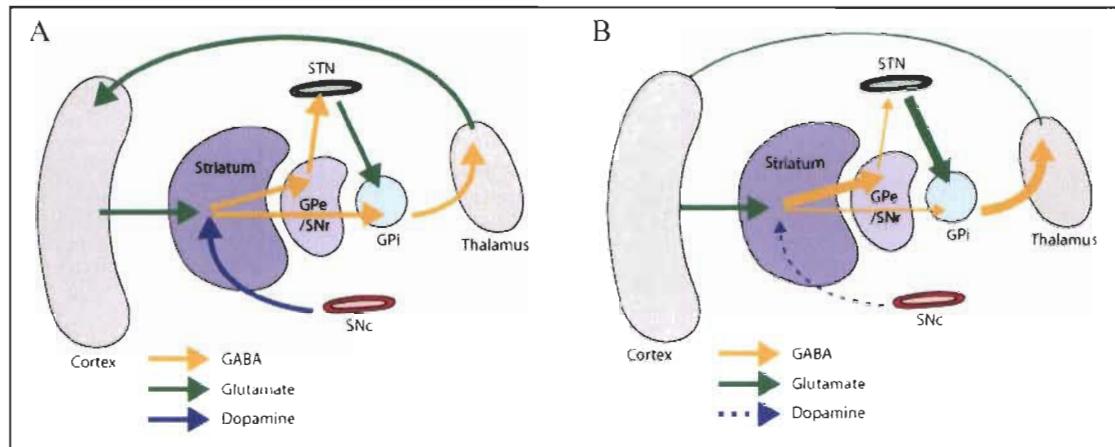


Figure 1.5 Schématisation de la boucle motrice des ganglions de la base chez A, le sujet sain et de son fonctionnement altéré en B, dans la maladie de Parkinson.

(adapté de Burch et Sheerin, 2005)

1.3 La maladie de Parkinson

1.3.1 Un bref historique

La MP est une maladie neurodégénérative progressive caractérisée principalement par une triade de symptômes moteurs due à la mort des neurones produisant la dopamine de la voie nigrostriée. Elle a été décrite pour la première fois par le médecin anglais James Parkinson dans son ouvrage intitulé «*Essay on the Shaking Palsy*» paru en 1817. Il fut le premier à décrire les symptômes de la «paralysie agitante» en étudiant le cas de six patients affligés de cette affection neurologique (Burch et Sheerin, 2005). En 1872, Jean-Martin Charcot poursuivit les travaux de recherche afin de dresser le portrait clinique des malades et nomma alors ce syndrome du nom de maladie de Parkinson. Près d'un siècle plus tard, les travaux d'Arvid Carlsson ont décrit l'implication de la neurotransmission dopaminergique dans la maladie. À la même époque, Ehringer et Hornykiewicz ont rapporté le déficit marqué en dopamine dans les cerveaux des patients atteints de la MP. De nos jours, le tableau des signes cliniques de la maladie à partir duquel on pose le diagnostic est bien connu, il en est de même pour les caractéristiques

anatomiques et biochimiques qu'on identifie lors de l'analyse *post-mortem* des cerveaux mais l'étiologie exacte de la maladie demeure à préciser.

1.3.2 Épidémiologie

Cette maladie neurodégénérative progressive est la deuxième en importance après la maladie d'Alzheimer et elle touche surtout les personnes d'âge avancé, soit environ 2% des gens de plus de 60 ans. Près de 100 000 Canadiens sont atteints de la maladie, dont environ 25 000 cas au Québec et le nombre de nouveaux cas diagnostiqués chaque année au Canada est de 10 à 20 par 100 000 habitants (Société Parkinson Canada.). Selon les données de l'Organisation des Nations Unies, on estime que quatre millions de personnes dans le monde souffrent de la maladie et qu'avec le vieillissement de la population, ce chiffre pourrait avoir doublé en 2040. Les hommes sont 1,5 fois plus souvent touchés par la maladie que les femmes, ces dernières bénéficiant des effets neuroprotecteurs des œstrogènes (Wooten *et al.*, 2004). Le traitement et la prise en charge des patients atteints de la MP représentent donc un lourd fardeau, tant au niveau social qu'au niveau économique.

1.3.3 Signes cliniques

La MP se caractérise en majeure partie par la dégénérescence des neurones produisant la dopamine dans la SNC et de leur projection vers le striatum. D'autres structures cérébrales peuvent être atteintes telles que le locus coeruleus, le noyau basal de Meynert et même l'hypothalamus (Nicolesco, 1925, Agid et Blin, 1987). La MP n'afflige pas tous les patients de la même façon, l'évolution de la maladie étant toujours différente, mais généralement, on observe une triade caractéristique de symptômes que sont la rigidité musculaire, les tremblements au repos et la bradykinésie, à laquelle s'ajoutent des troubles posturaux et de l'équilibre (Figure 1.6). Ces symptômes apparaissent lorsque la perte neuronale dans la SNC atteint 50% et que la dopamine striatale est diminuée de 80% (Kish *et al.*, 1988, Scherman *et al.*, 1989, Fearnley et Lees, 1990, Hornykiewicz, Ahlskog et Muenter, 2001). À mesure que la perte neuronale gagne

en importance, ces symptômes s'aggravent tandis que d'autres signes cliniques comme une posture voûtée, des douleurs musculaires et un état dépressif peuvent apparaître, en plus des effets secondaires des traitements pharmaceutiques. C'est à partir de l'observation de la triade de symptômes parkinsoniens qu'on diagnostique la maladie et qu'on peut établir le traitement approprié.

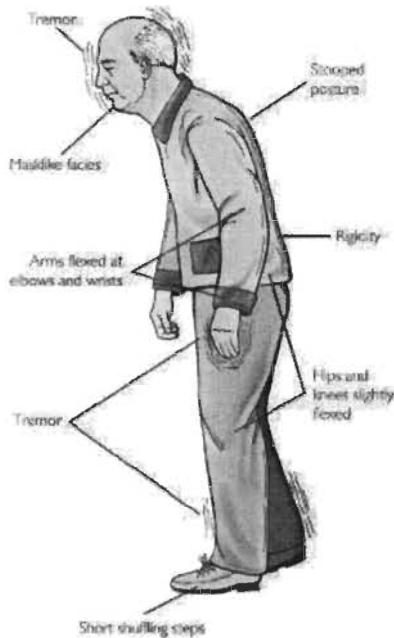


Figure 1.6 Signes cliniques menant au diagnostic de la MP.

Les tremblements au repos s'observent surtout au niveau des bras, des mains et de la tête, ce qui en fait un symptôme peu discret et gênant pour les patients. Ce symptôme est d'ailleurs le plus facilement identifiable. Les tremblements parkinsoniens apparaissent ou s'aggravent lorsque le patient est au repos ou qu'il subit un stress émotionnel et disparaissent généralement lorsqu'il entreprend un mouvement (Pollak, 2004). La rigidité musculaire, aussi appelée hypertonie, empêche la fluidité des mouvements et mène à la disparition des expressions faciales. Elle est également responsable de la raideur du tronc et des membres engendrant la posture voûtée caractéristique des parkinsoniens. L'akinésie et la bradykinésie sont une lenteur dans l'amorce et l'exécution d'un mouvement, parfois même l'interruption d'un mouvement, rendant les tâches quotidiennes très difficiles. La bradykinésie est le symptôme qui

corrèle davantage avec le déficit dopaminergique (Vingerhoets *et al.*, 1997). Cette lenteur du mouvement amène souvent le parkinsonien à adopter une démarche en petits pas afin de retrouver son centre d'équilibre. La maladie de Parkinson ne réduit pas l'espérance de vie, dans la plupart des cas, mais l'évolution des symptômes se fait plus rapidement lorsque l'âge avance, augmentant le risque de chutes dues au manque d'équilibre ou de pneumonies causées par des troubles de déglutition (Société Parkinson Canada.).

1.3.4 Aspects neuropathologiques

Bien que le diagnostic de la MP repose sur l'observation de manifestations cliniques bien caractérisées, la confirmation de la maladie ne peut s'effectuer qu'à l'autopsie. Plusieurs aspects neuropathologiques sont typiques des cerveaux parkinsoniens. D'une part, on retrouve des inclusions cytoplasmiques éosinophiles d'un diamètre d'environ 15 μm appelées corps de Lewy dans les neurones survivants de la SNC ainsi que dans toutes les autres régions cérébrales en dégénérescence. Les corps de Lewy sont constitués d'agrégats de protéines et de neurofilaments et il n'est pas clair si leur présence est une cause de la mort neuronale ou s'ils en sont une conséquence. Les corps de Lewy ne sont pas spécifiques à la MP, on les retrouve également dans la maladie d'Alzheimer de même que dans la démence à corps de Lewy mais leur présence dans la SNC est révélatrice de la MP (Walsh et Selkoe, 2004). D'autre part, on observe chez les parkinsoniens une perte de la pigmentation neuromélanique au niveau de la SNC (Figure 1.7). La neuromélanine est un pigment brun-noir issu de l'auto-oxydation de la dopamine et est retrouvé dans le péricaryon neuronal (Zecca *et al.*, 2001). Son accumulation dans les neurones de la SNC est simplement le reflet du vieillissement normal du cerveau.

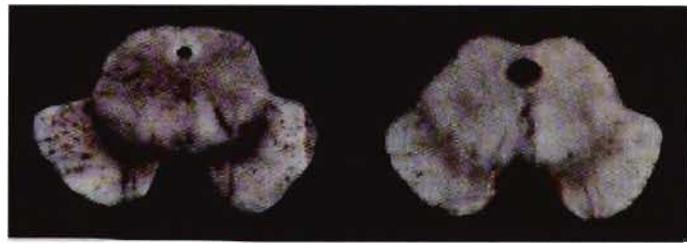


Figure 1.7 Plan coronal d'une section de cerveau comprenant la substance noire *pars compacta*.

Démonstration de la perte de pigmentation neuromélanique chez un patient parkinsonien (à droite) en comparaison avec un individu non-parkinsonien (à gauche).

1.3.5 Pathogénèse

Parmi les bases moléculaires et cellulaires caractérisant les maladies neurodégénératives, on considère généralement l'accumulation de protéines aberrantes ou de forme anormale, la formation de neurofibrilles, des désordres du système ubiquitine-protéasome, le phénomène d'excitotoxicité induite par le glutamate, le stress oxydatif, des dysfonctions mitochondrielles, l'homéostasie d'un métal perturbée de même que l'altération du transport axonal et dendritique menant à la perte des synapses efficaces. Dans le contexte de la MP, la mort massive et sélective des neurones dopaminergiques de la SNC est le résultat d'une interaction entre des facteurs génétiques et environnementaux, suggérant une étiologie multifactorielle (Bossy-Wetzel *et al.*, 2004, Olanow *et al.*, 2009). La majorité des cas de MP sont sporadiques et qualifiés d'idiopathiques tandis que 5 à 10% des cas sont reliés à des mutations génétiques.

Les cas de MP héréditaire sont associés à des mutations sur les gènes de l' α -synucléine (PARK1), parkine (PARK2), DJ-1 (PARK7) et PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1 ou PARK6). L' α -synucléine mutée a la propriété de se polymériser et on la retrouve en grand nombre dans les corps de Lewy de même que dans les neurites des neurones dopaminergiques. La parkine est une E3-ubiquitine ligase impliquée dans le système du protéasome, un complexe enzymatique débarrassant la cellule de ses protéines obsolètes, et sa mutation renforce l'accumulation de protéines nuisibles telles que l' α -synucléine (Cookson, 2003). La protéine DJ-1 est impliquée dans plusieurs

processus cellulaires et une perte de son activité sensibilise les cellules au stress oxydatif. (Bossy-Wetzel *et al.*, 2004). Quant à PINK1, c'est une protéine mitochondriale dont la mutation entraîne une perte du potentiel de membrane de même qu'une sensibilité accrue au stress oxydatif.

L'hypothèse environnementale de la MP est relative à l'exposition à des neurotoxines dopaminergiques. En 1983, Langston a décrit la façon dont le 1-méthyl-4-phényl-tétrahydropyridine (MPTP), un contaminant dans la synthèse de l'héroïne dépourvu de fonction opioïdes, peut engendrer de façon permanente les symptômes moteurs de la MP. La roténone et le paraquat, respectivement un insecticide et un herbicide, sont de structure similaire au métabolite actif du MPTP, le 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP+), et induisent également le syndrome parkinsonien (Tanner, 1992). Le MPP+ induit la mort neuronale en inhibant le complexe I de la chaîne de transport des électrons mitochondriale, empêchant ainsi la production d'adénosine triphosphate (ATP) (Nicklas *et al.*, 1992).

La consommation d'oxygène au cours de la respiration cellulaire induit la formation de puissants oxydants que sont le peroxyde d'hydrogène et les radicaux superoxydes. Ils sont normalement neutralisés par des enzymes spécialisées dans la défense antioxydante comme le glutathion, laquelle se trouve à un niveau déficient dans la MP (Sian *et al.*, 1994). Les espèces réactives de l'oxygène causent du dommage cellulaire en s'attaquant aux lipides, à l'ADN de même qu'aux protéines, accentuant la demande au système ubiquitine-protéasome. L'inhibition du complexe I mitochondrial accroît la formation de ces substances oxydantes et plusieurs marqueurs biochimiques de dommage oxydatif sont identifiés dans la SNC de patients parkinsoniens (Przedborski *et al.*, 2000).

Une hypothèse récente suggère qu'un stress cellulaire initié par le calcium serait à l'origine de la neurodégénérescence dans la MP (Chan *et al.*, 2009, Surmeier *et al.*, 2010). En effet, une élévation du taux de calcium intracellulaire, conséquente à l'activité autonome des neurones dopaminergiques de la SNC, causerait une hyperactivité

métabolique et compromettrait la protéostasie de même que l'efficacité des défenses antioxydantes, accentuant la vulnérabilité de ces neurones. Une altération dans la régulation du calcium est souvent associée à des phénomènes du vieillissement (Nixon, 2003). Il a été démontré que l'activation des calpaïnes, une famille de cystéines-protéases dont l'activité est régulée par le calcium, a une implication dans la mort des neurones dopaminergiques de la SNC, lesquels surexpriment l'isoforme m-calpaïne dans le contexte de la MP (Mouatt-Prigent *et al.*, 1996). Le fait que l'inhibition des calpaïnes prévienne les déficits moteurs associés à l'intoxication au MPTP dans un modèle de souris soutient cette hypothèse (Crocker *et al.*, 2003).

1.3.6 Approches thérapeutiques

Étant donné que les connaissances actuelles sur les mécanismes physiopathologiques de la MP sont incomplètes, aucune thérapie n'est en mesure de stopper et guérir la maladie. Les traitements actuels visent à normaliser la transmission dopaminergique au niveau du striatum afin de contrôler et diminuer les nombreux symptômes moteurs.

À ce jour, le meilleur traitement antiparkinsonien est la L-DOPA, précurseur naturel de la dopamine. Elle est prise en charge par les neurones intacts de la SNC, métabolisée en dopamine, et relâchée physiologiquement pour activer les récepteurs dopaminergiques du striatum, ce qui en fait un agoniste indirect de la dopamine. Contrairement à la dopamine, la L-DOPA traverse la barrière hémato-encéphalique (BHE) par des mécanismes de transport actif. Étant donné l'important métabolisme de la L-DOPA par la DOPA-décarboxylase intestinale et à un moindre degré par la MAO et la COMT périphériques, seulement 1% d'une dose orale de L-DOPA peut atteindre le cerveau pour y produire les effets thérapeutiques recherchés. Afin d'augmenter considérablement sa biodisponibilité, elle est combinée à un inhibiteur de la DOPA-décarboxylase périphérique tels que la carbidopa et le benserazide (Page, 1999). Cela permet également de réduire la production de dopamine en périphérie et donc de limiter certains effets indésirables. De tous les traitements antiparkinsoniens, la L-DOPA s'avère

être la stratégie thérapeutique la plus efficace: elle provoque une amélioration marquée des fonctions motrices des patients en ayant un effet rapide sur la bradykinésie et la rigidité puis en réduisant progressivement les tremblements (Obeso *et al.*, 2004). De plus, elle est bien tolérée, surtout chez les personnes âgées (Nutt et Wooten, 2005), en plus d'être associée à une réduction de la mortalité due à la MP (Rajput, 2001). Dans les premières années du traitement, les mécanismes de stockage neuronaux suffisent à amortir la cinétique plasmatique de la L-DOPA et la réponse motrice est optimale. Cependant, le bénéfice de la L-DOPA diminue en suivant l'évolution de la maladie car les neurones dopaminergiques fonctionnels se raréfient. Ce phénomène se traduit par des difficultés dans la conversion, l'emmagasinage et la relâche de la dopamine entraînant des fluctuations motrices chez les patients. De plus, l'utilisation à long terme de la L-DOPA cause des modifications biochimiques durables dans le striatum en fonction de la dose et de la durée du traitement. Il se produit alors l'apparition de mouvements anormaux involontaires qu'on désigne par le terme dyskinésies. Il peut également se produire un phénomène d'akinésie en fin de dose ou de façon aléatoire qu'on appelle effet ON-OFF. Ces fluctuations de réponses à la L-DOPA deviennent alors plus difficiles à contrôler par une médication d'appoint et sont plutôt inévitables.

En plus de la DOPA-thérapie, plusieurs autres types de médicaments sont employés seuls ou en synergie avec la L-DOPA afin de rétablir l'équilibre dopaminergique au niveau du striatum. Les agonistes dopaminergiques tels que l'apomorphine et les dérivés de l'ergot miment l'action de la dopamine sur les récepteurs D1 et D2 du striatum. Comparativement à la L-DOPA, leur efficacité ne dépend pas de l'activité résiduelle des neurones dopaminergiques mais les effets négatifs à long terme sont comparables. Les inhibiteurs des enzymes responsables du catabolisme de la dopamine, soit la MAO et la COMT, ainsi que des inhibiteurs du transporteur de recapture de la dopamine augmentent la biodisponibilité de la dopamine cérébrale. Des molécules anticholinergiques à action centrale ciblant les récepteurs muscariniques sont également utilisées afin d'atténuer le déséquilibre entre la dopamine et l'acétylcholine dans le striatum, lequel est causé par la dénervation dopaminergique (Figure 1.7).

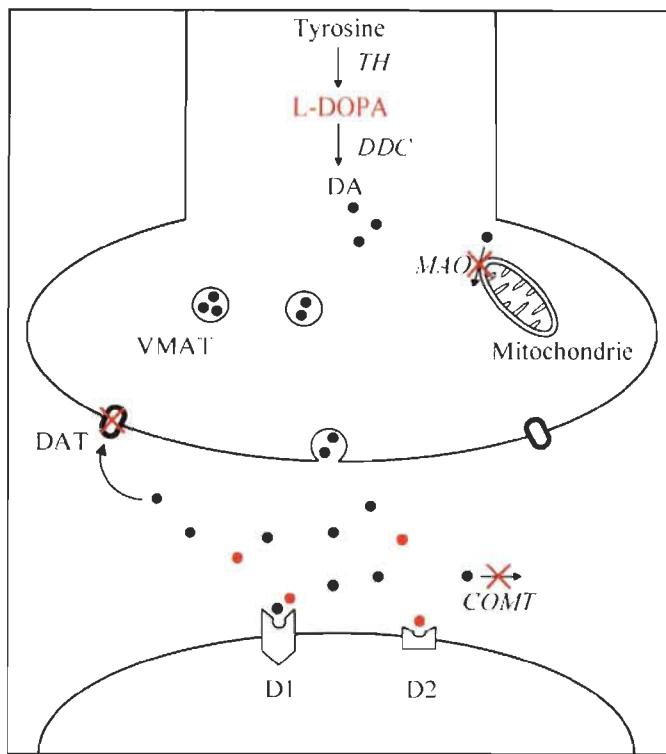


Figure 1.7 Sites d'action des traitements pharmacologiques utilisés pour augmenter la signalisation dopaminergique.

Ces agents pharmacologiques incluent la L-DOPA, les inhibiteurs de la MAO, les inhibiteurs de la COMT, les inhibiteurs de la recapture ainsi que les agonistes dopaminergiques.

Pour les patients dont la réponse aux traitements pharmacologiques est décevante, la stimulation cérébrale profonde (de l'anglais *Deep Brain Stimulation*) permet de diminuer l'intensité des symptômes parkinsoniens. La chirurgie consiste en l'insertion d'un pacemaker émettant des stimulations électriques au thalamus, au STN ou au GPI afin de rétablir la fonction de la boucle motrice des ganglions de la base. Bien qu'elle soit efficace, cette manipulation chirurgicale n'est pas sans risques de complications et d'effets secondaires majeurs au niveau des fonctions cognitives (Kluger *et al.*, 2009).

1.4 Nouvelle approche thérapeutique: la neurorégénération

Face à l'inefficacité des solutions thérapeutiques actuelles ou à l'atteinte de la limite de leur effet bénéfique, de nouvelles avenues de recherche ont vu le jour afin de

mieux comprendre les mécanismes de compensation mis en branle lors de la perte dopaminergique de la voie nigrostriée de même que pour trouver de nouvelles stratégies afin de rehausser les niveaux de dopamine dans le striatum. La neurorégénération est un concept relativement récent qui fait référence à la réparation d'un tissu nerveux en faisant appel à de nouvelles cellules neuronales, au développement des cellules gliales et à la synaptogénèse. Le terme neurorégénération inclue la neurogénèse, la plasticité neuronale ainsi que la neurorestoration. L'objectif commun de toutes ces nouvelles approches neurorégénératives est d'optimiser la production de dopamine par différents types cellulaires et de favoriser la neurotransmission dopaminergique dans le striatum.

Dans le contexte de la MP, la neurogénèse est la formation de nouveaux neurones dopaminergiques fonctionnels à partir des cellules souches du cerveau. On a longtemps pensé que les neurones étaient incapables de se renouveler mais on sait maintenant depuis quelques années que le cerveau adulte contient des zones qui le rendent capable de produire des nouveaux neurones. La plasticité synaptique, c'est la formation de nouvelles connexions neuronales afin d'améliorer la neurotransmission de la dopamine dans le striatum. Par exemple, la fondation Michael J. Fox subventionne la recherche sur l'administration intranasale de *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF), un facteur neurotrophique qui favorise la survie et la croissance des neurites des neurones dopaminergiques de la SNc conduisant ainsi à la formation de nouvelles synapses. Quant à la neurorestoration, elle constitue une nouvelle approche thérapeutique pour plusieurs maladies neurodégénératives (Enciu *et al.*, 2011). Pour ce qui est de la MP, ce nouveau concept implique la formation *in vitro* de neurones dopaminergiques à partir de différents types de cellules souches et leur implantation dans le cerveau. Cela nécessite que ces nouvelles cellules doivent survivre, maintenir leur état différencié et s'intégrer dans les réseaux neuronaux déjà existants afin de pallier la perte de constituants cellulaires et tout cela, sans créer de tumeurs. Les différents types de cellules souches partagent la propriété d'être capable de se multiplier à l'identique, en reproduisant d'autres cellules souches indifférenciées, ou encore de donner naissance à des cellules différenciées, c'est-à-dire spécialisées (nerveuses, musculaires, hématopoïétiques, etc.). Parmi les types de cellules souches, il existe des cellules souches embryonnaires, dites

pluripotentes, qui ont la propriété d'engendrer tous les types cellulaires. Pour des raisons éthiques, la recherche sur les cellules embryonnaires et la MP sont limitées. Il y a également les cellules souches tissulaires, qui sont présentes dans différents tissus et organes et qui peuvent s'auto-reproduire pour ne donner naissance qu'un à un éventail limité de cellules spécialisées. Quant aux cellules pluripotentes induites, ce sont des cellules issues de la recherche qui ont été programmées pour qu'à l'instar des cellules embryonnaires, elles puissent s'auto-reproduire et se transformer en cellules somatiques spécialisées. Elles ont un intérêt médical majeur, car elles sont prélevées sur le patient lui-même, ce qui limite le risque de réaction immunitaire et elles ne posent pas le problème éthique du prélèvement fœtal. Par contre, il demeure un important risque d'évolution cancéreuse si elles succombent au développement anarchique. La thérapie cellulaire représente une piste fort prometteuse dans le traitement de la MP mais de nombreuses questions restent à ce jour sans réponse. Par exemple, quel est le meilleur type de cellules souches à utiliser pour traiter la MP? Quelle est la durée de vie d'un greffon? Comment éviter que les nouvelles cellules subissent le même sort de neurodégénérescence que les neurones dopaminergiques? Néanmoins, chacune des options proposées par le concept de neurorégénération mérite d'être davantage étudiée car elle représente une façon de rétablir en partie la neurotransmission de la dopamine de la voie nigrostriée menant à une diminution de l'ampleur des symptômes de la MP.

1.4.1 Des neurones dopaminergiques au sein du striatum

L'expression de la TH, enzyme-clé de la synthèse de la dopamine, est un élément déterminant pour la régénération de ce neurotransmetteur dans le cerveau parkinsonien. Classiquement, on reconnaît que la vaste majorité des neurones dopaminergiques du SNC se retrouvent dans le VTA ainsi que dans la SNc. Il y a plus de trente ans, DiFiglia et ses collègues ont décrit pour la première fois l'existence d'une petite population de neurones exprimant la tyrosine hydroxylase (TH-ir) au sein-même du striatum de singes intoxiqués au MPTP, modèle d'étude bien connu de la MP. Dans les années qui ont suivi, ce phénomène a été étudié chez l'humain parkinsonien (Cossette *et al.*, 1999, Porritt *et al.*, 2000, Cossette *et al.*, 2005a), le primate MPTP (Dubach *et al.*, 1987,

Betarbet *et al.*, 1997, Tande *et al.*, 2006) de même que chez le rat et la souris lésés à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA), une toxine connue pour engendrer la mort des neurones dopaminergiques de la SNc (Tashiro *et al.*, 1989, Mura *et al.*, 1995, Meredith *et al.*, 1999, Lopez-Real *et al.*, 2003, Jollivet *et al.*, 2004, Darmopil *et al.*, 2008). Il a été démontré que les neurones TH-ir existent en très faible proportion dans le striatum de cerveaux sains (Tashiro *et al.*, 1989, Mao *et al.*, 2001, Lopez-Real *et al.*, 2003) et que la déplétion en dopamine en accentue le nombre. Ce phénomène semble prendre une ampleur d'autant plus marquée lors du traitement à la L-DOPA (Mura *et al.*, 1995, Betarbet *et al.*, 1997, Lopez-Real *et al.*, 2003, Jollivet *et al.*, 2004, Darmopil *et al.*).

La compilation des études sur la caractérisation du phénotype neurochimique des neurones TH-ir du striatum permet de relater quelques divergences selon le modèle d'étude. Chez l'humain et le primate, les neurones TH-ir du striatum sont des neurones de taille moyenne non-épineux et ils expriment le marqueur nucléaire neuronal (NeuN), le facteur de transcription *Nurr1*, connu pour maintenir le phénotype dopaminergique chez les neurones du mésencéphale (SNc et VTA) de même que le DAT, ce qui confirme qu'ils sont des neurones dopaminergiques fonctionnels. Aussi, ces neurones expriment l'enzyme *glutamic acid decarboxylase 67* (GAD67), impliquée dans la synthèse du GABA et normalement retrouvée dans les interneurones du striatum. À l'opposé, les neurones TH-ir rencontrés dans le striatum des rongeurs expriment CB, ont des épines dendritiques et n'expriment pas GAD67, laissant croire qu'ils s'apparentent plutôt aux neurones de projection.

La façon dont les neurones TH-ir s'intègrent dans le striatum suite à une lésion dopaminergique ainsi que le rôle qu'ils y jouent restent à établir. Selon certaines études, l'émergence de neurones TH-ir dans le striatum serait un phénomène compensatoire afin de rehausser le niveau de dopamine dans le circuit nigrostrié. Des hypothèses se démarquent lorsqu'il est question de l'origine de ces neurones. L'expression concomitante de TH et de marqueurs connus de neurones de projection ou d'interneurones du striatum suggère qu'un changement dans le microenvironnement du striatum pousse ces neurones à changer de phénotype. Cette modification du

microenvironnement pourrait également induire la prolifération, la migration et la différenciation des cellules souches neuronales (NSC) de la zone subventriculaire (SVZ) en neurones TH-ir vraisemblablement fonctionnels. Il a été rapporté que les NSC de la SVZ entrent en mitose suite à une lésion dopaminergique (Liu *et al.*, 2006). Quoi qu'il en soit, promouvoir la formation des neurones TH-ir comme source endogène de dopamine pourrait être une avenue intéressante dans le ralentissement de la progression de la MP de même que dans la réduction de ses symptômes.

1.4.2 Les calpaïnes: une cible potentielle pour la neurorégénération

Les calpaïnes sont des enzymes protéolytiques ubiquitaires dont l'activité est déclenchée par des influx de calcium. Cette famille de protéases comporte une quinzaine de membres mais au niveau du SNC, on distingue principalement, depuis les années 1980, les isoformes calpaïne I (μ -calpaïne) et calpaïne II (m -calpaïne), nommées ainsi selon la concentration molaire de calcium nécessaire à leur activation. Ces isoformes sont présentes autant dans les neurones que dans les cellules gliales. Il est plutôt difficile d'attribuer un rôle physiologique précis aux calpaïnes puisqu'on leur a identifié jusqu'à présent plus d'une centaine de différents substrats. Elles peuvent donc exercer leur effet protéolytique tant sur des récepteurs transmembranaires, des protéines du cytosquelette, des enzymes de plusieurs voies de signalisation que sur des facteurs de transcription (Goll *et al.*, 2003, Franco et Huttenlocher, 2005). L'activité des calpaïnes est essentielle à plusieurs phénomènes physiologiques parmi lesquels on compte la prolifération cellulaire, l'apoptose, la plasticité synaptique, le remodelage du cytosquelette permettant la croissance du cône axonal de même que dans la mobilité cellulaire (Wang, 2000, Gil-Parrado *et al.*, 2002, Glading *et al.*, 2002, Robles *et al.*, 2003, Zadran *et al.*, 2010). La plupart des vastes substrats des calpaïnes jouent un rôle crucial dans l'excitabilité des neurones, la relâche des neurotransmetteurs, la transduction des signaux et la transcription des gènes (Zadran *et al.*, 2010). L'activité physiologique des calpaïnes est donc associée à un vaste éventail d'événements cellulaires allant de l'adhésion et la division cellulaire à la régulation de la transcription et la production de la potentialisation à long terme (Baudry *et al.*).

L'implication des calpaïnes a été démontrée dans plusieurs pathologies dégénératives du cerveau telles que la maladie d'Alzheimer, la MP, la chorée de Huntington, les accidents vasculaires cérébraux de même que dans le vieillissement normal (Nixon, Camins *et al.*, 2006). Avec les caspases, elles constituent le groupe de protéases dont le rôle dans les désordres neurodégénératifs est le mieux caractérisé. Alors que l'activation démesurée des calpaïnes était initialement associée au processus de mort nécrotique, des études plus récentes ont indiqué qu'elle est également déterminante dans la mort apoptotique (Liou *et al.*, 2005). Cette hypothèse est supportée par le fait que l'apoptose survient dans des modèles *knockout* pour la caspase-3, indiquant que l'activité d'autres cystéine-protéases converge vers la cascade intracellulaire apoptotique (Liu *et al.*, 2004). De plus, des données expérimentales suggèrent que l'effet des inhibiteurs de caspases et de calpaïnes s'additionne en regard de la prévention de l'apoptose et révèlent la communication entre ces deux systèmes protéolytiques (Raghupathi *et al.*, 2000, O'Hare *et al.*, 2005).

Dans le contexte physiopathologique de la MP, la suractivité de protéines dépendantes du calcium telles que les calpaïnes a été démontrée de même que l'expression accrue de l'isoforme m-calpaïne dans la substance noire de patients parkinsoniens (Mouatt-Prigent *et al.*, 1996, Alvira *et al.*, 2008). Il semble que l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale par des neurotoxines telles le MPTP et le roténone active les calpaïnes avant même que les caspases ne soient activées (Chen *et al.*, 2006). L'utilisation d'un inhibiteur de calpaïnes prévient la perte des neurones dopaminergiques lors de l'utilisation de neurotoxines comme le MPTP chez la souris (Crocker *et al.*, 2003, Mazloom et Smith, 2006) et la 6-OHDA chez le rat (Grant *et al.*, 2009) et conséquemment, empêche l'apparition des symptômes parkinsoniens. Il est démontré que l'activité des calpaïnes et des caspases est augmentée dans la SNc, moins de 24h après l'administration de 6-OHDA chez le rat. Contrairement à l'activité des caspases, celle des calpaïnes est soutenue et demeure accrue dans ce contexte parkinsonien.

Une récente étude menée au sein de notre laboratoire a démontré que l'inhibition des calpaïnes au niveau du striatum prévient les changements neurochimiques de même que les dyskinésies induites par la L-DOPA chez le rat lésé à la 6-OHDA (Chagniel *et al.*, 2012b). De plus, l'étude biochimique des cerveaux a permis d'identifier une importante augmentation de la quantité de TH au sein du striatum chez les animaux parkinsoniens qui recevaient la L-DOPA en combinaison avec l'infusion intrastriatale de MDL28170. Cette étude suggère qu'une quantité accrue de TH au niveau du striatum permet de mieux réguler la neurotransmission dopaminergique et ainsi réduire l'apparition de mouvements anormaux involontaires sous-jacents à la dopathérapie. Il apparaît alors intéressant d'investiguer la façon dont l'inhibition des calpaïnes peut influencer l'expression de la TH dans ce contexte particulier.

CHAPITRE II

HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

L'objectif général de mon projet de maîtrise est d'investiguer l'effet de l'inhibition des protéines calpaines sur l'apparition des neurones TH-ir au niveau du striatum chez le modèle de rats hémitroisiens lésés à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) et traités avec la L-DOPA.

Tout d'abord, le premier objectif spécifique est de recréer le modèle de rat hémitroisiens dans lequel on observe une hausse des niveaux de TH au sein du striatum. Pour ce faire, il suffit de procéder à l'injection d'une forte dose de 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale (MFB, de l'anglais *medial forebrain bundle*) droit afin de créer un modèle animal dont la voie dopaminergique nigrostriée est fortement détruite dans un hémisphère cérébral. Le test à l'apomorphine de même que le test du cylindre sont des épreuves comportementales utilisées afin d'évaluer l'intensité de la lésion dopaminergique et ainsi répartir les animaux en groupes équivalents pour la suite des procédures expérimentales. Des rats reçoivent une infusion chronique de MDL28170 directement dans le striatum droit grâce à l'installation d'une canule reliée à une mini-pompe osmotique. Ces animaux, ainsi que ceux d'un groupe témoin sans MDL28170, reçoivent ensuite un traitement de L-DOPA durant 21 jours et leur sacrifice permet de préserver les cerveaux pour des analyses par immunofluorescence indirecte. L'enzyme TH sert de marqueur cellulaire afin de quantifier la lésion dopaminergique dans la SNC des différents groupes expérimentaux par la technique de stéréologie sous un microscope semi-confocal.

Depuis plusieurs années, nous connaissons l'existence des neurones TH-ir dans le striatum mais le rôle que pourraient jouer les calpaines sur le nombre de neurones ainsi que sur l'intensité de leur expression de la TH n'a encore jamais été étudié. En utilisant

la technique d'immunofluorescence indirecte, l'observation de coupes coronales de cerveaux contenant le striatum de rats hémi parkinsoniens recevant un traitement de L-DOPA et une infusion intrastriatale d'inhibiteur des calpaïnes, à fort grossissement, révèle la présence de nombreux neurones TH-ir. Le second objectif spécifique est de quantifier la présence des neurones TH-ir dans le striatum des rats lésés à la 6-OHDA et traités à la L-DOPA ainsi que de ceux qui reçoivent en plus l'infusion locale de MDL28170 afin d'apprécier l'effet d'une inhibition des calpaïnes. L'estimation de la densité cellulaire est également faite par la technique de stéréologie.

Il est connu que des neurones TH-ir sont présents dans le striatum des rats lésés à la 6-OHDA et traités à la L-DOPA. Leur phénotype a été brièvement caractérisé par plusieurs études et il semblerait qu'ils partagent des caractéristiques biochimiques avec les neurones de projection et les interneurones du striatum, suggérant qu'ils en dérivent. Plusieurs auteurs rapportent que les neurones TH-ir n'incorporent pas la 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), un analogue synthétique de la thymidine incorporé dans l'ADN des cellules nouvellement formées alors que d'autres soutiennent qu'ils ne contiennent pas de lipofuschine, un pigment associé avec le vieillissement et seraient donc des cellules immatures (Betarbet *et al.*, 1997, Cossette *et al.*, 2005b, Tande *et al.*, 2006, Darmopil *et al.*, 2008). Le troisième objectif spécifique est de faire le point sur l'origine des neurones TH-ir du striatum des rats hémi parkinsoniens traités à la L-DOPA avec et sans MDL28170 afin d'apprécier l'influence de l'activité des calpaïnes sur l'apparition de ces neurones. Pour ce faire, j'ai employé la technique de double immunofluorescence afin de mettre en évidence la TH en même temps que différents marqueurs cellulaires. Le marquage de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) propre aux astrocytes en comparaison avec le marqueur nucléaire neuronal (NeuN) a servi à confirmer le caractère neuronal des cellules exprimant la TH. Le marquage de la protéine cytosolique calbindine (CB), de l'enzyme choline acétyltransférase (ChAT) ou la protéine de cytosquelette doublecortine (DCX) ont servi respectivement à déterminer si les neurones TH-ir dérivent des neurones de projection du striatum, des interneurones cholinergiques ou encore de précurseurs neuronaux en migration.

En plus des cerveaux post-mortem de patients parkinsoniens, les neurones TH-ir ont été étudiés dans le striatum de primates intoxiqués au MPTP, des rats et des souris lésés à la 6-OHDA mais aucune étude ne rapporte de neurones TH-ir chez la souris MPTP. L'injection unilatérale de 6-OHDA dans le cerveau des rongeurs permet d'obtenir une forte lésion dopaminergique dans un seul hémisphère cérébral, facilitant la survie des animaux. Il est plus difficile d'obtenir une lésion aussi marquée en injectant le MPTP de façon systémique. Au laboratoire, un protocole efficace a été mis au point pour les injections de MPTP et permet d'avoir un haut taux de déplétion dopaminergique tout en maintenant les souris vivantes (Chagniel *et al.*, 2012a). Un objectif complémentaire à mon étude est de valider l'existence des neurones TH-ir dans le striatum des souris lésées au MPTP et de tenter d'établir à quel moment suite à la lésion ces neurones se manifestent dans le striatum. La technique d'immunofluorescence et le décompte cellulaire par stéréologie sont employés sur des échantillons contenant la substance noire et le striatum afin d'étudier respectivement l'intensité de la lésion dopaminergique ainsi que l'apparition des cellules dopaminergiques dans le striatum suite à cette lésion. L'enzyme TH de même que le DAT sont utilisés comme marqueurs biochimiques des neurones dopaminergiques et de leurs terminaisons nerveuses. Le modèle de souris MPTP est beaucoup plus rapide à obtenir que le rat hémiparkinsonien et serait donc avantageux à utiliser afin d'approfondir les recherches sur le rôle des calpaïnes.

CHAPITRE III

MÉTHODOLOGIE ET APPROCHE SCIENTIFIQUE

Afin d'approfondir les connaissances sur la nature de l'augmentation de la TH dans le striatum des rats hémiparkinsoniens lésés à la 6-OHDA suite à un traitement de L-DOPA associée à l'inhibition locale des calpaines, j'ai repris exactement le modèle expérimental antérieur afin de recréer le phénomène (Chagniel *et al.*, 2012b). Dans ce chapitre, toutes les étapes expérimentales de mon projet seront détaillées de même que le matériel et les techniques utilisées.

3.1 Procédures expérimentales *in vivo*

3.1.1 Animaux

Les procédures expérimentales ont été réalisées chez 23 rats mâles d'âge adulte de type Sprague Dawley (Charles River Laboratories, St-Constant, QC, Canada). Les animaux étaient hébergés en paires dans une cage dans un climat contrôlé (cycle de 14h de lumière/10h de noirceur) et ils avaient libre accès à l'eau et à la nourriture. Toutes les expérimentations ont été approuvées par le Comité de Bons Soins aux Animaux de l'Université du Québec à Trois-Rivières et sont en accord avec les standards éthiques du Conseil Canadien de Protection des Animaux.

3.1.2 Design expérimental

La Figure 3.1 représente les différentes manipulations réalisées chez les rats pour mener à la réalisation du projet. Brièvement, j'ai procédé à l'injection de 6-OHDA dans le MFB de l'hémisphère droit du cerveau puis laissé agir la toxine pendant 10 jours. Afin d'assurer la qualité des manipulations et l'intensité de la dénervation

dopaminergique, j'ai effectué des tests comportementaux afin d'utiliser seulement les animaux sévèrement affectés par la 6-OHDA. J'ai divisé les animaux en trois groupes soit un groupe contrôle *sham* (injection de saline dans le MFB de l'hémisphère droit du cerveau), un groupe 6-OHDA + L-DOPA (animaux lésés et traités à la L-DOPA à raison de deux doses quotidiennes pendant 21 jours) et un groupe 6-OHDA + L-DOPA + MDL28170 c'est-à-dire des animaux lésés sur lesquels j'ai installé une canule intrastriatale délivrant en continu un inhibiteur des calpaïnes, le MDL28170, et recevant la L-DOPA à raison de deux doses quotidiennes pendant 21 jours. Suite à la dernière injection de L-DOPA, les animaux ont été sacrifiés par la perfusion d'un liquide fixateur et les cerveaux ont été prélevés pour procéder à des analyses d'immunofluorescence sur des coupes de cerveau particulières.

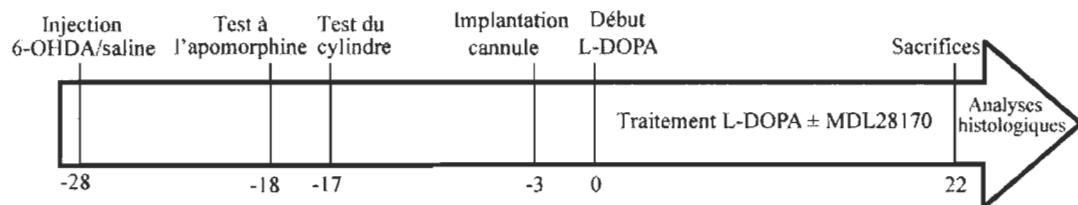


Figure 3.1 Représentation schématique du design expérimental chez le rat.

3.1.3 Injections intracérébrales de 6-OHDA

Sous une anesthésie à l'isoflurane, les rats ont reçu une injection unilatérale dans le MFB droit aux coordonnées stéréotaxiques suivantes: antéropostérieur (AP): -4,3 mm et médial-latéral (ML): 1,7 mm du bregma de même que dorso-ventral (DV): 8,2 mm de la dura (Paxinos et Watson, 2005). Le groupe contrôle *sham* (n=4 rats) a reçu une injection de saline alors que les autres rats (n=19 rats) ont reçu une injection de 6-hydroxydopamine hydrobromide (6-OHDA, 2,5 μ L, 5 mg/mL dans 0,1% acide ascorbique; Sigma-Aldrich, ON, Canada) à un débit de 0,5 μ L/min. Trente minutes avant cette procédure, les animaux ont reçu une injection sous-cutanée de desipramine hydrochloride (15 mg/kg; Sigma-Aldrich) pour protéger les neurones noradrénergiques, étant donné que la 6-OHDA induit une toxicité aux neurones dopaminergiques et noradrénergiques.

3.1.4 Évaluation comportementale de la lésion dopaminergique

Au dixième et au onzième jour après la lésion à la 6-OHDA, les rats ont subi deux tests de comportement qui sont le test de rotation à l'apomorphine ainsi que le test du cylindre afin de sélectionner ceux qui démontrent une déplétion dopaminergique d'environ 90% pour la suite des expérimentations. Pour évaluer le comportement de rotation, les rats ont reçu une injection sous-cutanée de R(-) apomorphine hydrochloride hemihydrate (1mg/kg; Sigma-Aldrich) et on a compté le nombre de rotations controlatérales à la lésion pendant les 30 minutes suivant l'injection. L'apomorphine, un agoniste dopaminergique, stimule les neurones du striatum. Un animal peu ou pas lésé ne présentera pas de comportement de rotation tandis qu'un animal lésé dans l'hémisphère droit présentera une hyperactivité des pattes gauches ce qui mènera à la rotation sur lui-même. Il a été démontré dans la littérature que les rats qui montrent un comportement de rotation prononcé (> 5 tours controlatéraux/minute) ont en fait une baisse du niveau de dopamine dans le striatum de plus de 90% (Papa *et al.*, 1994, Schwarting et Huston, 1996).

Pour ce qui est du test du cylindre, il a lui aussi été par plusieurs afin d'étudier l'utilisation des pattes antérieures des rats suite à l'injection de la 6-OHDA (Schallert *et al.*, 2000, Grant *et al.*, 2009, Chagniel *et al.*, 2012b) (Figure 3.2)



Figure 3.2 Exemple de test du cylindre.

Pour ce faire, les rats sont placés dans un grand cylindre transparent (25 cm de haut, 19 cm de diamètre) pendant 10 minutes et on compte le nombre de fois où l'animal pose soit l'une ou l'autre de ses pattes antérieures, ou les deux à la fois, pendant qu'il explore son environnement. Il n'y a pas de période d'habituation à l'environnement avant le début du test. Les résultats sont exprimés sous forme de pourcentage d'asymétrie entre le côté ipsilatéral et controlatéral à la lésion et on le calcule ainsi:

$$100 \times (\text{Ipsilatéral} - \text{Controlatéral}) / (\text{Ipsilatéral} + \text{Controlatéral})$$

Ainsi, une utilisation égale des deux pattes serait exprimée par 0% et une négligence complète de la patte controlatérale à la lésion serait exprimée par 100%.

3.1.5 Inhibition intrastriatale des calpaines

Vingt-cinq jours après la lésion à la 6-OHDA, une canule a été implantée par une chirurgie stéréotaxique (Figure 3.3) dans le striatum droit des rats (AP: +0,8 mm et ML: +2,8 mm du bregma et +5,0 mm de la dura (Paxinos et Watson, 2005) sous une anesthésie à l'isoflurane.

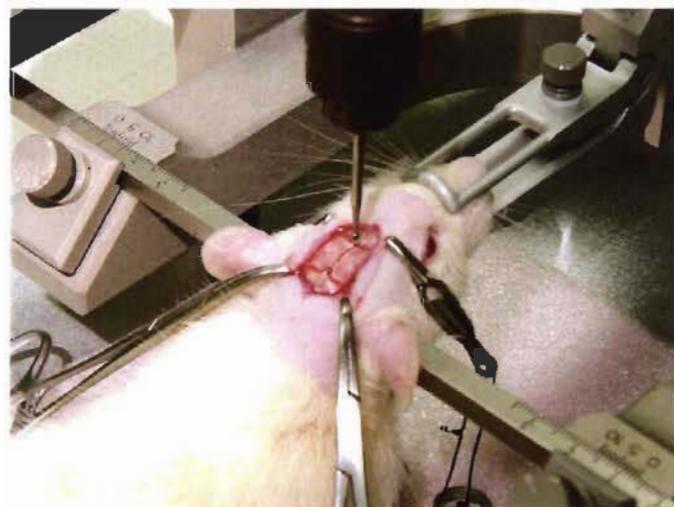


Figure 3.3 Exemple de chirurgie stéréotaxique chez le rat.

La canule a été fixée en place avec l'adhésif instantané Loctite. Une mini-pompe osmotique (Model 2004: 25 μ L/h, 28 jours; Alzet, CA, États-Unis) a été insérée

chirurgicalement sous la peau du rat, entre les scapulae et on l'a connectée à la canule par une tubulure de plastique (Brain infusion kit 2; Alzet). Les rats ont ainsi reçu une infusion intrastriatale en continu de saline ou de l'inhibiteur des calpaïnes: le MDL28170 à une dose de 1,92 nmol/jour (Enzo Life Sciences, PA, États-Unis) jusqu'à la fin du protocole, c'est-à-dire pendant 24 jours. Le MDL28170 a été préparé dans une solution de saline contenant 10% (2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (Sigma-Aldrich) à partir d'une solution stock concentrée à 20 mM dans le dimethyl sulfoxyde (DMSO; Lab Mat, QC, Canada). Le MDL28170 a été sélectionné comme inhibiteur des calpaïnes pour cette étude puisqu'il a une haute sélectivité pour les calpaïnes en regard aux autres protéases et qu'il pénètre facilement les membranes cellulaires (Thompson *et al.*, 2010).

3.1.6 Traitement chronique à la L-DOPA

Trois jours après l'implantation des canules intrastriatales, tous les rats lésés à la 6-OHDA ont débuté un traitement chronique de L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine methyl ester hydrochloride, 25 mg/kg; Sigma-Aldrich) sous forme d'injections sous-cutanées, 2 fois par jour, pendant 21 jours consécutifs (vers 9h et vers 16h). Le benserazide hydrochloride (6,25 mg/kg; Sigma-Aldrich), un inhibiteur de la DDC périphérique a été ajouté à la préparation afin de favoriser la présence de la L-DOPA dans le cerveau. Les rats du groupe *sham* ont reçu le même nombre d'injections mais de saline uniquement. L'étude de comprend pas de groupe expérimental de rats lésés à la 6-OHDA qui ont une infusion intrastriatale de saline ou de MDL28170 et qui reçoivent un traitement de saline à la place de la L-DOPA puisqu'aucune altération des niveaux de TH dans le striatum n'a été observé dans une étude précédente (Chagniel *et al.*, 2012b).

3.1.7 Sacrifice des animaux

Pour préserver les cerveaux afin de procéder à des analyses histologiques par immunofluorescence, les animaux ont été profondément anesthésiés avec l'hydrate de chloral (800 mg/kg, i.p.) puis ont subit une perfusion intracardiaque avec du paraformaldéhyde 4% préparé dans du *phosphate buffered saline* (PBS) 1X pour fixer

tous les tissus. Le sacrifice a eu lieu une heure après la dernière injection de L-DOPA (ou de saline chez le groupe *sham*). Les cerveaux ont été retirés puis post-fixés dans la même solution toute la nuit, puis quelques heures dans une solution 10% sucrose/4% paraformaldéhyde préparé dans du PBS 1X. Ils ont été rapidement congelés dans l’isopentane puis rangés à -80°C jusqu’à leur utilisation.

3.2 Analyses histologiques

3.2.1 Immunofluorescence

Les cerveaux congelés ont été coupés en tranches coronales de 60 µm à l’aide d’un cryostat (Leica CM3050S, Leica, Richmond Hill, ON, Canada) et conservées dans le PBS 1X à 4°C jusqu’à leur utilisation pour l’immunofluorescence. Étant donné la fragilité relative des tissus, la température de l’objet et de la chambre ont été maintenues à -19°C pour maintenir les échantillons les plus fermes possibles. Les tranches de tissu qui contiennent le striatum et qui contiennent la SNC ont été conservées. Ces coupes correspondent environ à la section comprise entre +1,80 et -0,36 mm du bregma pour le striatum et -4,80 et -5,28 mm du bregma pour la SNC.

Les techniques d’immunofluorescence et de stéréologie ont été utilisées afin de dénombrer les neurones d’intérêt par échantillonnages représentatifs. D’une part, j’ai quantifié les neurones dopaminergiques de la SNC, c’est-à-dire exprimant la TH, afin d’apprécier la mort neuronale induite par la 6-OHDA et d’autre part, j’ai quantifié les neurones exprimant la TH dans le striatum afin d’évaluer l’effet d’un traitement local avec le MDL28170 jumelé à la L-DOPA. De plus, la technique de double immunofluorescence a été utilisée afin de caractériser l’origine des neurones TH-ir. Des anticorps ont alors été utilisés pour marquer à la fois TH ainsi que la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), le marqueur nucléaire neuronal (NeuN), la protéine cytosolique calbindine (CB), l’enzyme choline acétyltransférase (ChAT) ou la protéine de cytosquelette doublecortine (DCX). La technique d’immunofluorescence indirecte permet un marquage de différentes protéines (antigènes) en utilisant un premier

anticorps dirigé contre celles-ci puis un second anticorps couplé à un fluorophore dirigé contre l'espèce chez laquelle l'anticorps primaire a été produit. L'émission de fluorescence peut ensuite être visualisée en utilisant le filtre approprié sur un microscope à fluorescence.

Pour réaliser la technique d'immunofluorescence, les coupes ont tout d'abord été incubées dans une solution de perméabilisation (1,2% triton/PBS 1X) pendant 20 minutes à température de la pièce. Cette étape permet de rendre les cellules plus perméables pour favoriser la pénétration des solutions d'anticorps. Après deux lavages de 10 minutes dans du PBS 1X, les coupes ont été incubées pendant 60 minutes à température ambiante dans une solution de blocage constituée de *Normal Goat Serum* (10% NGS / PBS 1X). Cela permet de réduire les liaisons des anticorps sur des épitopes non-spécifiques. Après deux autres lavages dans le PBS 1X, les coupes ont été incubées à 4°C jusqu'au lendemain matin (pendant environ 21h) dans une solution d'anticorps primaire(s) préparé(s) dans un mélange 0,3% triton/2% NGS/PBS 1X. Le Tableau 3.1 détaille les différents anticorps utilisés. Suite à trois lavages de 10 minutes dans le PBS 1X, les coupes ont ensuite été incubées pendant 60 minutes à température ambiante dans une solution d'anticorps secondaire approprié, soit le goat anti-mouse IgG couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ou le goat anti-rabbit IgG couplé au DyLight 594 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) dilués 1 :500 dans une solution 0,3% triton/2% NGS/ PBS 1X. À partir de ce moment, les coupes ont été incubées à l'abri de la lumière. Après deux lavages dans le PBS 1X, les noyaux des cellules sont marqués en incubant les coupes pendant 15 minutes dans une solution de Hoechst 33342 (Invitrogen, ON, Canada) dilué 1 :10000 dans du PBS 1X. Finalement, après 2 derniers lavages dans le PBS 1X, les coupes ont été montées sur les lames SuperFrost. On a utilisé le milieu de montage Vectashield (Vector Laboratories, ON, Canada) pour prévenir les coupes de la déshydratation et préserver la fluorescence. Les lames ont ensuite été conservées à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation.

Anticorps primaires	Fournisseur et no de catalogue	Immunogène	Dilution
<i>Rabbit pAb CB</i>	Millipore, #AB1778	Calbindine recombinante murine	1:500
<i>Rabbit pAb ChAT</i>	Millipore, #AB143	Enzyme placentaire humaine	1:500
<i>Rabbit pAb DCX</i>	Cell Signaling, #4604	Peptide synthétique (KLH) correspondante à la DCX humaine	1:200
<i>Mouse mAb GFAP</i>	Cell Signaling, #3670	Protéine GFAP purifiée de la moelle épinière porcine	1:500
<i>Mouse mAb NeuN</i>	Millipore, #MAB377	Noyaux neuronaux purifiés de cerveaux murins	1:500
<i>Mouse mAb TH</i>	Millipore, #MAB318	Protéine TH purifiée de cellules PC12	1:1000
<i>Rabbit pAb TH</i>	Millipore, #AB152	Protéine TH purifiée de cellules PC12	1:500

Tableau 3.1 Anticorps primaires utilisés pour la technique d'immunofluorescence.

3.2.2 Stéréologie

La stéréologie est une technique qui permet d'estimer la densité cellulaire dans un tissu donné. Cette technique a été utilisée différemment pour réaliser deux objectifs, soit d'évaluer l'intensité de la mort neuronale dans la SNC induite par la 6-OHDA ainsi que pour quantifier l'apparition des neurones TH-ir dans le striatum. Les coupes ont été analysées par un microscope semi-confocal Olympus BX51 (MBF Bioscience, Williston, VT, É.-U.) à l'aide du logiciel *StereoInvestigator* 7.0. Tout d'abord, des microographies ont été prises sous le filtre FITC à 2X puis la région d'intérêt a été agrandie à 20X et 60X. Pour la délimitation de la SNC et du striatum, j'ai utilisé l'objectif 2X en utilisant l'Atlas du cerveau de rat (Paxinos et Watson, 2005) pour trouver des repères anatomiques. L'objectif 60X ApoPlan en immersion à l'huile rattaché à une aperture numérique 1.4 a été utilisé pour estimer la densité cellulaire des neurones d'intérêt. Cet outil permet d'entrer dans la 3^e dimension de la coupe, l'axe Z,

soit l'extension rostrocaudale du cerveau dans une coupe coronale. Ce grossissement permet de compter les cellules avec l'outil *Optical fractionator workflow*. Le principe utilisé est celui du dissecteur: il s'agit d'une sonde 3-D géométrique utilisée pour compter des nombres d'objets (cellules) avec une probabilité qui est inchangée par la taille, la forme, ou l'orientation des objets (Figure 3.4). On utilise cet outil pour estimer le nombre de cellules dans un échantillon.

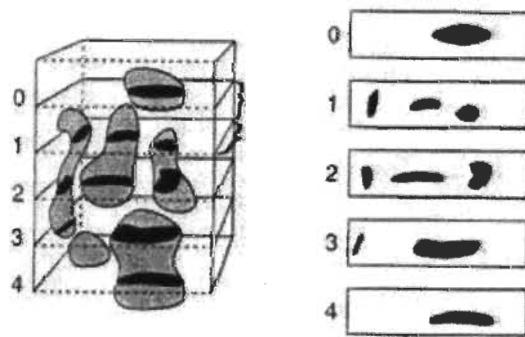


Figure 3.4 Principe du dissecteur en stéréologie.

En décortiquant l'épaisseur de la coupe en plans 2D, il est possible de compter les cellules dans les 3 dimensions de la coupe.

Le dissecteur l'apparente à un carré placé régulièrement et aléatoirement au sein de l'échantillon. En parcourant la profondeur de la coupe, on voit apparaître les cellules. Chaque fois que l'une d'entre elles coupe le carré, elle est comptabilisé par l'expérimentateur qui évalue à quel niveau il doit comptabiliser la cellule pour ne pas compter plus d'une fois la même. Pour sélectionner les cellules positives, on doit d'abord établir un seuil minimal d'expression de la protéine dans la cellule. Pour estimer le volume de la région d'intérêt, le logiciel utilise le principe de Cavalieri selon lequel tout le volume moyen d'un espace arbitraire de référence peut être estimé à partir des secteurs sur les sections systématiques uniformes aléatoires. Le calcul du coefficient d'erreur le plus représentatif est celui de Gundersen 1999 $m=1$. Il tient compte de la variance due au bruit de fond (intra-section) et de la variance du comptage aléatoire systématique (inter-section), en considérant que le marquage sur les coupes de cerveau n'était pas homogène.

Pour estimer la densité cellulaire des neurones TH-ir dans la SNc, trois coupes coronales contenant cette structure ont été utilisées pour chaque rat: -4,80 mm, -5,04 mm et -5,28 mm du bregma (Paxinos et Watson, 2005). Les paramètres de stéréologie ont été déterminés en fonction de la taille de la région d'intérêt. Idéalement, on devrait obtenir approximativement entre 7 et 15 sites de décompte par région afin de pouvoir y compter jusqu'à environ 10 cellules par site. Pour satisfaire ces exigences, la taille des sites de décompte dans la SNc étaient de 50 μm par 50 μm et ils étaient inclus dans une grille virtuelle de 250 μm par 150 μm superposée sur l'image réelle des coupes de cerveau. Un échantillonnage systématique de la région délimitée par le marquage de TH a été fait à partir d'un point de départ aléatoire. L'épaisseur de la coupe a été mesurée à tous les dix sites de décompte en faisant le focus sur le dessus de la coupe pour faire le zéro sur l'axe des Z puis en faisant le focus sur le dessous de la coupe pour prendre la mesure dans cet axe. L'épaisseur moyenne des coupes était de 60 μm avec une marge allant de 57,9 à 62,5 μm . Les neurones immunoréactifs sont considérés seulement s'ils viennent au focus à l'intérieur de la grille de décompte. Cette méthode certifie un décompte cellulaire uniforme et systématique. Le focus à travers l'axe des Z a révélé que le traitement des coupes par la technique d'immunofluorescence a pénétré toute l'épaisseur des coupes de tissus. Lorsque l'expérimentateur est passé à travers tous les sites de décompte, le logiciel estime le nombre de cellules selon la moyenne de l'épaisseur mesurée ainsi que le volume de la région d'intérêt (mm^3), ce qui permet facilement de calculer la densité cellulaire. Les données sont exprimées en nombre de neurones TH-ir par mm^3 .

Pour ce qui est du décompte des neurones TH-ir dans le striatum de même que pour vérifier le double marquage par immunofluorescence (colocalisation), la taille des sites de décompte était la même que celle des cases de la grille virtuelle (400 μm par 400 μm) de sorte que l'expérimentateur puisse voir l'ensemble des cellules TH-ir de la structure et comptabiliser celles qui colocalisent avec le 2^e marqueur cellulaire afin d'établir un pourcentage. Seulement les cellules TH-ir comprenant la silhouette d'un noyau (non-marqué) bordé d'un cytoplasme immunoréactif pour TH ont été comptabilisées. Pour s'assurer de la spécificité du marquage de TH, un marquage non-spécifique a été testé en remplaçant l'anticorps primaire (anti-TH) par une solution

d'IgG (Millipore) à une concentration de 1 µg/mL, qui correspond à la même concentration que celle de l'anticorps primaire. Pour l'évaluation du nombre de cellules TH-ir dans le striatum, sept coupes coronales contenant cette structure ont été considérées par animal: +1,08, +0,84, +0,60, +0,36, +0,12, -0,12, -0,36 mm du bregma (Paxinos et Watson, 2005). Pour la caractérisation du phénotype des neurones TH-ir par immunofluorescence double, deux coupes coronales ont été considérées par animal pour chaque marqueur, à différentes coordonnées entre +0,84 mm et -0,36 mm du bregma (Paxinos et Watson, 2005). Les données sont exprimées en pourcentage de neurones TH-ir doublement marqués par rapport au nombre total de neurones TH-ir par mm³.

3.2.3 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été faites à l'aide du logiciel *Graph Pad Prism* (version 5.0 software, Graph Pad Software, CA, États-Unis). Toutes les données ont été évaluées par le test d'analyse de la variance (*one-way* ANOVA) suivie du test *post hoc* de Newman-Keuls. Les résultats représentent le nombre moyen ± l'erreur standard de la moyenne (S.E.M.) et le seuil de différence statistique a été fixé à $p<0,05$.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS

4.1 Validation de la lésion dopaminergique

Suite à une injection unilatérale de 6-OHDA dans le MFB chez le rat, il est nécessaire de valider l'efficacité de la lésion dopaminergique et par le fait même, la précision de l'injection stéréotaxique intracrânienne de la neurotoxine. En suivant le design expérimental, la validation comportementale de la lésion dopaminergique est effectuée aux dixième et onzième jours suivant l'injection de 6-OHDA (Figure 4.1) par le test à l'apomorphine et le test du cylindre.

La Figure 4.1A montre les rotations controlatérales à la lésion induites par l'injection d'apomorphine. L'injection de saline chez le groupe *sham* n'a pas induit de comportement de rotation. En comparaison, l'injection d'apomorphine a induit un comportement de rotations controlatérales à la lésion à la 6-OHDA allant de faible (≤ 5 tours/minute, $n=7$) à sévère (>5 tours/minute, $n=12$). Il a été clairement démontré que les rats qui manifestent un comportement de rotation prononcé (>5 tours/minute) suite à l'administration d'apomorphine ont réellement une déplétion de dopamine striatale allant jusqu'à plus de 90% (Papa *et al.*, 1994, Schwarting et Huston, 1996). Les rats montrant un comportement de rotation prononcé ont été séparés en deux groupes expérimentaux en choisissant les rats pour que chacun des groupes montre un nombre moyen de rotations controlatérales équivalent. Ces deux groupes ont par la suite été traités avec la L-DOPA seule ou combinée avec l'inhibiteur des calpaïnes (MDL28170). Les rats ne montrant qu'un faible comportement de rotation (≤ 5 tours/minute) ont été exclus de la suite de l'étude (Figure 4.1A : ANOVA, $F_{(4,22)}=26,61, p<0,001$).

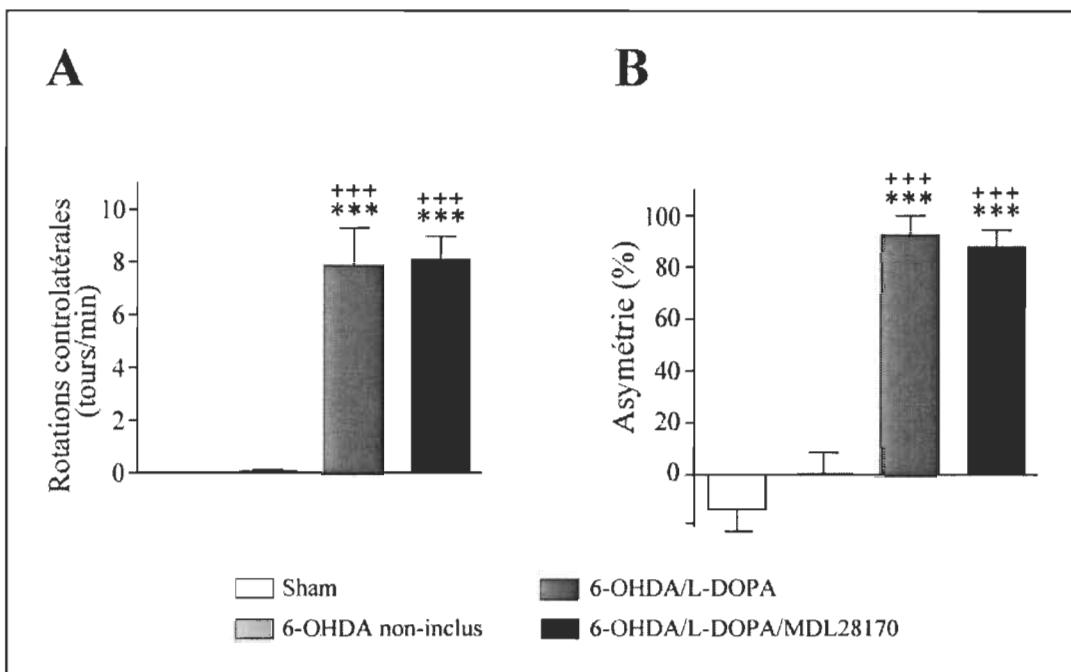


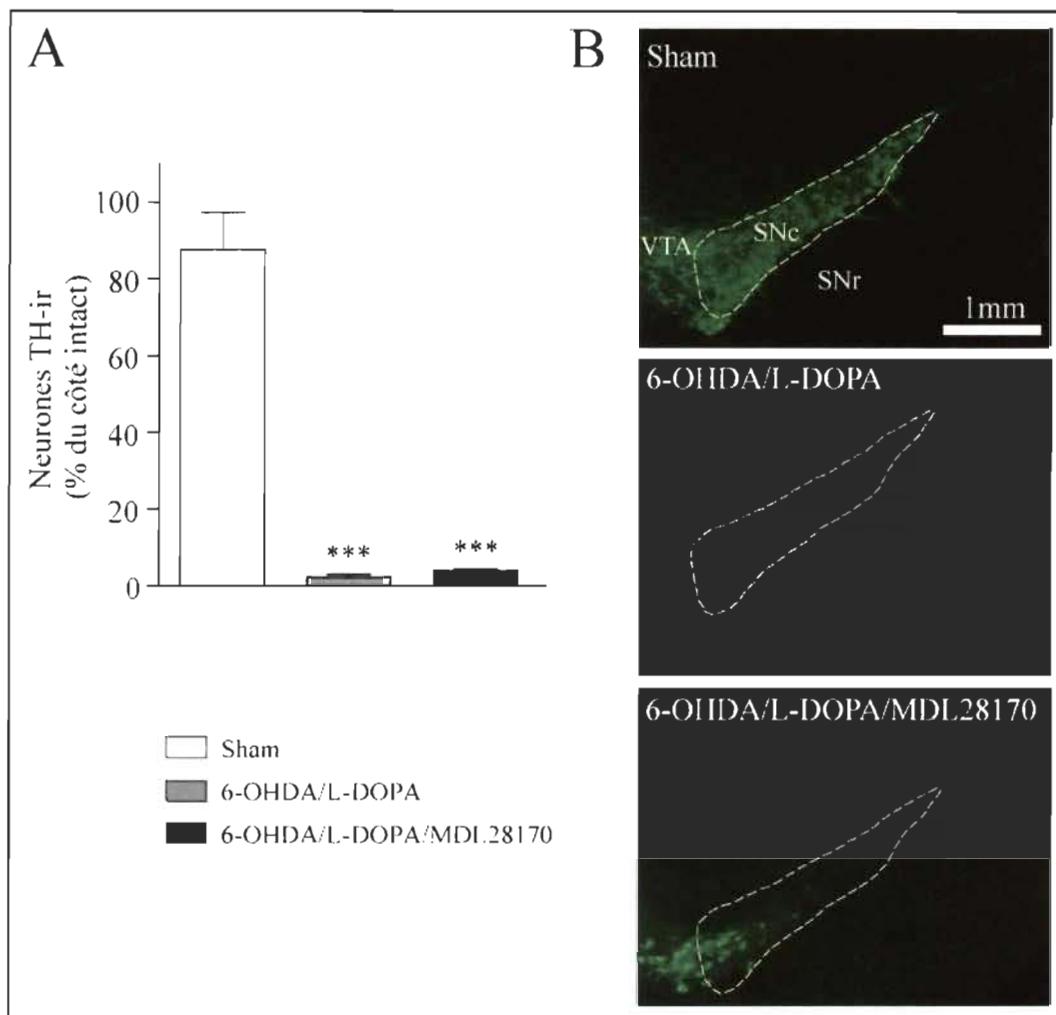
Figure 4.1 Validation comportementale de la lésion dopaminergique induite par la 6-OHDA.

En A, degré de rotations contralatérales à la lésion dopaminergique après l'administration d'apomorphine chez le groupe *sham* (injection de saline, n=4) et les groupes lésés à la 6-OHDA non-inclus (≤ 5 tours/minute, n=7) et inclus (>5 tours/minute, n=12) dans l'étude. Les données représentent le nombre moyen de rotations par minute \pm SEM. En B, degré de négligence sensorimotrice contralatérale à la lésion dopaminergique chez les rats *sham* et les rats lésés à la 6-OHDA non-inclus et inclus dans l'étude mesurés par le test du cylindre. Les données représentent la moyenne du pourcentage d'asymétrie entre le côté ipsilatéral et le côté contralatéral à la lésion \pm SEM. *** $p < 0,001$ versus *sham*, ++ $p < 0,01$ versus 6-OHDA non-inclus.

Le test du cylindre (Figure 4.1B) a été effectué au onzième jour après la lésion à la 6-OHDA. Une sévère négligence sensorimotrice de la patte antérieure contralatérale à la lésion a été observée chez les mêmes rats lésés à la 6-OHDA qui ont eu une sévère réponse au test à l'apomorphine. Il est à noter que les rats qui ont faiblement répondu au test à l'apomorphine ainsi que les rats du groupe *sham* ont démontré une utilisation similaire de leurs pattes antérieures lors du test du cylindre. Le pourcentage moyen d'asymétrie est comparable entre les deux groupes de rats qui ont manifesté un sévère comportement de rotation induit par l'apomorphine (Figure 4.1B: ANOVA $F_{(4,22)}=30,55$,

$p<0,001$). Ce protocole a donc généré quatre groupes expérimentaux qui se composent comme suit: *sham* (n=4), 6-OHDA (n=4), 6-OHDA/L-DOPA (n=4) et 6-OHDA/L-DOPA/MDL28170 (n=4). Nous n'avons pas inclus de groupe de rats 6-OHDA traités avec une canule intrastriatale de saline ou encore de MDL28170 sans traitement additionnel de L-DOPA dans cette étude puisqu'aucune altération dans le niveau de TH du striatum n'a été observée dans une étude antérieure (Chagniel *et al.*, 2012b).

Il est bien connu que l'étendue de la lésion dopaminergique chez les rats qui ont reçu la 6-OHDA corrèle inversement avec le nombre de neurones TH-ir de la SNc (Jakowec et Petzinger, 2004, Lebel *et al.*, 2010, Chan *et al.*, 2011, Chagniel *et al.*, 2012b). En utilisant la technique d'immunofluorescence en combinaison à une stricte procédure de décompte cellulaire par stéréologie, la densité cellulaire des neurones TH-ir de la SNc (nombre de neurones TH-ir/mm³) a été estimée chez tous les rats qui ont reçu la lésion à la 6-OHDA et qui ont été inclus dans l'étude suite aux tests comportementaux (Figure 4.2A-B). Un nombre similaire de neurones TH-ir a été observé dans les deux hémisphères des rats du groupe *sham* aussi bien que dans le côté intact (gauche) des rats qui ont l'injection de 6-OHDA dans le MFB droit (données non-montrées). Par contre, le nombre de neurones TH-ir de la SNc du côté ipsilatéral à l'injection de 6-OHDA a été dramatiquement réduit chez tous les rats qui ont reçu ce traitement, qu'ils aient été subséquemment traités avec la L-DOPA seule ou en combinaison avec le MDL28170 (Figure 4.2A-B: ANOVA $F_{(3,14)}=66,44$, $p<0,001$).

**Figure 4.2****Validation histologique de la lésion dopaminergique.**

En A, nombre de neurones TH-ir de la SNC chez les rats lésés à la 6-OHDA sacrifiés 25 jours après la lésion et les rats lésés à la 6-OHDA et traités avec la L-DOPA seule ou combinée avec le MDL28170 sacrifiés 49 jours après la lésion. Les données, exprimées en pourcentage du côté intact, représentent le nombre moyen de neurones TH-ir/mm³ \pm SEM, n=4 rats par groupe, 3 coupes coronales de cerveau ont été considérées par animal : -4,80 mm, -5,04 mm et -5,28 mm du bregma (Paxinos et Watson, 2005) *** $p < 0,001$ versus sham. En B, exemples représentatifs du marquage de TH par immunofluorescence montrant les neurones TH-ir de la SNC des rats sham, lésés à la 6-OHDA et lésés à la 6-OHDA et traités avec la L-DOPA seule ou combinée avec le MDL28170.

4.2 L'inhibition intrastriatale des calpaïnes augmente le nombre de neurones TH-ir du striatum chez les rats lésés à la 6-OHDA et traités à la L-DOPA

L'étude du striatum par l'immunofluorescence de TH a révélé un marquage important dans le striatum dorsal chez les rats lésés à la 6-OHDA et traités avec la L-DOPA et l'infusion intrastriatale de MDL28170 (Figure 4.3, haut). L'observation des coupes de striatum à plus fort grossissement a permis de découvrir une population massive de cellules caractérisées par un dense marquage de TH dans leur cytoplasme et l'absence de marquage de TH au niveau de leur noyau. Ces cellules TH-ir sont fortement présentes dans la région entourant le site d'insertion de la canule (Figure 4.3A, bas).

Pour contrôler la qualité de la méthode d'immunofluorescence de TH, des coupes coronales de striatum correspondantes à des coordonnées stéréotaxiques adjacentes au site d'insertion de la canule ont été incubées dans une solution d'IgG afin de vérifier le marquage non-spécifique. Aucun marquage de TH n'a été détecté, validant ainsi la spécificité des anticorps utilisés dans cette étude (Figure 4.3B).

Afin d'évaluer l'impact que le traitement avec la L-DOPA et l'inhibiteur des calpaïnes a sur la présence des neurones TH-ir du striatum chez le rat lésés à la 6-OHDA, l'immunofluorescence de TH a également été faite sur des coupes coronales de striatum de rats *sham* et de rats lésés à la 6-OHDA et traités à la L-DOPA. Une observation rigoureuse de chacune des coupes à l'aide du logiciel de stéréologie a permis de faire un décompte des neurones TH-ir pour chacun des quatre groupes expérimentaux (Figure 4.3C, Tableau 4.1). Chez le groupe de rats contrôles *sham*, aucun neurone TH-ir n'a vraisemblablement été observé (injectés saline; $0,1 \pm 0,3$ neurones/mm³) et c'est aussi vrai pour le côté intact de chaque rat. Chez les rats lésés à la 6-OHDA, quelques neurones TH-ir ont été détectés dans le striatum lésé après le traitement à la L-DOPA ($3,5 \pm 1,2$ neurones/mm³). L'ajout d'une infusion intrastriatale de MDL28170 augmente de façon éclatante le nombre de neurones TH-ir dans le striatum pour atteindre en moyenne $916,1 \pm 229,1$ neurones/mm³ (Figure 4.3C: ANOVA, $F_{(3,15)}=63,66, p<0,001$).

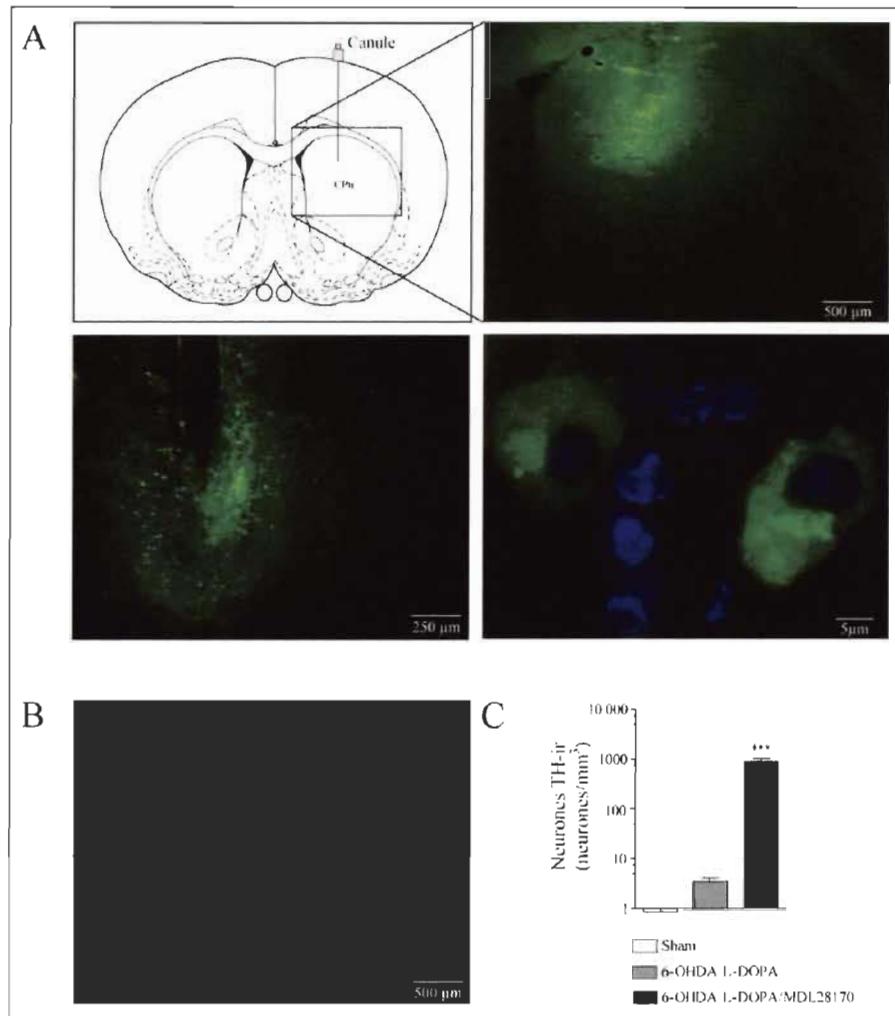


Figure 4.3 L'inhibition intrastriatale des calpaïnes combinée au traitement à la L-DOPA augmente le marquage de TH par immunofluorescence dans le striatum de rats lésés à la 6-OHDA.

En A, reconstruction histologique d'une coupe coronale de cerveau (AP: +0,36 mm du bregma (Paxinos et Watson, 2005) au site d'infusion de l'inhibiteur des calpaïnes. Exemples de micrographies d'immunofluorescence à différents grossissements du striatum droit de rats lésés à la 6-OHDA et traités avec la L-DOPA et le MDL28170 sacrifiés 49 jours après la lésion. Le haut niveau de marquage de TH par immunofluorescence du striatum de rats lésés à la 6-OHDA et traités avec la L-DOPA et le MDL28170 est dû à la présence de neurones TH-ir entourant le site d'infusion. En B, le marquage non-spécifique a été déterminé en utilisant une solution d'IgG à la même concentration que l'anticorps contre TH. En C, l'inhibition intrastriatale des calpaïnes augmente le nombre de neurones TH-ir dans le striatum de rats lésés à la 6-OHDA et traités avec la L-DOPA. Les données représentent le nombre moyen de neurones TH-ir par $\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$. *** $p < 0,001$ versus tous les autres groupes.

4.3 Caractérisation du phénotype des neurones TH-ir du striatum

Plusieurs études ont décrit la présence de neurones TH-ir dans le striatum de rats modèles de la maladie de Parkinson traités avec la L-DOPA mais il n'y a pas de consensus précis sur leurs caractéristiques morphologiques et biochimiques. Puisque cette étude est la première à décrire ce phénomène chez les rats lésés à la 6-OHDA et traités avec la L-DOPA et le MDL28170, il s'avère primordial d'investiguer sur l'origine de ces nombreux neurones TH-ir.

Afin d'évaluer si les neurones TH-ir du striatum proviennent des astrocytes, d'une différenciation cellulaire ou encore d'une prolifération cellulaire, la technique d'immunofluorescence double a été réalisée (Figure 4.4, Tableau 4.1). Pour vérifier si l'expression de TH pouvait avoir une origine gliale, l'immunofluorescence de TH a été faite en association avec la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), un marqueur bien connu pour les astrocytes (Figure 4.4A). Chez les rats lésés à la 6-OHDA et traités avec la L-DOPA aussi bien seule qu'en combinaison avec le MDL28170, aucun des neurones TH-ir ne co-exprimait GFAP (0,0%). Pour confirmer la nature neuronale de ces cellules TH-ir, l'immunofluorescence de TH a été combinée au marqueur neuronal *neuronal nuclei* (NeuN, Figure 4.4B). Chez les rats lésés à la 6-OHDA et traités avec la L-DOPA, chacun des neurones TH-ir avait un marquage concordant pour NeuN ($100,0 \pm 0,0\%$). En contraste, chez les rats qui ont reçu un traitement additionnel avec l'inhibiteur des calpaines, seulement $70,8 \pm 4,8\%$ des neurones TH-ir du striatum sont également positifs pour NeuN.

	Marqueurs biochimiques			
	NeuN	CB	ChAT	DCX
6-OHDA/L-DOPA				
Nombre de neurones TH-ir comptés	2,0±1,0	3,0±0,7	5,8±1,5	4,0±1,2
Nombre de neurones doublement marqués	2,0±1,0	2,0±0,4	1,0±0,0	0,0±0,0
Pourcentage de neurones doublement marqués	100,0%	72,9%	21,3%	0,0%
6-OHDA/L-DOPA/MDL28170				
Nombre de neurones TH-ir comptés	352,0±17,0	704,7±213,1	446,3±183,4	335,7±41,3
Nombre de neurones doublement marqués	250,0±29,0	6,0±1,7	23,3±9,8	136,0±52,3
Pourcentage de neurones doublement marqués	70,8%	0,9%	5,1%	38,0%

Tableau 4.1 Phénotype moléculaire des neurones TH-ir du striatum chez les rats lésés à la 6-OHDA et traités avec la L-DOPA seule ou combinée au MDL28170.

Les données représentent le nombre de neurones doublement marqués par immunofluorescence reporté sur le nombre total de neurones TH-ir exprimé en pourcentage. Toutes les valeurs sont une moyenne ± SEM d'un décompte cellulaire effectué sur deux coupes coronales de striatum par rat, n=4 rats par groupe.

Pour investiguer si un changement dans l'expression du phénotype des neurones préexistants du striatum peut être à l'origine de la présence des neurones TH-ir, la double immunofluorescence de TH a été faite, dans un premier temps avec le marqueur de neurones de projection calbindine (CB, Figure 4.4C) et dans un second temps avec le marqueur d'interneurones cholinergiques choline acétyltransférase (ChAT, Figure 4.4D). Dans le striatum des rats lésés à la 6-OHDA et traités avec la L-DOPA, la majorité des neurones TH-ir sont doublement marqués pour la CB (72,9 ± 10,4%) alors que seulement 0,9 ± 0,1% des neurones TH-ir est doublement marqué chez le groupe de rats qui reçoit en plus le MDL28170. Pour ce qui est de ChAT, 21,3 ± 5,1% des neurones TH-ir du striatum des rats lésés à la 6-OHDA et traités à la L-DOPA expriment à la fois TH et ChAT alors que chez les rats lésés à la 6-OHDA et traités avec la L-DOPA et le MDL28170, c'est plutôt 5,1 ± 0,5% des neurones TH-ir qui expriment également ChAT.

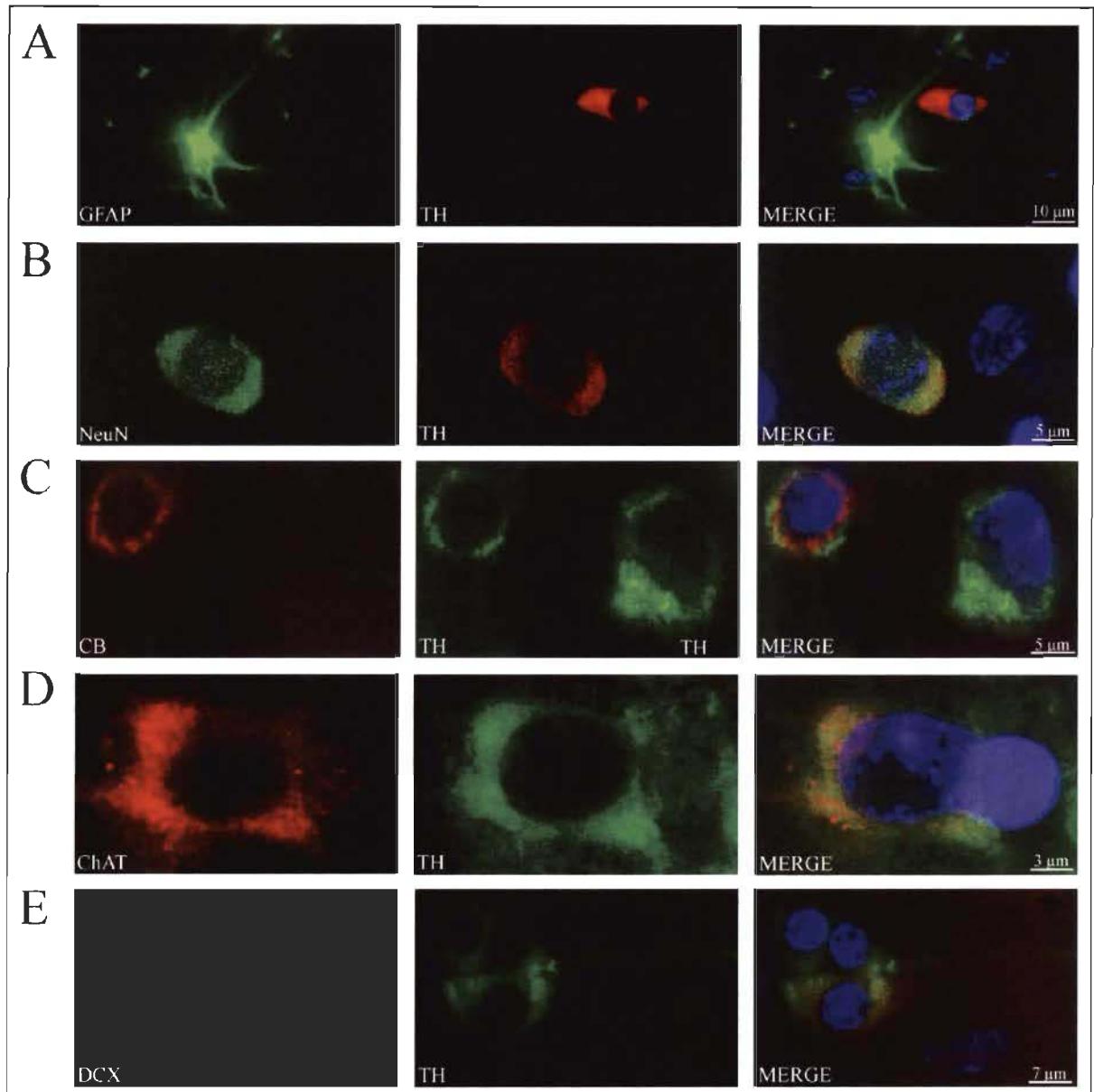


Figure 4.4 Caractérisation par immunofluorescence des neurones TH-ir du striatum des rats lésés à la 6-OHDA et traités avec la L-DOPA et le MDL28170.

Micrographies prises par microscopie semi-confocale montrant des coupes coronales du striatum marquées par double immunofluorescence avec un anticorps contre TH ainsi qu'un anticorps contre A, DCX, B, calbindine, C, ChAT, D, NeuN et E, GFAP. Toutes les coupes coronales de striatum proviennent de rats sacrifiés 49 jours après la lésion à la 6-OHDA et qui ont reçu une inhibition intrastriatale des calpaines par une infusion en continu de MDL28170 ainsi qu'un traitement de L-DOPA durant les 21 derniers jours qui ont précédé le sacrifice.

Pour déterminer si l'expression de TH par des neurones du striatum pouvait être générée *de novo*, c'est-à-dire suite à la prolifération cellulaire de précurseurs neuronaux, la double immunofluorescence de TH a été performée avec la doublecortine (DCX), une protéine associée aux microtubules retrouvée exclusivement dans les neurones immatures en processus de migration et de différenciation cellulaire (Figure 4.4E). Chez les rats lésés à la 6-OHDA et traités avec la L-DOPA, aucun neurone exprimant à la fois TH et DCX n'a été observé. Par contre, $38,0 \pm 10,2\%$ des neurones TH-ir étaient doublement marqués pour la DCX lorsque le traitement de L-DOPA est administré en combinaison avec l'inhibiteur des calpaïnes chez les rats lésés à la 6-OHDA. Il est à noter que la plupart de ces cellules ont été retrouvées dans la portion dorsale du striatum, à proximité de la SVZ.

CHAPITRE V

DISCUSSION

Une étude précédente menée par l'équipe de recherche du professeur Michel Cyr, Ph.D., a brillamment démontré que l'inhibition intrastriatale des calpaïnes chez le rat hé miparkinsonien induit une importante augmentation de la quantité de TH retrouvée au niveau du striatum lors du traitement à la L-DOPA. De plus, ce phénomène est associé à une réduction de l'émergence et de la sévérité des dyskinésies de même qu'au réversement des modifications biochimiques du striatum qui sont engendrées par le traitement chronique à la L-DOPA. Toutefois, l'origine de cette augmentation localisée de TH demeure incertaine. Au cours des travaux de recherche que j'ai menés pendant ma maîtrise, j'ai démontré que l'inhibition intrastriatale des calpaïnes, dans ce modèle de rat hé miparkinsonien traité à la L-DOPA, peut stimuler l'apparition de neurones exprimant la TH dans le striatum. La caractérisation par immunofluorescence de ces cellules a révélé qu'une petite partie de ces cellules co-expriment la CB, suggérant que la TH peut être exprimée suite à un changement dans les neurones de projection préexistants du striatum alors qu'une majeure proportion des cellules TH-ir co-exprime la DCX, une protéine exprimée par des cellules neuronales immatures et en processus de migration cellulaire.

5.1 Validation du modèle de rat hé miparkinsonien

Afin de recréer un modèle symptomatique de la maladie de Parkinson en laboratoire, l'administration de toxines environnementales ou synthétiques ainsi que l'induction de mutations génétiques caractéristiques de certaines formes de la maladie sont couramment utilisés (Blesa *et al.*, 2012). La 6-OHDA est une neurotoxine employée depuis les années 1950 pour tuer sélectivement les neurones dopaminergiques. En fait, elle réussit à pénétrer les cellules à cause de sa haute affinité pour les transporteurs

catécholaminergiques tels que le DAT et le transporteur de la noradrénaline (Sachs et Jonsson, 1975, Schwarting et Huston, 1996). Afin d'assurer la sélectivité dopaminergique et de préserver la viabilité des neurones noradrénergiques, on l'administre conjointement à un inhibiteur du transporteur de la noradrénaline tel que la désipramine. Bien que la 6-OHDA soit d'une structure très similaire à la dopamine, le groupement hydroxyle qu'elle contient induit un stress oxydatif toxique pour les neurones dopaminergiques de par son effet inhibiteur sur les complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire mitochondriale (Glinka *et al.*, 1997). Cela affecte les corps cellulaires et induit la dégénérescence des fibres nerveuses (Deumens *et al.*, 2002). Cette molécule ne peut traverser la BHE. De ce fait, on doit l'injecter directement dans le cerveau pour bénéficier de son effet. Le plus souvent, comme je l'ai utilisée d'ailleurs, l'injection de 6-OHDA est faite de façon unilatérale dans le MFB chez le rat, qu'on dénomme conséquemment «rat hémiparkinsonien». Ainsi, chaque animal peut servir d'autocontrôle tant au niveau des analyses comportementales que biochimiques puisque seulement un des deux hémisphères est affecté par la toxine (Ungerstedt, 1968). On base l'efficacité de cette toxine sur la baisse du niveau de dopamine au sein du striatum, la mort des neurones produisant la dopamine dans la SNc ainsi que sur l'apparition de déficits moteurs. On mesure les deux premiers paramètres en utilisant l'enzyme TH dont les niveaux sont proportionnels à la quantité de dopamine présente ou produite. La 6-OHDA n'induit pas la production de corps de Lewy et n'a aucune interaction avec l'α-synucléine (Blandini *et al.*, 2008).

Le rat lésé à la 6-OHDA est l'un des modèles les plus couramment utilisés afin d'étudier les mécanismes physiopathologiques de la maladie de Parkinson. Un des précieux avantages de ce modèle est la possibilité d'analyser les mouvements anormaux involontaires (dyskinésies) associés à l'utilisation prolongée de L-DOPA (Winkler *et al.*, 2002, Lebel *et al.*, 2010, Chagniel *et al.*, 2012b). Suite à l'injection unilatérale de 6-OHDA, il existe des méthodes d'évaluation de la capacité motrice des animaux utilisés afin de contrôler la qualité du modèle. Dans la présente étude, j'ai corroboré l'émergence de la dégénérescence de la voie nigrostriée conséquente à l'injection de 6-OHDA en utilisant l'injection d'apomorphine et sa réponse de rotation controlatérale de

même que la quantification de l'utilisation asymétrique des pattes antérieures dans le test du cylindre. Seuls les animaux démontrant un haut niveau de démarche rotative en réponse à l'apomorphine (>5 tours/min) ainsi qu'un haut degré de négligence de la patte antérieure controlatérale à la lésion ($>60\%$ d'asymétrie) ont été inclus dans les groupes expérimentaux de l'étude. En accord avec des études précédentes (Deumens *et al.*, 2002, Chagniel *et al.*, 2012b), j'ai ensuite observé la dramatique diminution du nombre de neurones TH-immunoréactifs dans la SNc, allant jusqu'à une baisse de 95%, chez les animaux qui répondent sévèrement à l'apomorphine.

5.2 Les neurones TH-ir dans le striatum du rat lésé à la 6-OHDA et traité à la L-DOPA

Cette nouvelle étude que j'ai menée durant ma maîtrise permet de soulever la possibilité de hausser les niveaux de TH dans le striatum. Classiquement, on reconnaît l'expression de la TH par les neurones dopaminergiques du VTA et de la SNc mais une petite population neuronale du striatum mérite de retenir notre attention à ce sujet. Les neurones TH-ir ont été décrits dans la littérature scientifique comme étant un type de neurones distincts des neurones classiques et ont été observés dans le striatum d'espèces adultes de rongeurs, de primates et d'humains (Dubach *et al.*, 1987, Tashiro *et al.*, 1989, Betarbet *et al.*, 1997, Cossette *et al.*, 2005b). Fait intéressant, ce type de neurones est retrouvé de façon plus abondante dans les cerveaux d'humains atteints de la MP (Porritt *et al.*, 2000) et dans les cerveaux des animaux modèles, dont la voie nigrostriée est fortement réduite en dopamine, tant bien chez les rongeurs que chez les primates (Betarbet *et al.*, 1997, Lopez-Real *et al.*, 2003, Tande *et al.*, 2006, Huot et Parent, 2007, Darmopil *et al.*, 2008). Dans un autre ordre d'idées, une étude a soulevé la réduction du nombre de neurones TH-ir dans le striatum de patients atteints de la chorée de Huntington, situation pathologique où la dopamine est retrouvée en quantité plus abondante (Huot et Parent, 2007). Dans un contexte parkinsonien, l'ajout d'un traitement à la L-DOPA semble pouvoir être associé à l'augmentation du nombre de neurones exprimant la TH dans le striatum de rats et de souris lésés à la 6-OHDA. (Jollivet *et al.*, 2004, Darmopil *et al.*, 2008, Espadas *et al.*, 2012). Ces avancements

démontrent que l'expression neuronale de TH dans le striatum suite à une lésion dopaminergique ne peut être maintenue sans une innervation résiduelle par la SNC ou par une stimulation dopaminergique supplémentaire telle qu'obtenue par la L-DOPA. L'expression de TH par des neurones du striatum semble être régulée par la concentration locale en dopamine.

Chez le rat hé miparkinsonien recevant un traitement à la L-DOPA, la caractérisation par immunofluorescence que j'ai réalisée durant mes travaux de recherche de maîtrise a permis de démontrer que la totalité des neurones TH-ir expriment également le marqueur neuronal NeuN et que, par le fait même, 72,9% d'entre eux colocalisent aussi avec la calbindine, un marqueur des neurones de projection du striatum. Un peu plus de 20% (21,3%) des neurones TH-ir expriment ChAT, un marqueur des interneurones cholinergiques. De plus, aucun des neurones TH-ir analysé ne s'est avéré positif pour DCX, un marqueur de précurseurs de cellules neuronales en migration, de même que pour GFAP, une protéine exprimée par les astrocytes. Ces résultats indiquent que les neurones TH-ir du striatum des rats 6-OHDA/L-DOPA dérivent en majeure partie des neurones de projection du striatum et à une moindre mesure, d'un type d'interneurones.

Ces observations soulèvent l'hypothèse qu'un environnement dépourvu d'une quantité normale de dopamine peut stimuler une transformation dans l'expression phénotypique des neurones préexistants mais n'induit pas la formation de nouveaux neurones à partir de NSC. Ces résultats vont dans le même sens que des observations faites chez d'autres rongeurs qui indiquent que les neurones TH-ir sont en majorité des neurones de projection (Darmopil *et al.*, 2008, Masuda *et al.*, 2011, Espadas *et al.*, 2012). En effet, il semblerait que les neurones TH-ir colocalisent avec la dynorphine et l'enképhaline qui caractérisent respectivement, rappelons-le, les neurones des voies de projection directe et indirecte (Darmopil *et al.*, 2008, Masuda *et al.*, 2011). Ces mêmes neurones expriment également la protéine DARPP-32, qui est exprimée sans distinction par tous les neurones de projection. De plus, il semblerait que les récepteurs D1 soient essentiels pour l'apparition des neurones TH-ir stimulée par la L-DOPA alors que ce

n'est pas le cas pour les récepteurs D2 (Espadas *et al.*, 2012). En effet, le nombre de neurones TH-ir du striatum est atténué chez les souris hémiparkinsoniennes *knockout* pour le récepteur D1 alors qu'il n'y a pas de différence chez celles qui sont *knockout* pour le récepteur D2. L'expression de la TH par les neurones de projection du striatum suggère qu'ils sont en mesure, dans un contexte particulier, d'exprimer les enzymes nécessaires à la production de la dopamine. La caractérisation des neurones TH-ir chez l'humain parkinsonien (Porritt *et al.*, 2000, Cossette *et al.*, 2005a) et le primate (Palfi *et al.*, 2002, Tande *et al.*, 2006) révèle la nature dopaminergique de ces cellules, puisqu'elles expriment le transporteur de la dopamine DAT et le récepteur nucléaire Nurr1, à qui on attribue le maintien du phénotype dopaminergique dans le cerveau. Plus encore, des études de l'activité fonctionnelle de ces neurones révèlent que leur profil électrophysiologique est similaire aux interneurones GABAergiques (Ibanez-Sandoval *et al.*, 2010) et qu'ils expriment le facteur de transcription FosB en réponse au traitement à la L-DOPA (Darmopil *et al.*, 2008). Les neurones TH-ir induits par le traitement à la L-DOPA dans le striatum parkinsonien semblent donc s'intégrer à l'architecture neuronale du striatum bien qu'on ne puisse actuellement leur attribuer une fonction physiologique précise.

Une portion des neurones TH-ir observés dans le striatum des rats hémiparkinsoniens traités à la L-DOPA (21,3%) expriment également l'enzyme ChAT, ce qui les identifie comme étant des interneurones cholinergiques. Ces neurones ont un profil plus grand que les neurones TH-ir correspondants aux neurones de projection et ne portent pas de multiples épines dendritiques comme ceux-ci. À ce jour, aucune étude n'a encore identifié les interneurones cholinergiques du striatum comme étant une source de neurones TH-ir dans les différents modèles parkinsoniens. En soit, l'identification formelle des neurones TH-ir du striatum se veut controversée. Des auteurs soutiennent qu'ils dérivent des neurones de projection, tout comme il a été discuté précédemment, alors que d'autres affirment qu'ils prennent origine des interneurones du striatum. Ainsi, quelques études ont permis de cibler une infime population de neurones TH-ir (1%) qui coexpriment le phénotype des interneurones GABAergiques positifs pour la calrétinine tant chez la souris lésée à la 6-OHDA que chez le primate lésé au MPTP

(Tande *et al.*, 2006, Darmopil *et al.*, 2008). Dans le striatum humain, il a été démontré qu'une plus grande proportion (30%) des neurones TH-ir expriment la calrétinine (Cossette *et al.*, 2005b). Betarbet *et al.* (1997) rapporte que 99% des neurones TH-ir retrouvés dans le striatum de primates sont négatifs pour la CB, sans épines dendritiques et positifs pour GAD67, une enzyme clé de la production du GABA qui identifie non-spécifiquement les neurones de projection et les interneurones GABAergiques. Par contre, ils n'ont pas poussé la caractérisation plus loin afin de déterminer à quel type d'interneurones les neurones TH-ir correspondent. Récemment, une équipe de chercheurs a utilisé le modèle de souris transgénique eGFP-TH BAC (de l'anglais *enhanced green fluorescent protein-TH, bacterial artificial chromosome*) afin de caractériser les neurones TH-ir du striatum normal. En se basant sur des caractéristiques morphologiques et électrophysiologiques, ils ont conclu que les neurones TH-ir du striatum partagent les caractéristiques des interneurones GABAergiques. Par contre, l'absence de l'expression de marqueurs des différents types d'interneurones classiques laisse présager qu'il s'agit d'un nouveau type d'interneurones exprimant TH (Ibanez-Sandoval *et al.*, 2010).

5.3 L'inhibition des calpaïnes favorise la formation de neurones TH-ir dans le striatum chez le rat hémiparkinsonien traité à la L-DOPA

La présente étude permet de démontrer qu'une infusion intrastriatale chronique de MDL28170, un inhibiteur des calpaïnes, chez le rat lésé à la 6-OHDA et traité à la L-DOPA favorise fortement l'apparition de neurones TH-ir dans la région cérébrale avoisinant le site d'infusion. Il s'agit de la première étude à identifier les calpaïnes comme une cible moléculaire dont la modulation permet de stimuler la formation de neurones dopaminergiques à l'intérieur du striatum. D'autres études ont précédemment démontré que le traitement avec le GDNF dans le modèle de primate MPTP et avec le facteur de croissance des nerfs (NGF) dans le modèle de rat 6-OHDA augmentent le nombre de neurones TH-ir (Palfi *et al.*, 2002, Jollivet *et al.*, 2004). D'un autre côté, une étude rapporte que l'administration du *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) stimule la formation de nouveaux neurones à partir de NSC mais elle ne permet pas

d'affirmer que ces neurones développent un phénotype TH-ir (Bedard *et al.*, 2006). Malheureusement, aucune de ces études n'a poussé plus loin la caractérisation des neurones TH-ir. Il n'est donc pas possible d'additionner ces informations pour conclure que des facteurs neurotrophiques peuvent engendrer le développement des NSC et favoriser leur différenciation vers le phénotype dopaminergique ou encore engendrer un changement phénotypique chez des neurones matures.

L'étude que j'ai réalisée permet de démontrer qu'à la suite d'un traitement de MDL28170, 70,8% des neurones TH-ir sont également identifiés par le marqueur neuronal NeuN alors que 5,1% d'entre eux expriment l'enzyme ChAT. Une population négligeable (0,9%) de neurones TH-ir exprime la CB. L'inhibition locale des calpaïnes permet donc de moduler l'apparition des neurones TH-ir, tant au niveau du nombre qu'au niveau du type cellulaire dont ils sont issus. C'est une population distincte de neurones TH-ir recrutée par ce traitement retient particulièrement notre attention. En effet, le MDL28170 stimule l'apparition de neurones TH-ir également positifs pour DCX (38,0%) alors que ce phénomène est absent lorsque la L-DOPA est administrée seule. Ces résultats signifient qu'une petite proportion des interneurones cholinergiques du striatum peut exprimer TH dans des conditions particulières et cette observation peut être associée au traitement à la L-DOPA comme il a été discuté plus haut. De plus, il semble que l'infusion de MDL28170 chez le rat lésé à la 6-OHDA et traité à la L-DOPA permet de stimuler la migration de cellules neuronales immatures.

La DCX est une protéine associée aux microtubules qui est exprimée fortement par les neurones en processus de migration tout au long du développement du système nerveux central. Expérimentalement, les neurones DCX-ir incorporent BrdU et expriment TuJ1, respectivement des marqueurs de prolifération et de différenciation cellulaire et se retrouvent dans le faisceau migratoire de la zone subventriculaire, ce qui suggère que DCX est un bon marqueur moléculaire pour cibler les neurones en migration nouvellement formés dans le cerveau (Gleeson *et al.*, 1999). Par contre, DCX est exprimée de façon transitoire dans ces cellules. Lors de leur maturation, elles

commencent à exprimer des marqueurs neuronaux et le niveau d'expression de DCX décroît jusqu'à devenir indétectable (Brown *et al.*, 2003).

Plusieurs études ont mis en évidence l'implication des calpaïnes dans des mécanismes de différenciation cellulaire. Il a été démontré que les calpaïnes jouent un rôle important dans le contrôle de la morphogénèse neuronale en régulant la capacité de croissance des neurites. En effet, l'inhibition des calpaïnes augmente la quantité de fibres nerveuses exprimant GAP43, une protéine impliquée dans la croissance axonale ainsi que les niveaux de cortactine, dont le rôle dans la régulation de la migration cellulaire est bien connu (Mingorance-Le Meur et O'Connor, 2009). L'activité des calpaïnes est modulée durant la différenciation neuronale des cellules PC12 (Oshima *et al.*, 1989, Pinter *et al.*, 1994). Plus encore, des études ont démontré l'implication des calpaïnes dans les mécanismes de différenciation cellulaire des cellules souches mésenchymales (Yajima et Kawashima, 2002), des cellules souches embryonnaires (de Azevedo-Pereira *et al.*, 2011) et des cellules souches neuronales (Santos *et al.*, 2012). En effet, cette récente étude suggère que l'activité de la calpaïne I réprime la différenciation neuronale alors que la calpaïne II stimule la différenciation gliale de ces cellules souches. Dans la présente étude, il n'a pas été concrètement démontré que l'inhibition des calpaïnes stimule la prolifération des cellules mitotiques de la SVZ mais il faut souligner le fait que les neurones TH-ir générés suite à un traitement local avec le MDL28170 semblent dériver de neurones nouvellement formés en migration. Des études plus avancées seraient nécessaires afin de caractériser l'implication exacte des calpaïnes dans la neurogénèse et la différenciation des NSC en neurones dopaminergiques.

Dans le cerveau adulte, les NSC prennent naissance dans deux principales régions connues: la zone subgranulaire du gyrus denté de l'hippocampe et la SVZ, laquelle est située sur la face latérale de chacun des ventricules latéraux. La SVZ est composée de cinq types cellulaires: les cellules épendymaires (type E), les astrocytes B1 et B2, les *transit amplifying progenitor cells* (type C) ainsi que les neuroblastes (type A). Les cellules B1 sont des NSC en quiescence qui ont la possibilité de faire une division cellulaire asymétrique pour donner naissance aux cellules C. Elles sont en contact avec

les vaisseaux sanguins qui nourrissent la SVZ de même qu'avec le liquide céphalorachidien. Quant à elles, les cellules C sont à l'origine des neuroblastes et des précurseurs cellulaires des oligodendrocytes. Les neuroblastes ont la propriété de quitter la SVZ en empruntant un courant migratoire vers le bulbe olfactif. Les cellules E et les cellules B2 sont responsables de la régulation de l'environnement cellulaire de ces niches neurogéniques. Il est difficile de classifier les cellules de la SVZ selon l'expression unique de marqueurs cellulaires. Il s'agit plutôt d'un continuum; les cellules expriment transitoirement une combinaison de marqueurs à mesure qu'ils gagnent ou perdent des fonctions cellulaires durant leur maturation. Ainsi, la DCX est davantage exprimée par les neuroblastes en migration qui quittent la SVZ alors que NeuN est exprimé par les cellules souches post-mitotiques qui ont mûri vers le phénotype neuronal (Fuentealba *et al.*, 2012, Mamber *et al.*, 2013).

La capacité du cerveau adulte à produire de nouveaux neurones a reçu un premier témoignage il y a une quarantaine d'années lorsque Joseph Altman et son équipe ont décrit pour la première fois la neurogénèse post-natale chez le rongeur. Ils ont décrit l'existence d'une prolifération de neurones dans la SVZ suivant un trajet jusqu'au bulbe olfactif. Plus tard, d'autres chercheurs ont démontré que la discrimination de nouvelles odeurs nécessite cette formation de nouveaux neurones dans le bulbe olfactif chez la souris (Gheusi *et al.*, 2000). Cette prémissse suggère que des nouveaux neurones formés dans le cerveau adulte peuvent s'intégrer aux circuits neuronaux déjà établis et devenir fonctionnellement actifs.

Bien que la neurogénèse dans le cerveau adulte soit extrêmement limitée dans des conditions normales, il a été démontré qu'elle est modulée en réponse à des traumatismes crâniens pour pallier aux neurones endommagés et promouvoir la guérison (Jin *et al.*, 2006). Toutefois, une altération de la neurogénèse peut contribuer au déclin des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Li *et al.*, 2008) et la maladie de Parkinson (Hoglinger *et al.*, 2004). Parmi les récentes avenues de recherche sur ces maladies neurodégénératives, un intérêt particulier a été porté autour de la promotion du recrutement et de la différenciation des NSC endogènes afin de remplacer

les neurones perdus (Romanko *et al.*, 2004). La transplantation de cellules souches représente également une solution permanente pour remplacer les cellules dégénérées mais il semblerait que le taux de survie cellulaire et de différenciation neuronale post-transplantation soit très mince (Bakshi *et al.*, 2005, Hodges *et al.*, 2007). La greffe d'un corps étranger nécessite également un traitement immunosupresseur et cela n'exclut pas la possibilité que le greffon soit rejeté par l'hôte à un moment ou à un autre. De plus, la différenciation neuronale, le maintien de cet état différencié ainsi que l'établissement de nouvelles connexions synaptiques dans le réseau neuronal déjà existant représentent un défi supplémentaire pour ce greffon de cellules souches.

Cliniquement, les inhibiteurs de calpaïnes sont utilisés dans le traitement de plusieurs maladies et ce, depuis plusieurs années. Il a été démontré chez la souris qu'une restriction de l'activité des calpaïnes améliore les symptômes de la dystrophie musculaire (Roudaut *et al.*, 2013). Également, des inhibiteurs de calpaïnes ont une activité éprouvée dans l'amélioration des fonctions cognitives des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Granic *et al.*, 2010, Getz, 2012). Dans un aspect tout autre que le traitement des maladies neurodégénératives, il a été démontré que le traitement de certains cancers par des inhibiteurs de calpaïnes limite la croissance tumorale (Mataga *et al.*, 2012, Escalante *et al.*, 2013).

Étant donné la nature ubiquitaire des calpaïnes, il est de mise d'étudier les effets que l'administration d'un inhibiteur peut avoir sur l'ensemble des tissus du corps humain. L'utilisation d'un inhibiteur sélectif pour les calpaïnes I et II, qui sont majoritairement présentes au niveau du cerveau, pourrait s'avérer préférable afin de favoriser l'apparition des neurones TH-ir du striatum dans le contexte de la MP et du traitement à la L-DOPA tout en limitant les effets sur les calpaïnes au niveau périphérique. Il est également nécessaire de mieux comprendre les multiples processus de régulation influençant l'activité des différentes isoformes des calpaïnes, autant lors de processus physiologiques et lors de dérèglements pathologiques.

5.4 Conclusion et perspectives d'avenir

Le rôle des neurones TH-ir au sein du striatum demeure incertain. Ils sont recrutés lorsque le striatum est de moins en moins innervé par les neurones dopaminergiques et il pourrait sembler qu'ils compensent pour cette perte. Précédemment, notre équipe de recherche a démontré que l'inhibition intrastriatale des calpaines par le MDL28170 résulte en une augmentation de 30% du niveau de TH dans le striatum, ce qui semble suffisant pour freiner l'émergence des dyskinésies induites par la L-DOPA (Chagniel *et al.*, 2012b). La présente étude démontre que cette augmentation de TH dans le striatum est due à la formation de neurones exprimant TH. L'inhibition des calpaines peut stimuler la migration et la différenciation des NSC en neurones potentiellement dopaminergiques. En additionnant ces informations, il est vraisemblable de proposer que ces neurones TH-ir sont fonctionnellement efficaces afin de contrecarrer aux dyskinésies induites par l'administration chronique de L-DOPA. La nouvelle approche neuroregénérative serait alors au service du traitement classique à la L-DOPA afin d'en atténuer les effets indésirables jusqu'ici inévitables.

En plus des cerveaux post-mortem de patients parkinsoniens, les neurones TH-ir ont été étudiés dans le striatum de primates intoxiqués au MPTP, des rats et des souris lésés à la 6-OHDA mais aucune étude ne rapporte de neurones TH-ir chez la souris MPTP. L'injection unilatérale de 6-OHDA dans le cerveau des rongeurs permet d'obtenir une forte lésion dopaminergique dans un seul hémisphère cérébral, facilitant la survie des animaux. Il est plus difficile d'obtenir une lésion aussi marquée en injectant le MPTP de façon systémique. Une étude préliminaire que j'ai réalisée pendant ma maîtrise a permis de valider pour la première fois l'existence des neurones TH-ir dans le striatum des souris lésées au MPTP. La méthodologie employée pour réaliser ces expérimentations est détaillée à l'annexe A. La Figure 5.1 démontre l'intensité de la lésion dopaminergique induite par le traitement aigu de MPTP, à la fois par une quantification des fibres nerveuses immunoréactives pour TH et DAT dans le striatum ainsi que par l'estimation de la densité cellulaire des neurones TH-ir et DAT-ir de la SNc.

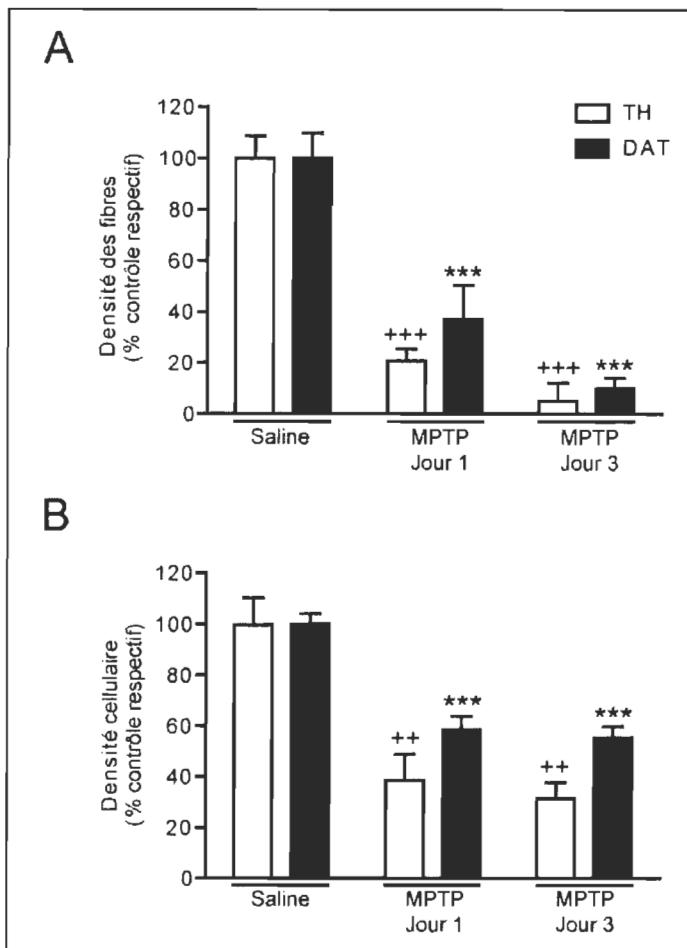


Figure 5.1 Mesure de l'intensité de la mort cellulaire induite par le MPTP.
 En A, mesure semiquantitative des fibres dopaminergiques du striatum. Les données, exprimées en pourcentage par rapport à la moyenne du groupe contrôle saline, représentent la moyenne des mesures de densité relative des fibres TH-ir et DAT-ir \pm SEM; n=4-6 souris/groupe; +++, ***p<0.0001 vs groupe contrôle saline. En B, densité cellulaire des neurones dopaminergiques de la SNc. Les données, exprimées en pourcentage par rapport à la moyenne du groupe contrôle saline, représentent le nombre moyen de neurones TH-ir et DAT-ir par mm^3 \pm SEM; n=4-6 souris/groupe; ++p<0.001, ***p<0.0001 vs groupe contrôle saline.

Quant à elle, la Figure 5.2 montre la densité cellulaire des neurones TH-ir du striatum au jour 1 et au jour 3 suivant le traitement aigu de MPTP. La présence des neurones TH-ir n'est décelable chez la souris saine ou dans les heures suivant la lésion aiguë par le MPTP mais survient rapidement dans les jours qui suivent.

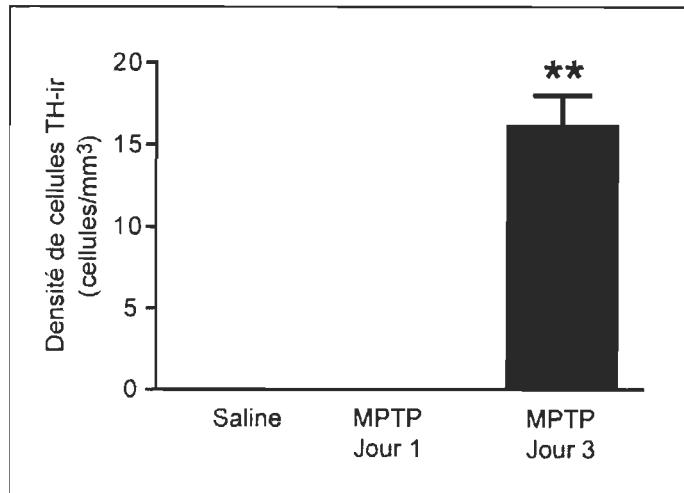


Figure 5.2 Décompte des neurones TH-ir du striatum chez la souris MPTP.
 Densité cellulaire des cellules TH-ir du striatum au jour 1 et au jour 3 suivant le traitement aigu de MPTP. Les données représentent le nombre moyen de neurones TH-ir par $\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$; $n=4-6$ souris/groupe; ** $p<0.001$ vs groupe contrôle saline.

Cette découverte permet donc d'avoir un modèle d'étude beaucoup plus simple à réaliser que le rat 6-OHDA afin de poursuivre la caractérisation des neurones TH-ir du striatum induits par l'inhibition intrastriatale des calpaïnes. Par exemple, il serait intéressant d'utiliser la BrdU afin de valider l'hypothèse de la synthèse de nouveaux neurones capables d'adopter un phénotype dopaminergique déterminé par l'inhibition des calpaïnes dans ce microenvironnement parkinsonien.

Globalement, les travaux de recherche que j'ai réalisés pendant ma maîtrise s'inscrivent dans la nouvelle tendance de recherche sur la MP. En effet, les plus récentes études mettent de l'avant la neurogénèse et la transplantation de cellules souches comme astuce de traitement des symptômes cette maladie incurable. Bien que mes travaux restent à un niveau très fondamental, ils permettent d'émettre l'hypothèse que de nouveaux neurones générés à partir de cellules souches endogènes puissent s'intégrer à la complexité des réseaux neuronaux du cerveau humain et y exercer un rôle bénéfique en soutien aux traitements traditionnels de la maladie de Parkinson.

ANNEXE A

MÉTHODOLOGIE COMPLÉMENTAIRE

Le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) est une neurotoxine qui provoque les symptômes permanents de la MP en détruisant les neurones dopaminergiques de la SNc. Cette molécule est un analogue de synthèse du 1-méthyl-4-phényl-4-propionoxypiperidine (méperidine, MPPP), un opioïde de synthèse consommé par des toxicomanes. La neurotoxicité du MPTP a d'ailleurs été découverte dans les années 1970 chez ces personnes qui avaient développé un syndrome parkinsonien idiopathique suite à la consommation illicite de MPPP contaminé par un processus de synthèse erroné (Langston et Ballard, 1983, Langston *et al.*, 1999). Aujourd'hui, le MPTP est la toxine la plus utilisée en laboratoire pour créer les symptômes parkinsoniens chez le primate et les rongeurs. Le MPTP est une molécule liposoluble, elle traverse la BHE et atteint donc facilement le cerveau suite à une administration systémique. Elle est rapidement transformée en métabolite actif, le MPP+, par la monoamine oxydase B des astrocytes, molécule qui peut alors pénétrer les neurones dopaminergiques par le DAT. Cette propriété en fait une toxine dopaminergique très sélective. Une fois à l'intérieur du neurone dopaminergique, le MPP+ cible la mitochondrie où il interfère avec le complexe I de la chaîne respiratoire et favorise la production d'espèces réactives de l'oxygène, ce qui entraîne la mort cellulaire (Bossy-Wetzel *et al.*, 2004).

Afin de déterminer dans quelle mesure la neurotoxine MPTP peut induire la formation de neurones TH-ir dans le striatum chez la souris, j'ai utilisé 16 souris mâles de la lignée C57bl/6j âgées de 12 semaines (Charles River Laboratories, St-Constant, QC, Canada). Toutes les expérimentations ont été approuvées par le Comité de Bons Soins aux Animaux de l'Université du Québec à Trois-Rivières et sont en accord avec les standards éthiques du Conseil Canadien de Protection des Animaux.

Le groupe contrôle constitué de 4 souris a reçu des injections intrapéritonéales de saline tandis que les groupes MPTP (2 groupes de 6 souris) ont reçu un traitement aigu, soit 4 injections de MPTP (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) à une dose de 20 mg/kg à toutes les 2h en une seule journée. Les souris ont reçu un traitement de support afin de diminuer leur inconfort. Les animaux ont donc reçu des injections de lactate de Ringer avant celles de MPTP et on a augmenté la température ambiante de la pièce en plus de les exposer à des sources de chaleur. Une cohorte de souris a été sacrifiée 24h après les injections de MPTP (J1) alors que les autres ont été sacrifiées 3 jours après le début des injections (J3). Les souris ont été perfusées avec du paraformaldéhyde 4% et les cerveaux fixés ont été prélevés, congelés et coupés au cryostat afin d'utiliser la technique d'immunofluorescence pour évaluer le degré de dénervation dopaminergique induit par le MPTP ainsi que pour étudier les neurones TH-ir du striatum.

Le marquage des protéines TH et DAT par immunofluorescence a été fait sur des coupes coronales de cerveau de 60 µm d'épaisseur obtenues à l'aide d'un cryostat (Leica CM3050S, Leica, Richmond Hill, Ontario, Canada). J'ai utilisé les tranches contenant le striatum et la SNc, correspondant respectivement aux sections comprises entre +1,18 mm et +0,18 mm et entre -2,60 mm et -3,80 mm du bregma. Les tranches ont été prises en alternance sur 3 séries de sorte qu'il y ait 3 échantillons équivalents de chaque structure pour tous les animaux. Brièvement, la technique consiste à incuber les coupes dans une solution de perméabilisation (1,2% triton/PBS 1X) afin de faciliter la pénétration des anticorps dans les cellules. La seconde incubation est dans une solution de blocage constituée de *Normal Goat Serum* (10% NGS/PBS 1X, Jackson ImmunoResearch Laboratories). Cela permet de réduire les liaisons des anticorps sur des épitopes non-spécifiques. Ensuite, les échantillons sont incubés à 4°C pendant une vingtaine d'heures dans une solution d'anticorps primaire, soit le *mouse anti-tyrosine hydroxylase* (MAB318, Millipore) ou le *rat anti-dopamine transporter* (MAB369, Millipore) dilués respectivement 1:1000 et 1:500 dans un mélange 0,3% triton/2% NGS/PBS 1X. L'incubation avec l'anticorps secondaire se fait à température de la pièce et dans le même type de solution contenant soit le *goat anti-mouse* ou le *goat anti-rat* couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et dilués 1:500, à l'abri de la lumière. Les noyaux des cellules sont marqués avec le Hoechst 33342 (Invitrogen) dilué 1:10000 dans du PBS 1X.

Les coupes sont finalement montées sur les lames *SuperFrost* avec le milieu de montage *Vectashield* pour prévenir les coupes de la déshydratation et préserver la fluorescence. Les lames ont ensuite été conservées à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation.

L'intensité de la dénervation dopaminergique induite par le traitement de MPTP se mesure en quantifiant les fibres neuronales dopaminergiques présentes dans le striatum ainsi qu'en dénombrant les neurones dopaminergiques dans la SNC. Pour ce faire, on utilise les protéines TH et DAT comme marqueurs des neurones dopaminergiques et la somme des résultats donne un excellent aperçu de l'état de la voie nigrostriée.

Pour quantifier la présence des fibres dopaminergiques dans le striatum, j'ai comparé l'intensité optique de la fluorescence entre le striatum des animaux contrôle et de ceux qui ont reçu le MPTP. Pour réaliser cette analyse, j'ai capturé des images du striatum avec l'objectif 2X puis j'ai utilisé le logiciel IPLab 3.0.6 (Scanalytics, Fairfax, VA, USA) pour délimiter la structure anatomique et pour quantifier l'intensité de la fluorescence (densité relative). Les résultats de la mesure de densité relative sont exprimés en pourcentage de fibres dopaminergiques pour chacun des groupe de souris MPTP à différent temps post-injection par rapport au groupe contrôle respectif.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Agid Y, Blin J (1987) Nerve cell death in degenerative diseases of the central nervous system: clinical aspects. Ciba Foundation symposium 126:3-29.

Ahlskog JE, Muentner MD (2001) Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 16:448-458.

Alexander GE, Crutcher MD, DeLong MR (1990) Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. Progress in brain research 85:119-146.

Alvira D, Ferrer I, Gutierrez-Cuesta J, Garcia-Castro B, Pallas M, Camins A (2008) Activation of the calpain/cdk5/p25 pathway in the girus cinguli in Parkinson's disease. Parkinsonism & Related Disorders 14:309-313.

Bakshi A, Keck CA, Koshkin VS, LeBold DG, Siman R, Snyder EY, McIntosh TK (2005) Caspase-mediated cell death predominates following engraftment of neural progenitor cells into traumatically injured rat brain. Brain research 1065:8-19.

Baudry M, Chou MM, Bi X (2013) Targeting calpain in synaptic plasticity. Expert opinion on therapeutic targets 17:579-592.

Bedard A, Gravel C, Parent A (2006) Chemical characterization of newly generated neurons in the striatum of adult primates. Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung Experimentation cerebrale 170:501-512.

Betarbet R, Turner R, Chockkan V, DeLong MR, Allers KA, Walters J, Levey AI, Greenamyre JT (1997) Dopaminergic neurons intrinsic to the primate striatum. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 17:6761-6768.

Blandini F, Armentero M-T, Martignoni E (2008) The 6-hydroxydopamine model: News from the past. Parkinsonism & Related Disorders 14:S124-S129.

Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V, Przedborski S (2012) Classic and new animal models of Parkinson's disease. Journal of biomedicine & biotechnology 2012:845618.

Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA (2004) Molecular pathways to neurodegeneration. Nature medicine 10 Suppl:S2-9.

Brown JP, Couillard-Despres S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG (2003) Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *The Journal of comparative neurology* 467:1-10.

Burch D, Sheerin F (2005) Parkinson's disease. *Lancet* 365:622-627.

Camins A, Verdaguer E, Folch J, Pallas M (2006) Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes. *CNS drug reviews* 12:135-148.

Cenci MA (2007) Dopamine dysregulation of movement control in L-DOPA-induced dyskinesia. *Trends in neurosciences* 30:236-243.

Chagniel L, Robitaille C, Lacharite-Mueller C, Bureau G, Cyr M (2012a) Partial dopamine depletion in MPTP-treated mice differentially altered motor skill learning and action control. *Behavioural brain research* 228:9-15.

Chagniel L, Robitaille C, Lebel M, Cyr M (2012b) Striatal inhibition of calpains prevents levodopa-induced neurochemical changes and abnormal involuntary movements in the hemiparkinsonian rat model. *Neurobiology Of Disease* 45:645-655.

Chan CS, Gertler TS, Surmeier DJ (2009) Calcium homeostasis, selective vulnerability and Parkinson's disease. *Trends in neurosciences* 32:249-256.

Chan CS, Glajch KE, Gertler TS, Guzman JN, Mercer JN, Lewis AS, Goldberg AB, Tkatch T, Shigemoto R, Fleming SM, Chetkovich DM, Osten P, Kita H, Surmeier DJ (2011) HCN channelopathy in external globus pallidus neurons in models of Parkinson's disease. *Nature neuroscience* 14:85-92.

Chang HT, Wilson CJ, Kitai ST (1982) A Golgi study of rat neostriatal neurons: light microscopic analysis. *The Journal of comparative neurology* 208:107-126.

Chen MJ, Yap YW, Choy MS, Koh CH, Seet SJ, Duan W, Whiteman M, Cheung NS (2006) Early induction of calpains in rotenone-mediated neuronal apoptosis. *Neuroscience letters* 397:69-73.

Cookson MR (2003) Pathways to Parkinsonism. *Neuron* 37:7-10.

Cossette M, Lecomte F, Parent A (2005a) Morphology and distribution of dopaminergic neurons intrinsic to the human striatum. *Journal of chemical neuroanatomy* 29:1-11.

Cossette M, Levesque D, Parent A (2005b) Neurochemical characterization of dopaminergic neurons in human striatum. *Parkinsonism & Related Disorders* 11:277-286.

Cossette M, Levesque M, Parent A (1999) Extrastriatal dopaminergic innervation of human basal ganglia. *Neuroscience research* 34:51-54.

Crocker SJ, Smith PD, Jackson-Lewis V, Lamba WR, Hayley SP, Grimm E, Callaghan SM, Slack RS, Melloni E, Przedborski S, Robertson GS, Anisman H, Merali Z, Park DS (2003) Inhibition of calpains prevents neuronal and behavioral deficits in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:4081-4091.

Darmopil S, Muneton-Gomez VC, de Ceballos ML, Bernson M, Moratalla R (2008) Tyrosine hydroxylase cells appearing in the mouse striatum after dopamine denervation are likely to be projection neurones regulated by L-DOPA. *The European journal of neuroscience* 27:580-592.

de Azevedo-Pereira RL, Lima AP, Rodrigues Dde C, Rondinelli E, Medei EH, Goldenberg RC, de Carvalho AC, Mendez-Otero R (2011) Cysteine proteases in differentiation of embryonic stem cells into neural cells. *Stem cells and development* 20:1859-1872.

DeLong MR (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in neurosciences* 13:281-285.

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

DiFiglia M, Pasik P, Pasik T (1976) A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain research* 114:245-256.

Dubach M, Schmidt R, Kunkel D, Bowden DM, Martin R, German DC (1987) Primate neostriatal neurons containing tyrosine hydroxylase: immunohistochemical evidence. *Neuroscience letters* 75:205-210.

Enciu AM, Nicolescu MI, Manole CG, Muresanu DF, Popescu LM, Popescu BO (2011) Neuroregeneration in neurodegenerative disorders. *BMC neurology* 11:75.

Escalante AM, McGrath RT, Karolak MR, Dorr RT, Lynch RM, Landowski TH (2013) Preventing the autophagic survival response by inhibition of calpain enhances the cytotoxic activity of bortezomib in vitro and in vivo. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 71:1567-1576.

Espadas I, Darmopil S, Vergano-Vera E, Ortiz O, Oliva I, Vicario-Abejon C, Martin ED, Moratalla R (2012) L-DOPA-induced increase in TH-immunoreactive striatal neurons in parkinsonian mice: insights into regulation and function. *Neurobiology Of Disease* 48:271-281.

Fearnley JM, Lees AJ (1990) Striatonigral degeneration. A clinicopathological study. *Brain : a journal of neurology* 113 (Pt 6):1823-1842.

Franco SJ, Huttenlocher A (2005) Regulating cell migration: calpains make the cut. *Journal of cell science* 118:3829-3838.

Fuentealba LC, Obernier K, Alvarez-Buylla A (2012) Adult neural stem cells bridge their niche. *Cell stem cell* 10:698-708.

Getz GS (2012) Calpain inhibition as a potential treatment of Alzheimer's disease. *The American journal of pathology* 181:388-391.

Gheusi G, Cremer H, McLean H, Chazal G, Vincent JD, Lledo PM (2000) Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:1823-1828.

Gil-Parrado S, Fernandez-Montalvan A, Assfalg-Machleidt I, Popp O, Bestvater F, Holloschi A, Knoch TA, Auerswald EA, Welsh K, Reed JC, Fritz H, Fuentes-Prior P, Spiess E, Salvesen GS, Machleidt W (2002) Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members. *The Journal of biological chemistry* 277:27217-27226.

Glading A, Lauffenburger DA, Wells A (2002) Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends in cell biology* 12:46-54.

Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA (1999) Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 23:257-271.

Glinka Y, Gassen M, Youdim MB (1997) Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *Journal of neural transmission Supplementum* 50:55-66.

Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J (2003) The calpain system. *Physiological reviews* 83:731-801.

Granic I, Nyakas C, Luiten PG, Eisel UL, Halmy LG, Gross G, Schoemaker H, Moller A, Nimmrich V (2010) Calpain inhibition prevents amyloid-beta-induced neurodegeneration and associated behavioral dysfunction in rats. *Neuropharmacology* 59:334-342.

Grant RJ, Sellings LH, Crocker SJ, Melloni E, Park DS, Clarke PB (2009) Effects of calpain inhibition on dopaminergic markers and motor function following intrastratal 6-hydroxydopamine administration in rats. *Neuroscience* 158:558-569.

Groenewegen HJ (2003) The basal ganglia and motor control. *Neural plasticity* 10:107-120.

Hodges H, Pollock K, Stroemer P, Patel S, Stevanato L, Reuter I, Sinden J (2007) Making stem cell lines suitable for transplantation. *Cell transplantation* 16:101-115.

Hoglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC (2004) Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nature neuroscience* 7:726-735.

Hornykiewicz O (1998) Biochemical aspects of Parkinson's disease. *Neurology* 51:S2-9.

Huot P, Parent A (2007) Dopaminergic neurons intrinsic to the striatum. *Journal of neurochemistry* 101:1441-1447.

Ibanez-Sandoval O, Tecuapetla F, Unal B, Shah F, Koos T, Tepper JM (2010) Electrophysiological and morphological characteristics and synaptic connectivity of tyrosine hydroxylase-expressing neurons in adult mouse striatum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:6999-7016.

Jakowec MW, Petzinger GM (2004) 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned model of parkinson's disease, with emphasis on mice and nonhuman primates. *Comparative medicine* 54:497-513.

Jin K, Wang X, Xie L, Mao XO, Zhu W, Wang Y, Shen J, Mao Y, Banwait S, Greenberg DA (2006) Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:13198-13202.

Jollivet C, Montero-Menei CN, Venier-Julienne MC, Sapin A, Benoit JP, Menei P (2004) Striatal tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons are induced by L-dihydroxyphenylalanine and nerve growth factor treatment in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Neuroscience letters* 362:79-82.

Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995) Striatal interneurones: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends in neurosciences* 18:527-535.

Kish SJ, Shannak K, Hornykiewicz O (1988) Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. *Pathophysiologic and clinical implications*. *The New England journal of medicine* 318:876-880.

Kluger BM, Klepitskaya O, Okun MS (2009) Surgical treatment of movement disorders. *Neurologic clinics* 27:633-677, v.

Kolb B, Whishaw IQ (2008) Cerveau et comportement. Bruxelles: De Boeck.

Landry Y, Gies J-P (2003) Pharmacologie : Des cibles vers l'indication thérapeutique. Paris: DUNOD.

Langston JW, Ballard PA, Jr. (1983) Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. The New England journal of medicine 309:310.

Langston JW, Forno LS, Tetrud J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D (1999) Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. Annals of neurology 46:598-605.

Lebel M, Chagniel L, Bureau G, Cyr M (2010) Striatal inhibition of PKA prevents levodopa-induced behavioural and molecular changes in the hemiparkinsonian rat. Neurobiology Of Disease 38:59-67.

Lebel M, Cyr M (2011) Molecular and cellular events of dopamine D1 receptor-mediated tau phosphorylation in SK-N-MC cells. Synapse 65:69-76.

Lebel M, Robinson P, Cyr M (2007) Canadian Association of Neurosciences Review: the role of dopamine receptor function in neurodegenerative diseases. The Canadian journal of neurological sciences Le journal canadien des sciences neurologiques 34:18-29.

Lewis SJ, Barker RA (2009) Understanding the dopaminergic deficits in Parkinson's disease: insights into disease heterogeneity. Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia 16:620-625.

Li B, Yamamori H, Tatebayashi Y, Shafit-Zagardo B, Tanimukai H, Chen S, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (2008) Failure of neuronal maturation in Alzheimer disease dentate gyrus. Journal of neuropathology and experimental neurology 67:78-84.

Liou AK, Zhou Z, Pei W, Lim TM, Yin XM, Chen J (2005) BimEL up-regulation potentiates AIF translocation and cell death in response to MPTP. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 19:1350-1352.

Liu BF, Gao EJ, Zeng XZ, Ji M, Cai Q, Lu Q, Yang H, Xu QY (2006) Proliferation of neural precursors in the subventricular zone after chemical lesions of the nigrostriatal pathway in rat brain. Brain research 1106:30-39.

Liu T, Perry G, Chan HW, Verdile G, Martins RN, Smith MA, Atwood CS (2004) Amyloid-beta-induced toxicity of primary neurons is dependent upon

differentiation-associated increases in tau and cyclin-dependent kinase 5 expression. *Journal of neurochemistry* 88:554-563.

Lopez-Real A, Rodriguez-Pallares J, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2003) Localization and functional significance of striatal neurons immunoreactive to aromatic L-amino acid decarboxylase or tyrosine hydroxylase in rat Parkinsonian models. *Brain research* 969:135-146.

Mamber C, Kozareva DA, Kamphuis W, Hol EM (2013) Shades of gray: The delineation of marker expression within the adult rodent subventricular zone. *Progress in neurobiology*.

Mao L, Lau YS, Petroske E, Wang JQ (2001) Profound astrogenesis in the striatum of adult mice following nigrostriatal dopaminergic lesion by repeated MPTP administration. *Brain research Developmental brain research* 131:57-65.

Masuda M, Miura M, Inoue R, Imanishi M, Saino-Saito S, Takada M, Kobayashi K, Aosaki T (2011) Postnatal development of tyrosine hydroxylase mRNA-expressing neurons in mouse neostriatum. *The European journal of neuroscience* 34:1355-1367.

Mataga MA, Rosenthal S, Heerboth S, Devalapalli A, Kokolus S, Evans LR, Longacre M, Housman G, Sarkar S (2012) Anti-breast cancer effects of histone deacetylase inhibitors and calpain inhibitor. *Anticancer research* 32:2523-2529.

Mazloom M, Smith Y (2006) Synaptic microcircuitry of tyrosine hydroxylase-containing neurons and terminals in the striatum of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated monkeys. *The Journal of comparative neurology* 495:453-469.

Meredith GE, Farrell T, Kellaghan P, Tan Y, Zahm DS, Totterdell S (1999) Immunocytochemical characterization of catecholaminergic neurons in the rat striatum following dopamine-depleting lesions. *The European journal of neuroscience* 11:3585-3596.

Middleton FA, Strick PL (2000) Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits. *Brain research Brain research reviews* 31:236-250.

Mingorance-Le Meur A, O'Connor TP (2009) Neurite consolidation is an active process requiring constant repression of protrusive activity. *The EMBO journal* 28:248-260.

Mouatt-Prigent A, Karlsson JO, Agid Y, Hirsch EC (1996) Increased M-calpain expression in the mesencephalon of patients with Parkinson's disease but not in other neurodegenerative disorders involving the mesencephalon: a role in nerve cell death? *Neuroscience* 73:979-987.

Mura A, Jackson D, Manley MS, Young SJ, Groves PM (1995) Aromatic L-amino acid decarboxylase immunoreactive cells in the rat striatum: a possible site for the conversion of exogenous L-DOPA to dopamine. *Brain research* 704:51-60.

Nicklas WJ, Saporito M, Basma A, Geller HM, Heikkila RE (1992) Mitochondrial mechanisms of neurotoxicity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 648:28-36.

Nicolesco CFJ (ed.) (1925) *Anatomie Cérébrale: Les Noyaux Gris Centraux et la Région Mesencéphalo-Sous-Optique, Suivi d'un Appendice sur L'Anatomie Pathologique de la Maladie de Parkinson*

Nixon RA (2003) The calpains in aging and aging-related diseases. *Ageing research reviews* 2:407-418.

Nutt JG, Wooten GF (2005) Clinical practice. Diagnosis and initial management of Parkinson's disease. *The New England journal of medicine* 353:1021-1027.

O'Hare MJ, Kushwaha N, Zhang Y, Aleyasin H, Callaghan SM, Slack RS, Albert PR, Vincent I, Park DS (2005) Differential roles of nuclear and cytoplasmic cyclin-dependent kinase 5 in apoptotic and excitotoxic neuronal death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:8954-8966.

Obeso JA, Rodriguez-Oroz M, Marin C, Alonso F, Zamarbide I, Lanciego JL, Rodriguez-Diaz M (2004) The origin of motor fluctuations in Parkinson's disease: importance of dopaminergic innervation and basal ganglia circuits. *Neurology* 62:S17-30.

Olanow CW, Stern MB, Sethi K (2009) The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009). *Neurology* 72:S1-136.

Oshima M, Koizumi S, Fujita K, Guroff G (1989) Nerve growth factor-induced decrease in the calpain activity of PC12 cells. *The Journal of biological chemistry* 264:20811-20816.

Page CP (1999) *Pharmacologie intégrée*. Paris: De Boeck Université.

Palfi S, Leventhal L, Chu Y, Ma SY, Emborg M, Bakay R, Deglon N, Hantraye P, Aebischer P, Kordower JH (2002) Lentivirally delivered glial cell line-derived neurotrophic factor increases the number of striatal dopaminergic neurons in primate models of nigrostriatal degeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:4942-4954.

Papa SM, Engber TM, Kask AM, Chase TN (1994) Motor fluctuations in levodopa treated parkinsonian rats: relation to lesion extent and treatment duration. *Brain research* 662:69-74.

Parent A, Hazrati LN (1995) Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain research Brain research reviews* 20:91-127.

Paxinos G, Watson C (2005) The rat brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press.

Pinter M, Aszodi A, Friedrich P, Ginzburg I (1994) Calpeptin, a calpain inhibitor, promotes neurite elongation in differentiating PC12 cells. *Neuroscience letters* 170:91-93.

Pollak P (ed.) (2004) La maladie de Parkinson. Paris.

Porritt MJ, Batchelor PE, Hughes AJ, Kalnins R, Donnan GA, Howells DW (2000) New dopaminergic neurons in Parkinson's disease striatum. *Lancet* 356:44-45.

Przedborski S, Vila M, Jackson-Lewis VV, Dawson TM (2000) Reply: a new look at the pathogenesis of Parkinson's disease. *Trends in pharmacological sciences* 21:165.

Raghupathi R, Graham DI, McIntosh TK (2000) Apoptosis after traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma* 17:927-938.

Rajput AH (2001) Levodopa prolongs life expectancy and is non-toxic to substantia nigra. *Parkinsonism & Related Disorders* 8:95-100.

Robles E, Huttenlocher A, Gomez TM (2003) Filopodial calcium transients regulate growth cone motility and guidance through local activation of calpain. *Neuron* 38:597-609.

Romanko MJ, Rola R, Fike JR, Szele FG, Dizon ML, Felling RJ, Brazel CY, Levison SW (2004) Roles of the mammalian subventricular zone in cell replacement after brain injury. *Progress in neurobiology* 74:77-99.

Roudaut C, Le Roy F, Suel L, Poupiot J, Charton K, Bartoli M, Richard I (2013) Restriction of calpain3 expression to the skeletal muscle prevents cardiac toxicity and corrects pathology in a murine model of limb-girdle muscular dystrophy. *Circulation* 128:1094-1104.

Sachs C, Jonsson G (1975) Effects of 6-hydroxydopamine on central noradrenaline neurons during ontogeny. *Brain research* 99:277-291.

Santos DM, Xavier JM, Morgado AL, Sola S, Rodrigues CM (2012) Distinct regulatory functions of calpain 1 and 2 during neural stem cell self-renewal and differentiation. *PloS one* 7:e33468.

Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, Tillerson JL, Bland ST (2000) CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology* 39:777-787.

Scherman D, Desnos C, Darchen F, Pollak P, Javoy-Agid F, Agid Y (1989) Striatal dopamine deficiency in Parkinson's disease: role of aging. *Annals of neurology* 26:551-557.

Schwarting RK, Huston JP (1996) The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Progress in neurobiology* 50:275-331.

Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, Jenner P, Marsden CD (1994) Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Annals of neurology* 36:348-355.

Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP (1998) Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86:353-387.

Société Parkinson Canada. La maladie de Parkinson: ses répercussions sociales et économiques. vol. 2011.

Société Parkinson Canada. Progression de la maladie de Parkinson. vol. 2011.

Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez-Padilla J (2010) Calcium, cellular aging, and selective neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Cell calcium* 47:175-182.

Tande D, Hoglinger G, Debeir T, Freundlieb N, Hirsch EC, Francois C (2006) New striatal dopamine neurons in MPTP-treated macaques result from a phenotypic shift and not neurogenesis. *Brain : a journal of neurology* 129:1194-1200.

Tanner CM (1992) Occupational and environmental causes of parkinsonism. *Occupational medicine* 7:503-513.

Tashiro Y, Sugimoto T, Hattori T, Uemura Y, Nagatsu I, Kikuchi H, Mizuno N (1989) Tyrosine hydroxylase-like immunoreactive neurons in the striatum of the rat. *Neuroscience letters* 97:6-10.

Thompson SN, Carrico KM, Mustafa AG, Bains M, Hall ED (2010) A pharmacological analysis of the neuroprotective efficacy of the brain- and cell-permeable calpain inhibitor MDL-28170 in the mouse controlled cortical impact traumatic brain injury model. *Journal of neurotrauma* 27:2233-2243.

Ungerstedt U (1968) 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. European journal of pharmacology 5:107-110.

Vingerhoets FJ, Schulzer M, Calne DB, Snow BJ (1997) Which clinical sign of Parkinson's disease best reflects the nigrostriatal lesion? Annals of neurology 41:58-64.

Walsh DM, Selkoe DJ (2004) Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. Protein and peptide letters 11:213-228.

Wang KK (2000) Calpain and caspase: can you tell the difference?, by kevin K.W. WangVol. 23, pp. 20-26. Trends in neurosciences 23:59.

Winkler C, Kirik D, Bjorklund A, Cenci MA (2002) L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. Neurobiology Of Disease 10:165-186.

Wooten GF, Currie LJ, Bovbjerg VE, Lee JK, Patrie J (2004) Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry 75:637-639.

Yajima Y, Kawashima S (2002) Calpain function in the differentiation of mesenchymal stem cells. Biological chemistry 383:757-764.

Zadran S, Bi X, Baudry M (2010) Regulation of calpain-2 in neurons: implications for synaptic plasticity. Molecular neurobiology 42:143-150.

Zecca L, Tampellini D, Gerlach M, Riederer P, Fariello RG, Sulzer D (2001) Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour. Molecular pathology : MP 54:414-418.