THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR des sciences fondamentales et appliquées
Laboratoire de neurosciences expérimentales et cliniques - LNEC (Poitiers)
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

École doctorale : Biologie-santé - Bio-santé (Limoges)
Secteur de recherche : Neurosciences

Présentée par :
Marine Droguerre

Thérapie cellulaire de la maladie de Parkinson : transplantation intranigrale vs intrastriatale

Directeur(s) de Thèse :
Afsaneh Gaillard

Soutenue le 17 décembre 2015 devant le jury

Jury :

Président	**Michel Audiffren**	Professeur, Université de Poitiers
Rapporteur	**Erwan Bézard**	Directeur de recherche, INSERM, Université de Bordeaux
Rapporteur	**Isabelle Dusart**	Directeur de recherche CNRS, Université de Paris
Membre	**Afsaneh Gaillard**	Professeur, LNEC, Université de Poitiers
Membre	**Mohamed Jaber**	Professeur, LNEC, Université de Poitiers
Membre	**Sylvie Chalon**	Directeur de recherche INSERM, Université de Tours

Pour citer cette thèse :
Marine Droguerre. *Thérapie cellulaire de la maladie de Parkinson : transplantation intranigrale vs intrastriatale* [En ligne]. Thèse Neurosciences. Poitiers : Université de Poitiers, 2015. Disponible sur Internet <http://theses.univ-poitiers.fr>

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)
École Doctorale : Biosanté n°524

Secteur de Recherche : **Neurosciences**

Présentée par :

Marine DROGUERRE

****

Thérapie cellulaire de la maladie de Parkinson : transplantation intranigrale vs intrastriatale

****

Directeur de Thèse : Afsaneh GAILLARD

****

Soutenue le 17 décembre 2015

devant la Commission d'Examen

****

JURY

Rapporteur	**Erwan BEZARD**	Directeur de recherche INSERM, Université de Bordeaux
Rapporteur	**Isabelle DUSART**	Directeur de recherche CNRS, Université de Paris
Examinateur	**Michel AUDIFFREN**	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Examinateur	**Sylvie CHALON**	Directeur de recherche INSERM, Université de Tours
Examinateur	**Mohamed JABER**	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Examinateur	**Afsaneh GAILLARD**	Professeur des Universités, Université de Poitiers

A mes parents,

Au petit Léon,

Marine DROGUERRE *Curriculum vitae*

Née le 11 août 1986 à Montargis (Loiret, France)
10, rue Jean Jaurès
86000 Poitiers
Tel : 06 07 39 35 44
Email : marine.droguerre@univ-poitiers.fr

Formation

- 2012-2015 : Allocataire de recherche, Université de Poitiers, Laboratoire de Neurosciences Expérimentales et Cliniques (LNEC INSERM U1084). Dirigée par le Pr A. Gaillard. **Soutenance de thèse : décembre 2015**
- 2012 : Diplôme de Master Sciences, Technologies, Santé Mention Biologie évolutive et intégrative, infectiologie spécialité Biologie de la Reproduction. Université de Tours (37)
- 2010 : Licence de Sciences, Technologies, Santé, Mention Biologie. Université de Tours (37)
- 2004 : Baccalauréat Scientifique. Spécialité : Biologique Ecologie, Montargis (45)

Expériences professionnelles

- 2012-2015 : Allocataire de recherche, Laboratoire de Neurosciences Expérimentales et Cliniques (LNEC INSERM U1084). *Sujet de thèse* : «Thérapie cellulaire de la maladie de Parkinson : transplantation intranigrale vs intrastriatale». Dirigée par le Pr A. Gaillard, LNEC, Poitiers.
- 2012 Stage de Master 2 Recherche ; Analyse et comparaison de la plasticité des réseaux neuro-gliaux dans l'hypothalamus de plusieurs espèces de mammifères » Dir de stage : Dr. M. Migaud, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Equipe 3: Microenvironnement et Dynamique des Réseaux Neuroendocrines, INRA de Nouzilly
- 2011 Stage de Master 1 : « Détermination de la date de naissance des neurones à kisspeptide ». Dir de stage : Dr I. Franceschini, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Equipe 3: Microenvironnement et Dynamique des Réseaux Neuroendocrines, INRA de Nouzilly

Domaine de compétence

Biologie cellulaire / Biochimie : Culture de lignées cellulaires, culture primaire de neurones d'hippocampe, immunomarquage sur cellules ou tissus, western blot, microscopie à épifluorescence et confocale, étude morphologique cellulaire, traitement d'images.
Expérimentation animale : Neuroanatomie du rongeur, perfusion, prélèvement de tissus (de l'embryon à l'adulte), coupe de tissu, stéréotaxie chez la souris, tests de comportements moteurs (Test de rotations induites aux drogues, Pole test, Test du cylindre, Beam test, Gait Test, Stepping test) et de préhension de nourriture (Staircase test, Single reaching test) chez le rongeur.
Habilitation à l'expérimentation animale de niveau 1.

Publications et Productions

Revues Internationales à comité de lecture

- **Droguerre M.**, Vitrac C., Benoit-Marand M., Jaber M., Fernagut PO., Gaillard A. *"Intranigral vs. intrastriatal transplantation of embryonic ventral mesencephalic cells in an animal model of Parkinson's disease"* **En préparation**.
- **Droguerre** M*., Ballout N*., Frangeul L., Nicolas C., Saha B., Gaillard A. Mobilization of endogenous neural stem cells following cortical lesion and transplantation. **(***Co-auteurs). **En préparation**
- Péron S., **Droguerre M.**, Debarbieux F., Ballout N., Benoit-Marand M., Francheteau M., Brot S., Weber P., Rougon G., Jaber M., Gaillard A. "*A delay between lesion and transplantation enhances graft integration and ameliorates repair and recovery"* **Soumis**
- Batailler M., **Droguerre M.**, Baroncini M., Fontaine C., Prevot V., Migaud M. *"DCX-expressing cells in the vicinity of the hypothalamic neurogenic niche: a comparative study between mouse, sheep, and human tissues"* J. Comp. Neurol., 522 (8): 1966–1985, 2014
- Desroziers E., **Droguerre M.**, Bentsen AH., Robert V., Mikkelsen JD., Caraty A., Tillet Y., Duittoz A., Franceschini I. *"Embryonic Development of Kisspeptin Neurones in Rat."* Journal of Neuroendocrinology., 24 (10): 1284–1295, 2012. (Couverture Journal of Neuroendocrinology)

Communications Orales

- **Droguerre M.**, Vitrac C., Benoit-Marand M., Jaber M., Fernagut PO., Gaillard A. "Intranigral vs. intrastriatal transplantation of embryonic ventral mesencephalic cells in an animal model of Parkinson's disease" Journée des Nouveautés de la Recherche Cliniques, Société Française de Neurologie, **Paris**, 2015.

- **Droguerre M.**, Vitrac C., Benoit-Marand M., Jaber M., Fernagut PO., Gaillard A. "Intranigral vs. intrastriatal transplantation of embryonic ventral mesencephalic cells in an animal model of Parkinson's disease" 2ème Journée scientifique de la SFR Tours-Poitiers, **Poitiers,** 2014.

Communications Affichées

- Droguerre M., Vitrac C., Benoit-Marant M., Jaber M., Fernagut PO., Gaillard A. Intranigral vs. intrastriatal transplantation of embryonic ventral mesencephalic cells in an animal model of Parkinson's disease. 3ème Journée Scientifique de la SFR Tours-Poitiers, **Tours**, 2015 **(Prix Poster/Présentation orale)**

- Droguerre M., Vitrac C., Benoit-Marant M., Jaber M., Fernagut PO., Gaillard A. Intranigral vs. intrastriatal transplantation of embryonic ventral mesencephalic cells in an animal model of Parkinson's disease. 12^{e} colloque de la société des Neurosciences, **Montpellier**, 2015

- Droguerre M., Vitrac C., Benoit-Marant M., Jaber M., Gaillard A. Intranigral vs. intrastriatal transplantation of embryonic ventral mesencephalic cells in an animal model of Parkinson's disease. 9th FENS Forum of Neuroscience, **Milan**, 2014.

- Droguerre M., Vitrac C., Benoit-Marant M., Jaber M., Gaillard A. Intranigral vs. intrastriatal transplantation of embryonic ventral mesencephalic cells in an animal model of Parkinson's disease. IX^{ème} Congrès de Physiologie, Pharmacologie et de Thérapeutique, **Poitiers**, 2014

- Droguerre M., Vitrac C., Benoit-Marant M., Jaber M., Gaillard A. Transplantation intranigrale *versus* intrastriatale de neurones dopaminergiques issus de mésencéphale ventral embryonnaire dans un modèle animal de la maladie de Parkinson. 1ère Journée de recherche Tours-Poitiers-Limoges, **Tours**, 2014.

- Droguerre M., Péron S., Debarbieux F., Weber P., Rougon G., Jaber M. and Gaillard A. Delaying cortical transplantation improves the angiogenesis, survival and connectivity of grafts. 1ère Journée scientifique de la SFR Tours-Poitiers, **Tours**, 2013

- **Droguerre M**., Péron S., Debarbieux F., Weber P., Rougon G., Jaber M. and Gaillard A. Delaying cortical transplantation improves the angiogenesis, survival and connectivity of grafts. 6ème Journée de recherche Tours-Poitiers, **Poitiers**, 2013.

Encadrement

- 2014-2015 : Moniteur Enseignante à l'Université de Poitiers dans le domaine des Neurosciences, section CNU 69. Enseignements de travaux pratiques et travaux dirigés (64h/an) pour un public allant du L1 au M1. *Thèmes abordés* : Les maladies neurodégénératives, plasticité cérébrale, neuroanatomie, histologie, stéréotaxie, étude des comportements moteurs de la souris.
- 2015 : Encadrement stage de 8 semaines Master 1, Neurosciences, et étudiante 3ème année de Licence
- 2014 : Encadrement stage étudiante, 3ème année de Licence

Divers

- Langues : **Anglais** lu, écrit et parlé
- Informatique : **Maitrise des logiciels** : Word, Excel, PowerPoint, Photoshop, Adobe Illustrator, Mercator, ImageJ, Statview, GraphPad Prism, EndNote.
- Participe à la **vulgarisation scientifique** des Lauréats de l'appel à projet de la **Fédération pour la Recherche sur le Cerveau** (FRC) pour le grand public.
- Participation à la mise en œuvre de l'exposition « Le cerveau à tous les âges », Espace Pierre Mendès- France, 2013-2014, Poitiers.

REMERCIEMENTS

Je tiens en tout premier lieu à exprimer toute mon estime et mon respect aux membres du jury qui ont accepté de lire et de juger ce travail de thèse. Merci donc, aux Docteurs Isabelle Dusart et Erwan Bézard d'avoir accepté d'évaluer cette thèse en tant que rapporteurs ainsi qu'au Docteur Syvie Chalon et Professeur Michel Audiffren d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse en tant qu'examinateurs.

Je remercie vivement le Professeur Mohamed Jaber de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Durant ces trois années de thèse, le Professeur Jaber m'a soutenue dans mes travaux de recherches et a constitué un cadre de travail idéal à la réalisation de cette thèse. Je tiens à le remercier pour cela.

Je tiens à exprimer ma gratitude et mon profond respect au Professeur Afsaneh Gaillard pour l'encadrement de cette thèse. Ces quelques lignes ne seront pas suffisantes pour témoigner de toute ma reconnaissance. Afsaneh, pour vos conseils, vos encouragements et votre soutien je vous remercie. Merci de m'avoir offert la possibilité d'effectuer cette thèse à vos cotés et de la confiance que vous m'avez accordée durant ces trois années.

Un grand merci à Marianne Benoit-Marand pour tes conseils, ta gentillesse et la patience dont tu as fait preuve à mon égard pour effacer les nuages obscurcissant l'électrophysiologie. Merci également à Pierre-Olivier Fernagut et Pauline Belujon pour les discussions enrichissantes et les conseils que vous avez su me prodiguer. Merci à Marcello Solinas pour ses conseils avisés en statistiques et à tous ceux qui m'ont aidée et conseillée dans la réalisation de cette thèse.

Merci à Anne Cantereau pour son aide en microcopie confocale, à Émile Béré pour le travail fourni en microscopie électronique et à toutes les personnes qui m'ont apportée leur aide dans les démarches administratives et le soin porté aux animaux.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres du LNEC qui ont contribué chaque jour, au bon déroulement de cette thèse autant dans leurs encouragements que dans l'aide qu'ils apportent à notre quotidien. Merci donc à Maureen, Marie-Laure, Virginie, Anaïs, Tristan et à tous les doctorants passés ou présents.

Sophie je te remercie. J'ai eu la chance de débuter à tes cotés dans ce laboratoire et ces quelques mois ont suffit pour m'insuffler la passion et le courage dont tu regorges pour trois années entières.

Céline, tu as été le rayon de soleil de cette thèse. Les petits bonheurs ne tiennent souvent pas à grand chose, tu le sais et tu as su incarner ces moments durant ces années. Tes futurs collègues ont beaucoup de chance. Tu vas beaucoup me Manquer et Je Te souhaite le Meilleur pour la suite.

Émilie, Sébastien, merci d'avoir été la. Chacun de vous est à la fois l'oreille et l'épaule de ce laboratoire pour bon nombre d'entre nous. Merci pour la bienveillance dont vous faites preuve au quotidien.

Nissrine, mon amie. Si cette thèse s'est aussi bien déroulée c'est en partie grâce à toi. Tu as toujours été présente et je me sens privilégiée d'avoir passé ces trois années à tes cotés. Merci pour tout.

Enfin, merci à ma famille et mes proches de m'avoir toujours soutenue. Merci à mes parents de me regarder discrètement évoluer au loin et de rester toujours assez proche pour me rattraper quand je trébuche. Merci à mes amis d'être la pour me faire changer d'air, et pour tous les bons moments passés. Merci à tous.

Ce fut un réel plaisir de travailler au sein de ce laboratoire et j'en remercie ici tous les membres pour les moments passés en leur compagnie.

Résumé

La maladie de Parkinson (MP) est une pathologie neurodégénérative associée principalement à une perte progressive de neurones dopaminergiques de la substance noire (SN) conduisant à une diminution de dopamine au niveau du striatum. Une des approches thérapeutiques expérimentales de la MP est la greffe de neurones dopaminergiques, non pas au niveau de la SN, mais directement dans la région cible, le striatum, et ce avec des résultats variables. Dans cette étude, nous avons comparé en détail la récupération fonctionnelle suite à la transplantation de mésencéphale ventral (MV) fœtal provenant de souris exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de la tyrosine hydroxylase soit au niveau de la SN soit dans le striatum de souris adultes lésées unilatéralement à la 6-hydroxydopamine. Les conséquences anatomiques et fonctionnelles ont été analysées par des approches comportementales, électrophysiologiques et immunohistochimiques. Nos résultats montrent que les neurones greffés dans les deux emplacements envoient des projections vers le striatum. De plus, les deux types de greffes induisent une amélioration significative de la motricité ainsi que de l'activité des neurones du striatum. Toutefois, seule la greffe intranigrale a permis la restauration de la motricité fine des membres antérieurs et un retour à une excitabilité des neurones striataux à l'état basal.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder associated with a progressive loss of dopaminergic (DA) neurons in the substantia nigra (SN), leading to a loss of dopamine in the striatum. One of the experimental therapeutic approaches in PD is the graft of DA neurons not in their ontogenic site, the SN, but directly into the target region, the striatum and those leads to variable results. In this study, we have analyzed in detail the functional outcome of fetal VM tissue expressing GFP under the control of a tyrosine hydroxylase promoter grafts placed either into the SN or striatum in unilaterally 6-hydroxydopamine lesioned adult mice. Anatomical and functional outcome were analyzed using behavioral, electrophysiological and immunohistochemical approaches. Our results show that transplanted neurons in both locations can survive and re-innervate the striatum. Furthermore, both grafts locations significantly restored motor performance and induced the recovery of striatal firing properties. However, only intranigral transplantation allows recovery of fine motor skills of previous members and efficiently normalized cortico-striatal responses.

SOMMAIRE GENERALE

PRINCIPALES ABREVIATIONS

INDEX DES FIGURES

AVANTS PROPOS

INTRODUCTION 1

I. La maladie de Parkinson 3

A. Historique 3

B. Épidémiologie 4

C. Étiologie 4

D. Manifestations cliniques de la MP 6

II. Physiopathologie de la MP 7

A. Dégénérescence des neurones dopaminergiques : impact sur les ganglions de la base 7

B. Conséquences histo-pathologiques de la MP : Les corps de Lewy 26

III. Modèles animaux associés à l'étude de la MP 29

A. Modèle de lésion à la 6-OHDA 30

B. Lésion Unilatérale à la 6-OHDA : Considérations fonctionnelles 31

IV. Stratégies thérapeutiques de la maladie de Parkinson 33

A. Les traitements médicamenteux 35

B. Chirurgie par lésion et stimulation 40

C. Thérapie génique et neuroprotection 41

D. Thérapie cellulaire et maladie de Parkinson 44

V. Objectif de la thèse 59

MATERIELS ET METHODES 61

I. Procédure expérimentale de lésion à la 6-OHDA 63

A. Animaux 63

B. Protocole de lésion à la 6-OHDA 63

II. Procédure expérimentale de transplantation de mésencéphale ventral 64

A. Origine des tissus donneurs 64

B. Protocole de dissection du MV et la transplantation 65

III. Procédures expérimentales comportementales 67

A. Test de rotation 69
B. Test de la descente de tige 71
C. Test du Cylindre 72
D. Test de la poutre modifié 74
E. Test de l'escalier 75
F. Analyse du mouvement de préhension 78
G. Administration de L-DOPA 85
H. Analyse de la marche 85
IV. Procédures expérimentales électrophysiologiques 89
A. Anesthésie et procédure électrophysiologique 89
B. Analyses électrophysiologiques 90
V. Traitement des cerveaux et immunohistochimie 91
VI. Microscopie électronique 92
VII. Analyses d'images et quantifications 93
VIII. Analyse statistiques 94
RESULTATS EXPERIMENTAUX 95
I. Étude neuroanatomique 97
A. Analyse de la lésion 97
B. Expression des marqueurs dopaminergiques au sein du greffon 98
C. Expression des marqueurs de types nigral ou VTA au sein du greffon 102
II. Évaluation de la fonctionnalité des neurones dopaminergiques du MV transplantés en condition intrastriatale *versus* intranigrale 106
A. Étude comportementale 107
B. Étude Électrophysiologique 134
DISCUSSION 137
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 159
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 163

LISTE DES ABREVIATIONS

6-OHDA: 6-hydroxydopamine

AAAD: Acides aminés aromatiques

AMPA : Acide α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique

BDNF : Facteur neurotrophique issu du cerveau / Brain derived neurotrophic factor

BSA : Bovin serum albumin

COMT : Catécholamine-O-méthyltransférase

DA : Dopamine

DAT : Transporteur à la dopamine

DOPAC : Acide 3,4-dihydroxyphénylacétique

DOPAL : 3,4-dihydroxyphénylacétaldéhyde

DOPET : 3,4-dihydroxyphényléthanol

GABA : Acide γ-aminobutyrique

GDNF : Facteur neurotrophique issu des cellules gliales / Glial cell line-derived neurotrophic factor

GFP : Protéine fluorescente verte / Green fluorescent protein

GID: Dyskinésies induites par le greffon / Graft induced dyskinesias

Girk2 : Canal potassique à rectification entrante lié aux protéines G

GPe : Globus pallidum externe

GPi : Globus pallidum interne

HVA : Acide homovanillique

ICOMT : Inhibiteurs de la catéchol-O-Méthyl transférase

IMAO-B : Monoamine-oxydase de type B

L-DOPA: L-dihydroxyphénylalanine

MAO : Monoamine oxydase mitochondriale

MP : Maladie de Parkinson

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

MV: Mésencéphale ventral

NAc : Noyau Accumbens

NEM : Noyau épineux de taille moyenne

NMDA : Acide N-méthyl D-aspartique

NST : Noyau sous-thalamique

NT-3 : Neurotrophine 3

PNMT : Phényléthanolamine-N-méthyl-transférase

SN : Substance noire

SNpc : Substance noire *pars compacta*

SNpr : Substance noire *pars reticulata*

TBS : Tris-Buffered Saline

TH: Tyrosine hydroxylase

T-Total : Temps de descente de la tige

T-Turn : Temps de retournement

VMAT-2 : Transporteur vésiculaires des monoamines 2

VTA : Aire tegmentale ventrale / Ventral tegmental area

β-H : β-hydroxylase

INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURE 1 : Représentation schématique des relations fonctionnelles des structures des ganglions de la base. 9
FIGURE 2 : Neuroanatomie du système de projection des neurones dopaminergiques du mésencéphale. 10
FIGURE 3 : Observation des différents sous-types de neurones dopaminergiques du mésencéphale ventral. 11
FIGURE 4 : Régulation des canaux ioniques par les récepteurs dopaminergiques D1 et D2.. 14
FIGURE 5 : Morphologies et propriétés électrophysiologiques des NEM. 15
FIGURE 6 : Distribution des neurones dopaminergiques et représentation des principaux systèmes de projection chez le rongeur adulte. 17
FIGURE 7: Schématisation des liaisons fonctionnelles des structures des ganglions de la base et des neurotransmetteurs mis en jeu. 19
FIGURE 8 : Schématisation des relations fonctionnelles des structures des ganglions de la base en condition Parkinsonienne. 21
FIGURE 9 : Neuropathologie de la Maladie de Parkinson. 22
FIGURE 10 : Principale voie de biosynthèse des catécholamines. 24
FIGURE 11 : Principaux produits de dégradation de la dopamine. 26
FIGURE 12 : Différentes possibilités de conformation de l'α-synucléine. 27
FIGURE 13 : Schématisation hypothétique des interactions entre la mitochondrie et l'α-synucléine en condition normale ou dans le cadre de la MP. 29
FIGURE 14 : Schématisation des relations fonctionnelles des structures des ganglions de la base en condition Parkinsonienne et localisation des principales régions cibles des stratégies thérapeutiques de la maladie de Parkinson. 34
FIGURE 15 : Schématisation de la synthèse dopaminergique et localisation des principaux sites d'actions des stratégies médicamenteuses. 36
FIGURE 16 : Métabolisme de la Lévodopa. 39
FIGURE 17 : Schématisation de l'ensemble des stratégies thérapeutiques de neuroprotection liées au GDNF chez l'humain ou le rongeur. 43
FIGURE 18 : Transplantation de bulbe olfactif embryonnaire de souris dans la substance noire lésée. 49
FIGURE 19 : Illustrations présentant la distribution de projection des fibres GFP deux mois après transplantation intranigrale de mésencéphale ventral fœtal issus de souris GFP. ... 56
FIGURE 20 : Observation des différents sous-types de neurones dopaminergiques au sein du transplant. 57
FIGURE 21 : Caractéristiques de la souris transgénique TH-GFP. 65
FIGURE 22 : Protocole de dissection du mésencéphale ventral et la transplantation 66
FIGURE 23 : Représentation schématique de l'effet de l'apomorphine sur un modèle animal de lésion unilatérale à la 6-OHDA. 70
FIGURE 24 : Schématisation du dispositif nécessaire au test de rotation. 70
FIGURE 25 : Photographies présentant la descente de la tige. 71
FIGURE 26 : Photographies présentant le test du cylindre chez des souris contrôles ou lésées à la 6-OHDA. 73
FIGURE 27 : Illustration du dispositif utilisé dans le test de la poutre modifié. 75
FIGURE 28 : Dispositif utilisé pour le test de l'escalier chez la souris. 77
FIGURE 29 : Description complète du mouvement de préhension de nourriture chez le rongeur lors du « single reaching test ». 79

FIGURE 30 : Séquençage du mouvement de préhension de nourriture au cours du test de l'escalier chez la souris. 79
FIGURE 31 : Décomposition des trois séquences lors du mouvement de préhension chez la souris. 80
FIGURE 32 : Trajectoire de la patte lors d'un mouvement de préhension de nourriture dans le « single reaching task » chez le rat. 83
FIGURE 33 : Détails de la méthode d'obtention d'une trajectoire de préhension de nourriture chez une souris contrôle. 84
FIGURE 34 : Photographie illustrant le dispositif du « Gait Lab ». 87
FIGURE 35 : Représentation des données analysables par le logiciel « Gait Lab » et les principaux paramètres analysés. 88
FIGURE 36 : Illustration en microscopie confocale de l'étendue de la lésion dopaminergique unilatérale à la 6-OHDA chez une souris lésée. 97
FIGURE 37 : Quantification du nombre de cellules GFP+ dans le transplant. 99
FIGURE 38 : Illustration en microscopie confocale de la distribution des fibres GFP+/DAT+ issues des neurones embryonnaires de MV greffés dans le striatum hôte. 100
FIGURE 39 : Illustration en microscopie confocale de la distribution des fibres GFP+/DAT+ issues des neurones embryonnaires de MV dans la substance noire au niveau du striatum hôte. 101
FIGURE 40 : Illustration en microscopie confocale de l'expression des marqueurs dopaminergiques dans les transplants intranigraux et intrastriataux. 103
FIGURE 41 : Quantification du nombre de neurones dopaminergiques dans le transplant. . 104
FIGURE 42 : Etablissement des contacts synaptiques réciproques entre l'hôte et le transplant. 106
FIGURE 43 : Nombre de rotations induites par l'apomorphine 3 semaines après la lésion et 13 semaines post-transplantation. 108
FIGURE 44 : Diagramme de dispersion représentant les corrélations entre le nombre de neurones GFP+ et le nombre de rotations controlatérales induites par apomorphine effectuée 13 semaines après transplantation. 109
FIGURE 45 : Effets de la lésion et / ou de la transplantation sur les performances motrices lors du pole test à la 3ème et 7ème semaine post-transplantation. 111
FIGURE 46 : Effets de la lésion et / ou de la transplantation sur les performances motrices lors du test du cylindre. 113
FIGURE 47 : Effets de la lésion et / ou de la transplantation sur les performances motrices et la coordination lors du test de la poutre 6 semaines après la transplantation. 115
FIGURE 48 : Effets de la lésion et / ou de la transplantation sur les performances motrices lors du test de l'escalier. 117
FIGURE 49 : Diagramme de dispersion représentant les corrélations entre le nombre de neurones GFP+ et les performances motrices évaluées par le test de l'escalier. 118
FIGURE 50 : Effets de la lésion et / ou de la transplantation sur le temps nécessaire à la réalisation de l'action de préhension. 120
FIGURE 51 : Effets de la lésion et / ou de la transplantation sur les trajectoires de contact lors du mouvement de préhension dans le test de l'escalier. 121
FIGURE 52 : Effets de la lésion et / ou de la transplantation sur la longueur des trajectoires lors d'un mouvement de contact controlatéral au coté la lésion dans le test de l'escalier. 122

FIGURE 53 : Effets de la lésion et / ou de la transplantation sur les performances de préhension de nourriture sans ou avec injection de L-DOPA. 124
FIGURE 54 : Effets de la lésion et / ou de la transplantation sur les trajectoires de contact lors du mouvement de préhension dans le test de l'escalier 16 semaines post-transplantation. 125
FIGURE 55 : Effets de la lésion et / ou de la transplantation sur les trajectoires des mouvements de contact 16 semaines post-transplantation après injection de L-DOPA. 126
FIGURE 56 : Représentation fusionnée des trajectoires lors des mouvements de contact sans et avec injection de L-DOPA. 127
FIGURE 57 : Effets de la lésion et / ou de la transplantation sur la longueur des trajectoires lors d'un mouvement de contact controlatéral au coté la lésion sans ou avec injection de L-DOPA. 128
FIGURE 58 : Étude de la vitesse moyenne de déplacement en fonction du temps. 129
FIGURE 59 : Effet de la lésion et / ou de la transplantation sur la longueur de la foulée. 130
FIGURE 60 : Diagramme de dispersion représentant les corrélations entre la vitesse de déplacement et la longueur de la foulée lors du test de la marche 9 semaines après transplantation. 131
FIGURE 61 : Étude de l'évolution d'une sélection de paramètres de locomotion en fonction du temps. 133
FIGURE 62 : Effet de la lésion et / ou de la transplantation sur l'activité de décharge des NEM. 134
FIGURE 63 : Effet de la lésion et / ou transplantation sur la fréquence de décharge des NEM. 135
FIGURE 64 : Effet de la lésion et / ou de la transplantation sur l'efficacité de la transmission cortico-striatale. 136
FIGURE 65 : Mécanismes d'action proposés suite à la greffe intrastriatale versus intranigrale de MV fœtal chez la souris hémi-Parkinsonienne. 154

TABLEAU 1 : Caractéristiques des formes génétiques associées à la MP 6
TABLEAU 2 : Descriptif et déroulement de l'ensemble des tests comportementaux réalisés au cours de l'étude. 68
TABLEAU 3 : Ensemble des paramètres de marche et leurs descriptions fournis par le Gait Lab. 86
TABLEAU 4 : Listes des anticorps primaires et secondaires utilisés. 92

AVANT-PROPOS

Parmi la centaine de pathologies affectant le système nerveux, les maladies neurodégénératives forment un sous-groupe touchant plus d'un million de personnes en France. Ces pathologies à évolution lente et invalidante ont pour conséquence une altération progressive et le plus souvent irréversible des fonctions nerveuses. La prévalence de ces pathologies liées à l'âge est en augmentation constante et l'accroissement de l'espérance de vie renforce d'autant plus le nombre de personnes touchées. Au sein de ces pathologies neurodégénératives, la maladie de Parkinson est la seconde pathologie la plus répandue. Elle est caractérisée principalement par la perte de neurones dopaminergiques de la substance noire projetant vers le striatum. La chute des taux de DA engendrée par cette dégénérescence provoque des troubles moteurs altérants considérablement la qualité de vie des patients. Face à la demande continuelle de traitements en vue de prévenir, ralentir ou stopper la dégénérescence, de nombreuses stratégies thérapeutiques se sont développées.

Une des principales approches thérapeutiques expérimentales dans cette pathologie consiste à transplanter des neurones dopaminergiques fœtaux au niveau du striatum. Les essais cliniques de transplantation intrastriatale de neurones dopaminergiques fœtaux réalisés chez le patient Parkinsonien ont abouti à quelques améliorations cliniques mais présentaient toutefois, une efficacité thérapeutique limitée. Une des causes de cette faible efficacité thérapeutique peut-être liée à la position ectopique du greffon. En outre, la raison principale de cette transplantation ectopique tire son raisonnement de l'absence apparente de permissivité du cerveau adulte à la repousse axonale après la greffe de neurones immatures. Néanmoins, les précédents travaux au sein de notre équipe ont démontré les capacités des neurones fœtaux, transplantés au sein de la substance noire de souris adultes, de restauration des voies nerveuses lésées. Au-delà d'une différenciation de cellules greffées en neurones dopaminergiques essentiellement de la substance noire ainsi qu'une reconstruction de la voie nigro-striée, cette transplantation intranigrale a démontré des capacités de récupération fonctionnelle. Cependant, bien que de nombreuses études visent à décrire les caractéristiques anatomiques et fonctionnelles de la greffe intrastriatale ou intranigrale, aucune n'a à l'heure actuelle comparé les bénéfices potentiels de ces deux types de transplantation.

De ce fait, je me suis attachée durant cette thèse, à fournir une comparaison détaillée des conséquences anatomiques et fonctionnelles de la transplantation intranigrale *versus* intrastriatale, chez un modèle animal de la maladie de Parkinson. Plus précisément, des neurones dopaminergiques issus de mésencéphale ventral d'embryons de souris ont été transplantés soit au niveau de la substance noire, soit au niveau du striatum, chez les souris

adultes lésées unilatéralement à la 6-hydroxydopamine. Le devenir et les bénéfices engendrés par la transplantation de ces cellules ont été étudiés d'une part, selon une approche neuroanatomique et d'autre part, selon un plan fonctionnel par une batterie de tests comportementaux complémentés par une étude électrophysiologique.

Aussi, l'introduction de ce manuscrit sera consacrée à la description de la maladie de Parkinson ainsi que de la structure et des connexions anatomiques et fonctionnelles jouant un rôle dans cette pathologie neurodégénérative. Je présenterai par la suite un état des résultats obtenus dans le domaine des stratégies thérapeutiques en m'attachant particulièrement à décrire les stratégies de thérapie cellulaire.

L'utilisation de neurones fœtaux en thérapie cellulaire est aujourd'hui fortement limitée notamment pour des questions d'éthiques et de logistiques. Les thérapies cellulaires se tournent actuellement vers de nouvelles sources de cellules pour la transplantation comme les neurones dopaminergiques dérivés de cellules souches embryonnaires ainsi que de cellules souches pluripotentes induites. Au sein de notre équipe, l'objectif de ces travaux est donc basé sur l'amélioration de techniques de thérapie cellulaire de la maladie de Parkinson par la validation de la transplantation intranigrale.

Ce travail de thèse a mené à un article en préparation qui sera soumis dans une revue scientifique à comité de lecture. Il a de plus été présenté lors de la journée des nouveautés de la recherche clinique organisée par la Société Française de Neurologie (SFN) les 15 et 16 janvier 2015 à Paris sous la forme de présentation orale ainsi que lors du 9ème Forum Européen des Sociétés des Neurosciences (FENS) à Milan du 4 au 9 juillet 2014 sous la forme de présentation affichée.

INTRODUCTION

I. La maladie de Parkinson

A. Historique

La Maladie de Parkinson (MP) est une pathologie neurodégénérative chronique et progressive dont les mécanismes ont été décrit pour la première fois en 1817 par le chirurgien anglais Sir James Parkinson (1755-1824) dans sa publication intitulée « An essay on the shaking palsy ». Cette maladie nommée « paralysie agitante » est alors décrite comme entrainant deux symptômes clés mis en évidence par Parkinson : le tremblement qui est « involontaire dans les parties du corps non en action et même lorsqu'elles sont appuyées », ainsi que l'akinésie, lenteur d'initiation des mouvements. Il est également décrit dans cette étude, la tendance des patients atteints de cette maladie à se courber vers l'avant ainsi que leur tendance à passer de la marche à la course. Ces travaux ont été reprit en 1872 par Jean-Martin Charcot, décrivant en détails les symptômes cliniques des malades et nommant par la suite ce syndrome, la maladie de Parkinson. C'est également à Charcot que l'on doit l'ajout de l'hypertonie (augmentation du tonus musculaire), dernier élément de la triade de symptômes établis par Parkinson. Ce n'est qu'en 1912 que Friedrich Lewy décrit des corps intra-cytoplasmiques au sein des neurones du mésencéphale de patients, plus précisément dans une région nommée substance noire *pars compacta* (SNpc) (ou *locus niger*), mise en évidence 7 ans plus tard par Konstantin Tretiakoff. C'est au cours des années 1950, qu'Arvid Carlsson mis en évidence, au sein des ganglions de la base, un niveau particulièrement élevé de dopamine (DA), dont les taux au sein des structures de projections des neurones dopaminergiques de la SNpc se voient fortement réduits dans le cas de la maladie de Parkinson (Hornykiewicz *et al*., 1966). Ces découvertes ont permis la mise en place d'une multitude de traitements thérapeutiques constituant la dopathérapie. Enfin d'autres types de traitements (chirurgie intracérébrale, stimulation haute fréquence) ont vu le jour et aujourd'hui, les recherches se tournent vers les traitements utilisant les concepts de neuro-protection ou de neuro-réparation comme la thérapie cellulaire.

B. Épidémiologie

La MP est la deuxième pathologie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Elle atteint plus de 6 millions de personnes dans le monde, affectant les deux sexes avec une légère prédominance chez les hommes (Elbaz *et al*., 2004). Au niveau de la population Européenne, cette maladie affecte plus d'1,7% des individus au-delà de 65 ans et atteint les 4% pour une population âgée de plus de 80 ans (de Rijk *et al*., 2000). La prévalence et l'incidence de cette pathologie sont respectivement estimées entre 100 et 200 et entre 10 et 20 pour 100 000 habitants (Alves *et al*., 2008). L'ensemble de ces données ainsi que la constante augmentation de l'âge moyen de la population font de cette maladie neurodégénérative un réel problème de santé publique.

C. Étiologie

Bien que de nombreuses pistes aient été développées, la ou les causes exactes responsables de la dégénérescence neuronale ainsi que son induction causant la MP restent encore à ce jour mal connues. Les principales hypothèses avancées sont de natures environnementales ou génétiques mais la probable combinaison de facteurs rend l'analyse des études complexes.

1. Facteurs environnementaux

L'hypothèse de l'incrimination des facteurs environnementaux a été étayée suite à la découverte de plusieurs cas de syndrome Parkinsonien, chez de jeunes adultes toxicomanes, après l'injection d'un mauvais lot de drogue synthétique identifié par la suite comme étant le 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), détruisant de façon sélective les neurones dopaminergiques de la substance noire (Davis *et al*., 1979 ; Langston *et al*., 1983). De plus, plusieurs cas de Parkinsonisme ont été reportés suite à l'exposition industrielle au MPTP (Langston et Balard, 1983 ; Barbeau *et al*., 1985 ; Burns *et al*., 1985).

De nombreuses études ont par la suite, dans de nombreux pays, étudiées la potentielle surexposition de patients atteints de la MP à des produits toxiques de types pesticides (Barbeau *et al*., 1987 ; Franco *et al*., 2010 ; Allen et Levy, 2013 ; pour revue : Baltazar *et al*., 2014).

2. Facteurs génétiques

Dans plus de 85% des cas la MP est de forme sporadique, mais un certain nombre d'études ont permis de mettre en évidence l'existence d'un facteur génétique unique impliqué dans environ 10% des cas (Duvoisin *et al*., 1986 ; de Silva *et al*., 2000 ; Mouradian *et al*., 2002). Les études réalisées chez les jumeaux monozygotes (Golbe *et al.*, 1990) ont mis en évidence l'association entre la MP et certaines mutations. De plus, pour certaines formes familiales de la MP, des mutations ponctuelles des gènes de l'α-synucléine (Polymeropoulos *et al.*, 1997; Papadimitriou *et al.*, 1999; Kruger *et al.*, 1998), de l'ubiquitine carboxy-terminal hydrolase-L1 (Leroy *et al*., 1998) ou encore de la Parkine (Kitada *et al*., 1998) ont été identifiée. Les modes de transmission sont en majorité autosomiques dominantes mais peuvent être récessives et la pénétrance est également variable. A ce jour, de nombreux *loci* ont été étudiés (noté PARK 1 à 20), avec pour chacun d'eux des caractéristiques et un syndrome Parkinsonien associé spécifiques (Tableau 1).

Locus	**Gène**	**Position**	**Transmission**	**Type de trouble**
PARK1	*SNCA*	4q21–22	Autosomique Dominante	Apparition précoce
PARK2	*Parkin*	6q25.2–27	Autosomique Récessive	Apparition précoce
PARK3	*?*	2p13	Autosomique Dominante	Classique
PARK5	*UCHL1*	4p14	Autosomique Dominante	Classique
PARK6	*PINK1*	1p35-36	Autosomique Récessive	Apparition précoce
PARK7	*DJ-1*	1p36	Autosomique Récessive	Apparition précoce
PARK8	*LRRK2*	12q12	Autosomique Dominante	Classique
PARK9	*ATP13A2*	1p36	Autosomique Récessive	Syndrome de Kufor-Rakeb
PARK10	*?*	1p32	Facteur de risque	Classique
PARK11	*?*	2q36–37	Autosomique Dominante	Apparition tardive
PARK12	*?*	Xq21–25	Facteur de risque	Classique
PARK13	*HTRA2*	2p12	Autosomique Dominante ou Facteur de risque	Classique

PARK14	*PLA2G6*	22q13.1	Autosomique Récessive	Apparition précoce de dystonie-Parkinson
PARK15	*FBX07*	22q12–13	Autosomique Récessive	Apparition précoce du syndrome pyramidal-Parkinson
PARK16	*?*	1q32	Facteur de risque	Classique
PARK17	*VPS35*	16q11.2	Autosomique Dominante	Classique
PARK18	*EIF4G1*	3q27.1	Autosomique Dominante	Classique
PARK19	*DNAJC6*	1p31.3	Autosomique Récessive	?
PARK20	*SYNJ1*	21q22.11	Autosomique Récessive	?

Tableau 1 : Caractéristiques des formes génétiques associées à la MP (modifié d'après Lubbe et Morris, 2014 ; Valadas *et al*., 2015).

D. Manifestations cliniques de la MP

La MP a la particularité dramatique de ne pas se manifester dès l'apparition de la perte neuronale mais après une chute de 50% du nombre de neurones dopaminergiques de la SNpc associée à une diminution de 80% des taux de DA au niveau du striatum (Kish *et al.,* 1988, Scherman *et al.,* 1989, Fearnley et Lees, 1990). Les signes cliniques apparaissent donc de façon progressive et la plupart des patients voient leurs symptômes évoluer au fur et à mesure des années. Cliniquement, la MP n'affecte pas tous les patients de la même façon mais il est fréquent d'observer la triade de symptômes caractéristiques que sont les tremblements au repos, l'akinésie, et l'hypertonie (Fahn, 2003; Hamani et Lozano, 2003), ainsi que d'autres symptômes tels que l'instabilité posturale ou les troubles de l'équilibre.

Les tremblements de repos sont présents dans 60 à 70 % des cas (Rajput *et al*., 1991 ; Hughes *et al*., 1993) et sont de manière générale, unilatéraux. Ils affectent principalement les bras, les jambes et la tête (lèvres, langue). Les tremblements ne sont pas présents au cours du mouvement volontaire et suivent une oscillation régulière.

L'akinésie est souvent désignée comme étant le terme clinique englobant trois symptômes dont l'akinésie proprement dite correspondant au défaut d'initiation du mouvement automatique et volontaire, la bradykinésie qui reflète le ralentissement de

l'exécution de ce mouvement et enfin l'hypokinésie qui correspond à une diminution de l'amplitude du mouvement (Marsden, 1989). Ces symptômes rendent l'exécution des actes moteurs volontaires et répétitifs de la vie courante réalisés par les membres supérieurs très délicate. Au niveau des membres inférieurs, on observe chez les patients une raideur et une lenteur de la marche. Ces ralentissements sont également présents au niveau des muscles de la face entrainant la perte des expressions du visage, une voix monotone et des problèmes oculaires.

L'hypertonie également nommée rigidité est liée à une augmentation excessive du tonus musculaire, notamment des muscles fléchisseurs, entrainant une raideur des membres ainsi que du rachis et est responsable par conséquent de l'attitude fléchie et courbée des patients. L'hypertonie est homogène et continue, elle ne s'accentue pas suite à l'augmentation de la vitesse ou de la force d'étirement exercée mais va céder par à-coup successifs entrainant des évènements caractéristiques du phénomène de « roue-dentée ».

II. Physiopathologie de la MP

Les manifestations cliniques de la MP observées précédemment résultent de deux facteurs importants, développés dans la suite de ce chapitre:

- la dégénérescence progressive, continue et relativement sélective des neurones dopaminergiques de la SNpc.

- la présence d'inclusions cytoplasmiques (nommé « corps de Lewy ») au sein des neurones restants de la SNpc.

A. Dégénérescence des neurones dopaminergiques : impact sur les ganglions de la base

Les noyaux gris centraux, désormais dénommés système des ganglions de la base, sont un ensemble de structures (ou noyaux) sous-corticales, définies comme jouant un rôle clé

dans la motricité (et en particulier dans la modulation du mouvement et du contrôle de la posture), ainsi que dans les processus cognitifs impliquant la motivation, l'émotion ou l'apprentissage (Graybiel *et al*., 1994). Ces noyaux sont interconnectés fonctionnellement et ont également la possibilité de former des boucles récurrentes avec de nombreuses autres structures comme le cortex ou le thalamus. On retrouve dans les ganglions de la base une division dorsale qui est chez l'homme, composée du noyau caudé-putamen (nommé striatum dorsal chez le rongeur), des globus pallidum externe et interne respectivement abrégés GPe et GPi, du noyau sous-thalamique (NST) et de la substance noire (SN). La SN est une structure elle-même divisée en deux noyaux distincts : la substance noire *pars compacta* en position dorsale, et la substance noire *pars reticulata* (SNpr) en position ventrale. A ces noyaux viennent s'ajouter le noyau accumbens (NA_C) et l'aire tegmentale ventrale (VTA pour ventral tegmental area) appartenant à la division ventrale des ganglions de la base et assurant plus particulièrement l'ensemble des fonctions limbiques. Ces structures sont interconnectées formant une boucle cortico-corticale (Figure 1).

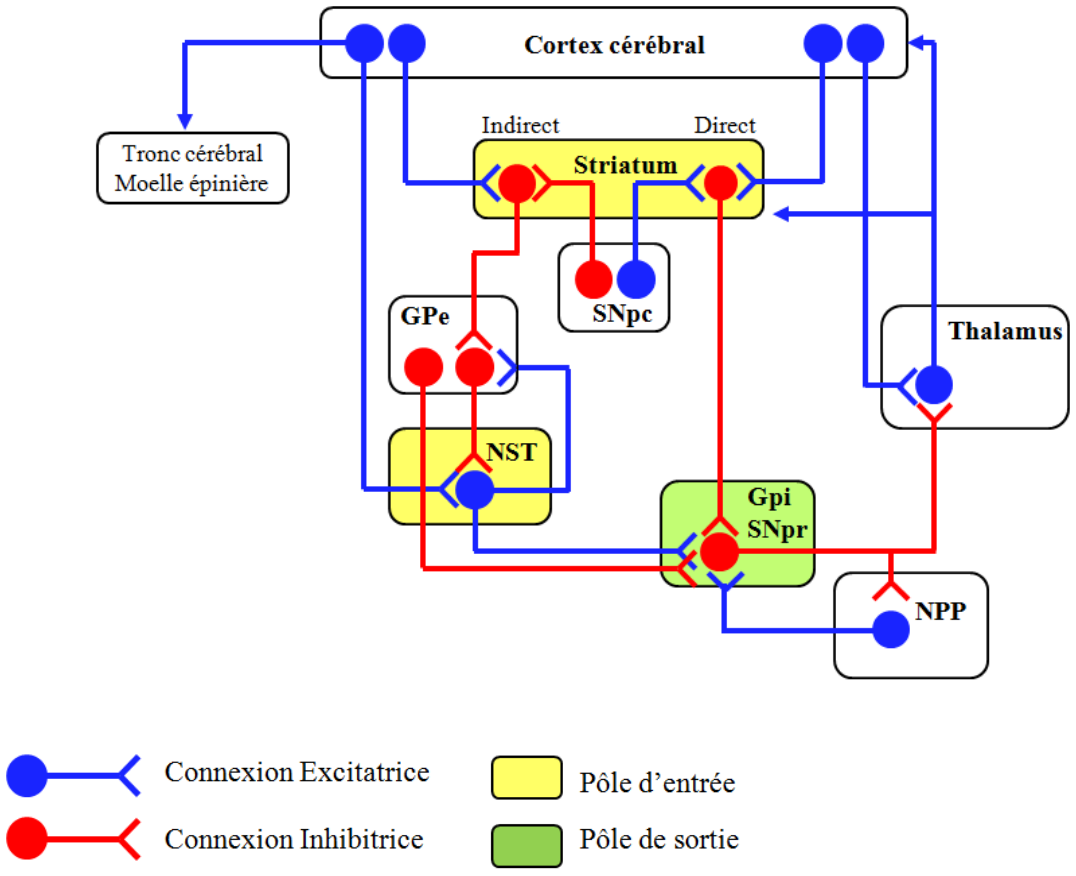


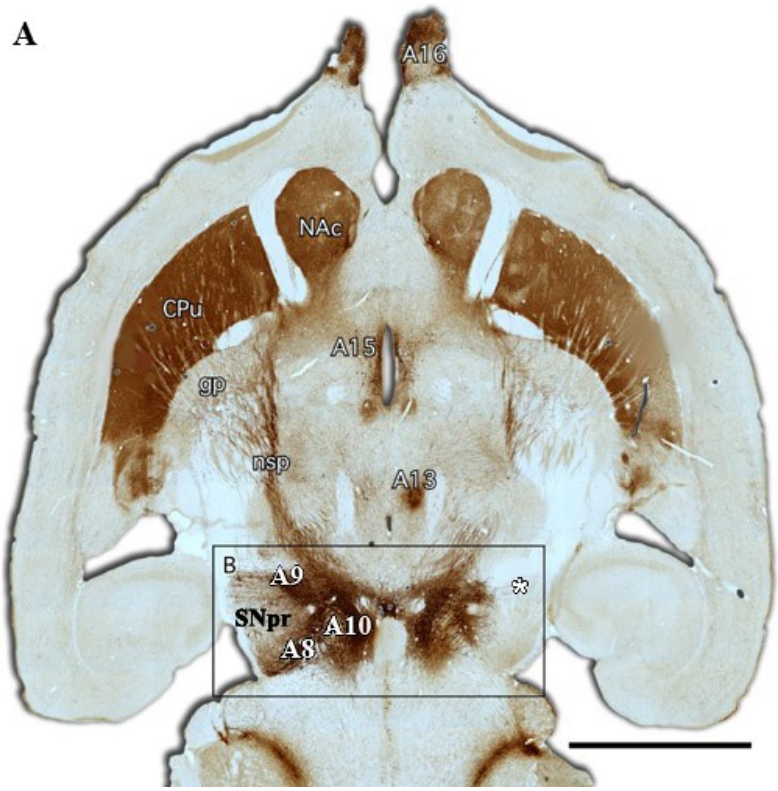
Figure 1 : Représentation schématique des relations fonctionnelles des structures des ganglions de la base. Les connexions excitatrices sont ici en rouge et inhibitrice en bleu. Les cadres jaunes représentent les structures d'entrées des ganglions de la base, le cadre vert la structure de sortie. Gpi : Globus pallidum interne ; Gpe : Globus pallidum externe ; NPP : Noyau pédonculopontin ; NST : Noyau sous-thalamique ; SNpc : Substance noire *pars compacta* ; SNpr : Substance noire *pars reticulata*.

Afin de mieux comprendre l'organisation générale de ce système complexe ainsi que les conséquences générées par la perte des neurones dopaminergiques dans le cadre de la MP, il est nécessaire de décrire les différentes populations neuronales composant la voie nigro-striée ainsi que leurs caractéristiques associées.

1. La substance noire et les neurones dopaminergiques du mésencéphale

a) Considérations neuroanatomiques

On décrit généralement l'ensemble des noyaux de neurones dopaminergiques en accord avec leur localisation au sein du mésencéphale, disposée selon un plan médio-latéral, et reflétant majoritairement le positionnement de leurs efférences ainsi que leurs caractéristiques chimiques. Les trois noyaux principaux du mésencéphale dont les neurones contiennent de la DA sont les neurones i) de type A8 de l'aire rétrorubrale, situés dans la partie dorsale et latérale de la SNpc, ii) de type A9 de la substance noire qui s'étendent de la limite de la VTA jusqu'en partie latérale et iii) de type A10 de la VTA dans la partie ventromédiale du mésencéphale (Figure 2). Bien que les projections de ces noyaux semblent contacter spécifiquement leurs régions cibles en empruntant leurs voies de projections propres, il existe un petit nombre de neurones capables de projeter sur d'autres aires que celles théoriquement admises. Nous mentionnerons cependant en terme de généralité que les neurones du noyau A10 s'étendent vers les aires corticales limbiques telles que le cortex préfrontal, le septum ou encore le NAc tandis que les types A8 et A9 projettent vers différentes régions du striatum (Bjorklund et Lindvall, 1984).

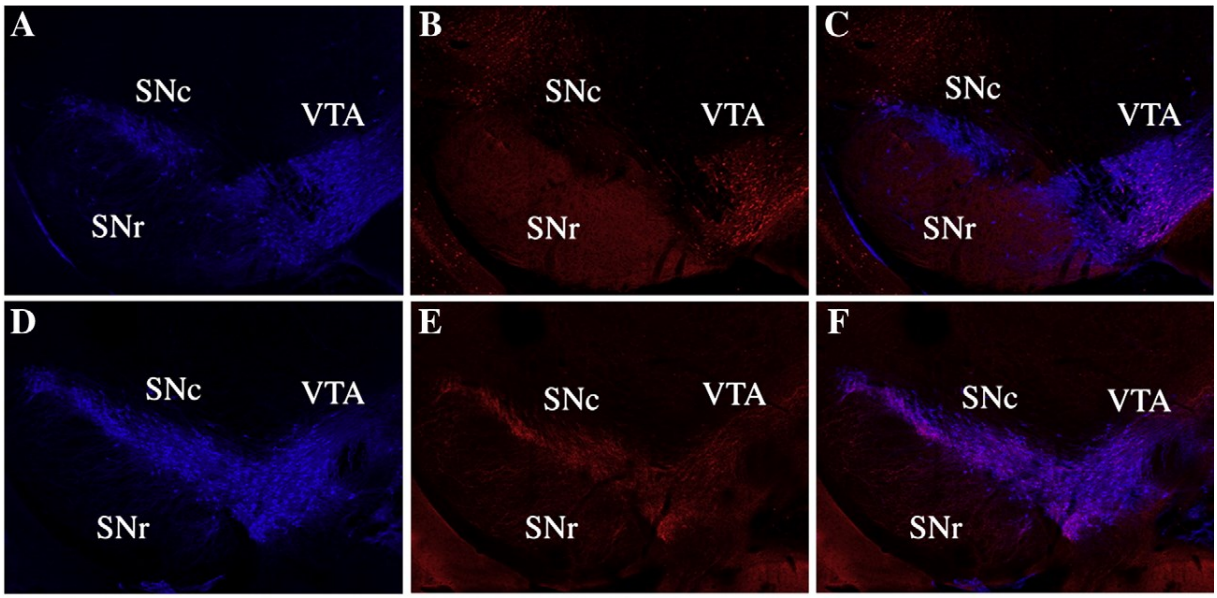


<u>Figure 2 :</u> Neuroanatomie du système de projection des neurones dopaminergiques du mésencéphale. Immunohistochimie de la tyrosine hydroxylase d'une coupe horizontale de cerveau de souris présentant les neurones dopaminergiques et leurs projections (A). Les différents noyaux de neurones dopaminergiques (A8, A9, A10) sont présents dans l'encadré (B). Il est a noter que l'animal a subit une lésion unilatérale partielle de la voie nigro-striée à la 6-hydroxydopamine ( ) mettant en évidence la perte des neurones dopaminergiques de la région A9 ainsi que de leurs projections associées. Barre d'échelle : 2 mm ; CPu : Striatum; gp : Globus pallidum; NAc : Noyau accumbens; nsp : Voie nigro-striée; SNpr : Substantia nigra *pars reticulata*. Adapté de Thompson et Bjorklund, 2012.

En parallèle de ces informations, il est important de rappeler que la SN est une structure assez large scindée en deux parties dont les projections et les neurotransmetteurs sont distincts.

En position ventrale se trouve la SNpr, sous-région projetant vers le thalamus principalement et possédant une faible densité cellulaire. Elle est composée de neurones libérant l'acide γ-aminobutyrique (GABA) dont les dendrites sont capables chez le primate, de couvrir une surface très étendue de plus de 60% de la surface totale de la SNpr (François *et al*., 1987).

En position dorsale se trouve la SNpc qui contrairement à de la SNpr, est fortement pourvue de neurones dont les corps cellulaires assez larges et pictés de grains noirs (mélanine) chez le primate, sont à l'origine du nom de la structure. Ces neurones dopaminergiques de la SNpc se distinguent (Figure 3) à la fois de par leur morphologie (corps cellulaires larges et angulaires) ainsi que de par l'expression pratiquement exclusive du canal potassique à rectification entrante lié aux protéines G (Girk2) (Schein *et al*., 1998; Inanobe *et al*., 1999 ; Mendez *et al*., 2005 ; Thompson *et al*., 2005). De plus, dans le cadre de notre étude, ils sont également connus pour être les seuls à posséder la capacité de ré-innerver correctement le striatum à la suite d'une transplantation (Schultzberg *et al*., 1984 ; Haque *et al*., 1997 ; Bjorklund et Isacson, 2002 ; Gaillard *et al.,* 2009). A l'inverse, une très large majorité des neurones dopaminergiques provenant de la région A10 présente une morphologie ronde et de petite taille, et exprime la calbindine (Rogers *et al*., 1992 ; Liang *et al*., 1996 ; Mendez *et al*., 2005 ; Thompson *et al*., 2005).



<u>Figure 3 :</u> Observation des différents sous-types de neurones dopaminergiques du mésencéphale ventral. Les neurones dopaminergiques du mésencéphale co-exprimant la TH (bleu) avec la calbindine (rouge) de A à C, ou Girk2 (en rouge) de D à F. Il est important de noter que l'expression de la calbindine se trouve principalement au niveau de la VTA contrairement au Girk2 se situant principalement au niveau de la substance noire *pars compacta*. SNc : Substance noire *pars compacta* ; SNr : Substance noire *pars reticulata* ; VTA : aire tegmentale ventrale. D'après Gaillard *et al*., 2009.

b) Considérations électrophysiologiques

La plupart des neurones dopaminergiques du mésencéphale sensibles aux agonistes de la DA présentent un potentiel d'action long (Wang, 1981), à l'activité soit spontanée (pour environ 98%) soit silencieuse (Dai et Tepper, 1998). Les potentiels d'action de ces neurones surviennent de façon individuelle avec un patron de décharge lent et irrégulier nommé « single spike », ou selon un patron de décharges regroupées en bouffées nommé « burst ». En ce qui concerne les neurones à activité individuelle, c'est l'alternance des deux courants i) de dépolarisation lente et spontanée et ii) de l'augmentation de la conductance potassique entrainant une post-hyperpolarisation (Grace et Bunney, 1984) qui provoque ce patron de décharge. A l'inverse, une hausse de l'entrée de calcium bloquant la conductance potassique va impliquer ces décharges caractéristiques en « bouffées » (Grace et Bunney, 1984). Il est envisagé que l'alternance de ces patrons de décharges favoriserait la libération de DA (Gonon, 1988) et permettrait une certaine régulation des régions cibles de ces neurones (Freeman *et al*., 1985).

2. Le striatum

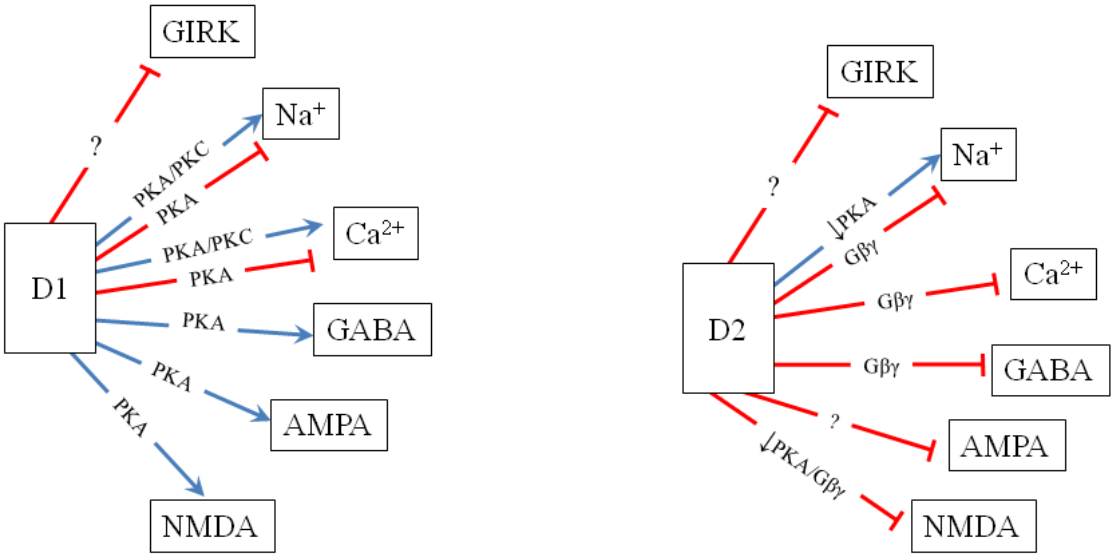
a) Neurones épineux de taille moyenne

i) Considérations neuroanatomiques

La population neuronale constituant à plus de 90% le striatum est le neurone épineux de taille moyenne (NEM) (Dubé *et al*., 1988). Ces neurones de projections dont le stroma mesure 10 à 20 µm de diamètre possèdent des dendrites en arborisation sphérique couvertes d'épines (Figure 5A). Leurs axones pouvant s'étendre jusqu'à 300 µm autour du stroma se projettent en collatérales locales et forment les deux voies, directes (ou striato-nigrale) contactant la SNpr et le Gpi, et indirecte (ou striato-pallidale) contactant le GPe. Les neurones de projections du striatum sont GABAergiques mais peuvent exprimer des protéines voir même des combinaisons protéiques (Penny *et al*., 1986) différentes en fonction de leur appartenance à la voie directe ou indirecte (Somogyi et Smith, 1979 ; Le Moine et Bloch, 1995). En effet, les neurones de la voie directe expriment les récepteurs dopaminergiques de type D1 (ainsi que non exhaustivement la substance P et la dynorphine) tandis que les neurones de la voie indirecte expriment les récepteurs de type D2 (de même que l'enképhaline) (DiFiglia *et al*., 1976 ; Kawaguchi *et al*., 1989).

Ces deux types de récepteurs font en réalité partie d'une famille de cinq sous-types de récepteurs dopaminergiques (nommés D1 à D5), codés par 5 gènes distincts (pour revue : Jaber *et al*., 1996) et constitués de protéines présentant une structure en hélice à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G hétérotrimérique. Il a été mis en évidence une différence de distribution entre ces 2 types de récepteurs au sein des ganglions de la base. En effet, les récepteurs D1 sont fortement exprimés au niveau du striatum par les NEM. De même, ils sont retrouvés au sein de la SNpr et du GPi. En dehors des ganglions de la base, les récepteurs D1 sont également présents dans d'autres structures telles que les bulbes olfactifs, le cortex cérébral, l'hippocampe ou le cervelet (pour revue : Andersen *et al*.,1986 ; Jensen *et al*., 1996). Les récepteurs D2 sont quant à eux majoritairement retrouvés au niveau du striatum (exprimés par les NEM de la voie striato-pallidale) et également présents au niveau des régions des bulbes olfactifs, du cortex ou du NAc.

En plus d'une distribution différente au sein des ganglions de la base, l'activation de ces récepteurs est également variable (pour revue : Jaber *et al*., 1996 ; Beaulieu et Gainetdinov, 2011). En effet, la transduction du signal enclenchée par l'activation des récepteurs D1 passe par l'intermédiaire des protéines $G\alpha_{s/olf}$ et $G\alpha_q$ tandis que celle des récepteurs D2 par l'intermédiaire des protéines $G\alpha_{i/o}$ et $G\beta\gamma$. Ce mode d'action différent permet à ces deux familles de récepteurs de moduler l'activité des canaux potassiques, et en particulier celle des GIRK, les canaux sodiques, calciques et glutamatergiques (acide N-méthyl D-aspartique (NMDA), acide α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique (AMPA)) (Pour revue : Nene *et al*., 2004). La majeure partie des modulations (stimulation ou inhibition) en relation avec l'activation des récepteurs dopaminergiques est répertoriée dans la Figure 4.



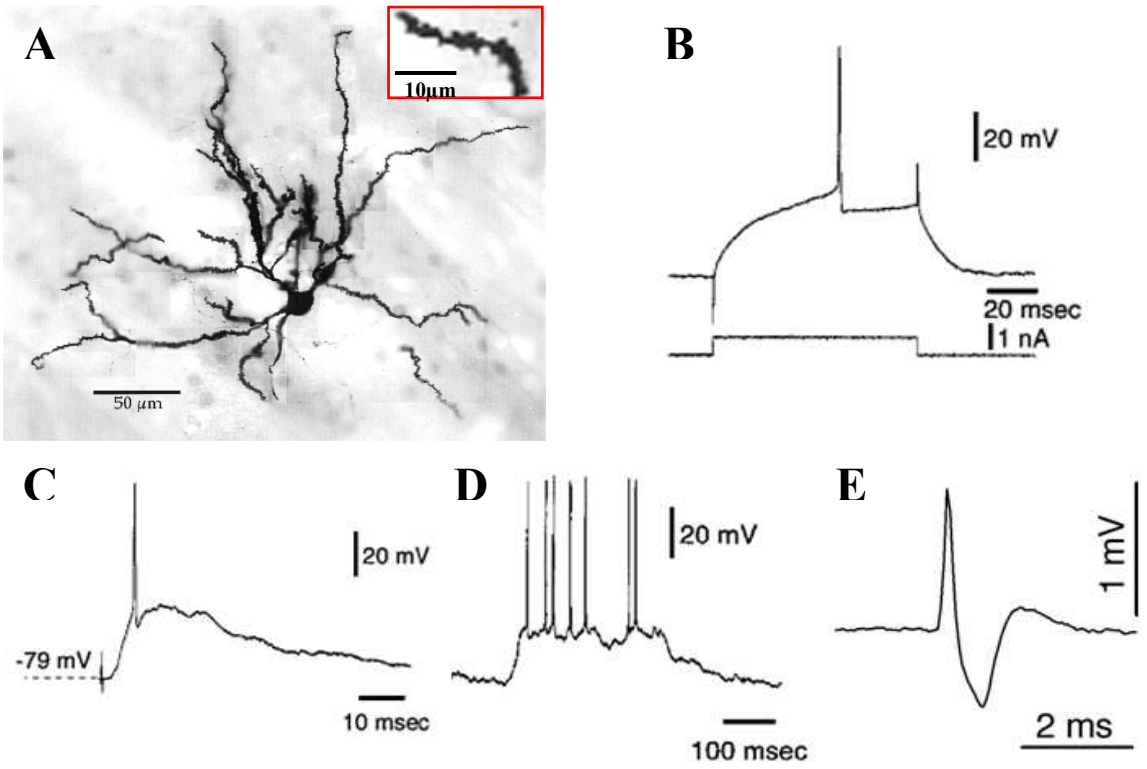
<u>Figure 4 :</u> Régulation des canaux ioniques par les récepteurs dopaminergiques D1 (à gauche) et D2 (à droite). Effet de la stimulation (en bleu) ou de l'inhibition (en rouge) mis en jeu par les récepteurs dopaminergiques sur les récepteurs GABA, les récepteurs NMDA au glutamate (NMDA), les récepteurs au glutamate AMPA (AMPA), les canaux calciques (Ca^{2+}), les canaux sodiques (Na^{+}) et les canaux potassiques rectifiant activés par les protéines G (GIRK). L'ensemble de ces effets sont modulés par la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase C (PKC) la protéine G et ses sous-unités βγ ($G_{\beta\gamma}$). Adapté de Neve *et al*., 2004.

ii) <u>Considérations électrophysiologiques</u>

Une partie de ce projet étant consacrée à la mesure de l'activité des NEM après transplantation de neurones dopaminergiques embryonnaires au niveau du striatum ou de la SNpc dans notre modèle animal de la MP lésées unilatéralement à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA), nous allons développer brièvement certaines des propriétés électrophysiologiques des neurones du striatum, en particulier des NEM (Figure 5).

Il a été admis que l'activité spontanée des NEM est caractérisée in vivo par un potentiel de membrane fluctuant d'un état de repos très hyperpolarisé nommé « état bas » à un plateau dépolarisant « état haut » conduit par les afférences corticales (Wilson, 1993 ; Tseng *et al*., 2001). La décharge des potentiels d'actions ne survenant uniquement qu'au cours de ces « états hauts », la dépolarisation en plateau est perçue comme un phénomène favorable au contrôle du traitement de l'information notamment par les afférence corticales (Muller *et al*.,

2002). Cette phase de plateau, indispensable à la formation du potentiel d'action, provient de la convergence de l'excitation des afférences corticales, thalamiques ainsi que de l'excitation des interneurones GABAergiques (Wilson et Kawaguchi, 1996). De plus, ces transitions d'états sont caractéristiques des NEM et sont à la base du modèle cellulaire des processus physiologiques et pathologiques du striatum.



<u>Figure 5 :</u> Morphologies et propriétés électrophysiologiques des NEM. (A) Morphologie d'un NEM. L'encadré rouge présente le grossissement des épines dendritiques du neurone. (B) Enregistrement intracellulaire *in vivo* de la réponse d'un NEM obtenu à la suite d'une dépolarisation / hyperpolarisation. On notera ici la lente dépolarisation en plateau caractéristique des NEM suivie du déclenchement du potentiel d'action. (C) Enregistrement intracellulaire d'un NEM présentant la décharge d'un potentiel d'action en réponse à une stimulation corticale (D) Enregistrement intracellulaire de l'activité spontanée d'un NEM. On notera ici une fluctuation du potentiel de membrane entre un état « haut » et « bas ». La décharge du potentiel d'action ne survient qu'au cours d'un état « haut ». (E) Potentiel d'action d'un NEM obtenu au cours d'un enregistrement extracellulaire *in vivo*. (A-D) Adaptés de Wickens et Wilson, 1998 ; (E) D'après Mallet *et al*., 2006.

b) Les interneurones

Le reste de la population neuronale du striatum est constitué d'interneurones. Ce type cellulaire peut-être classifié en de multiples catégories et sous-catégories en fonction de l'expression de leurs protéines et de leurs propriétés électrophysiologiques. La sous-population d'interneurones majoritaire du striatum est constituée d'interneurones GABAergique (environ 3% des neurones du striatum) exprimant différents peptides. Nous pouvons également mentionner la présence d'interneurones cholinergiques à large stroma (entre 20 et 60 μm) et à arborisation dense qui constituent moins de 2% de la population striatale (Lapper et Bolam, 1992). Ces derniers représentent l'unique source cholinergique du striatum dont les projections peuvent entrer en contact avec les deux voies de sortie des ganglions de la base (Salin *et al*., 2009).

Nous avons précédemment décrit de façon précise les composantes de la voie nigro-striée, mais il est cependant important de mentionner l'existence d'autres voies dopaminergiques appartenant aux ganglions de la base. En effet, bien que ces derniers soient considérés comme une vaste boucle cortico-corticale, ils sont néanmoins composés de différentes voies de projections dont la voie méso-limbique, la voie méso-corticale, la voie nigro-striée et la voie tubéro-infundibulaire (Figure 6). Le réseau formé par ces voies dopaminergiques permet alors d'intégrer, de réguler et d'exécuter les fonctions primordiales que sont la motricité, la motivation, le sommeil, la mémorisation, le comportement ou la cognition.

- La voie **méso-limbique** à pour origine la VTA et projette vers la région ventrale du striatum : le NAc, le tubercule olfactif, l'amygdale ou encore l'hippocampe. Cette voie est classiquement associée aux systèmes de récompense, de motivation et intervient dans les phénomènes d'addiction.
- La voie **méso-corticale** est souvent associée à la voie méso-limbique formant ainsi la voie **méso-cortico-limbique.** Elle prend principlalement sa source au niveau de la VTA et dans une moindre partie au niveau de la SNpc. Cette voie projette en direction du cortex frontal, préfrontal, ou encore cingulaire et est impliquée dans le contrôle des fonctions exécutives.
- La voie **nigro-striée**, dont les neurones dopaminergiques sont situés principalement au sein de la SNpc, innerve le striatum par la projection d'axones le long du faisceau

médian du télencéphale. Cette voie est impliquée dans la régulation et le contrôle des fonctions motrices et est particulièrement touchée dans de cas de la MP.

- Enfin, la voie **tubéro-infundibulaire** prend naissance au niveau de l'hypothalamus pour se diriger vers l'éminence médiane. La libération de DA au niveau de cette voie intervient au niveau de l'hypophyse antérieure et permettre le contrôle hormonal en régulant les niveaux de prolactine.

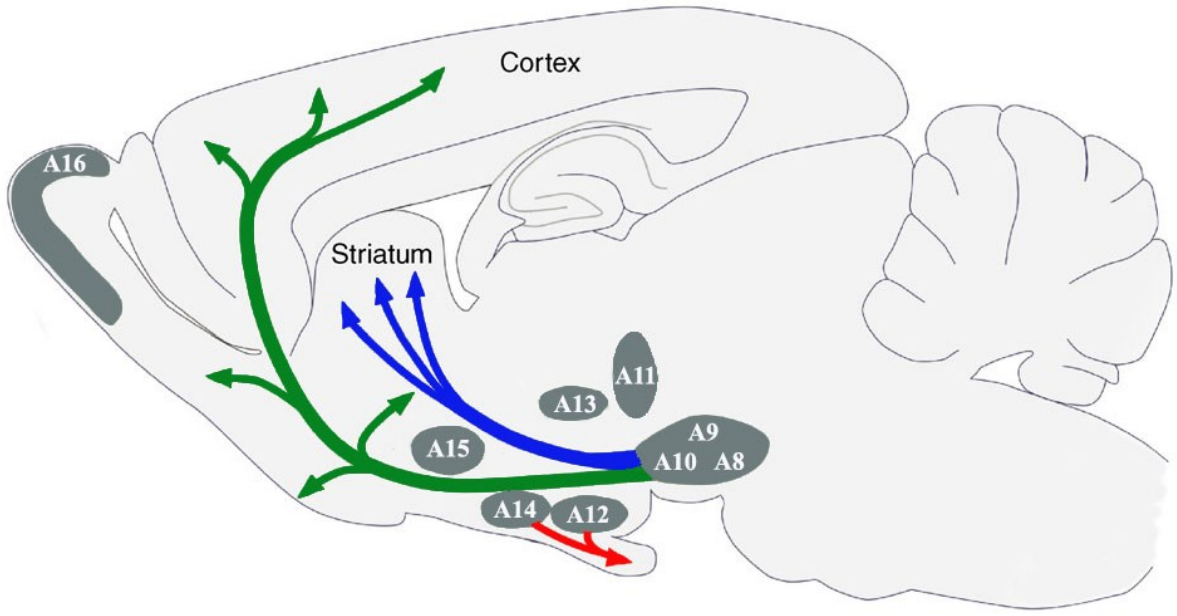


Figure 6 : Distribution des neurones dopaminergiques et représentation des principaux systèmes de projection chez le rongeur adulte. Les noyaux dopaminergiques principaux sont représentés dans les régions grises. Les flèches partant de ces noyaux dopaminergiques représentent les principales projections dopaminergiques composant la voie méso-cortico-limbique (en vert), la voie nigro-striée (en bleu) et la voie tubéro-infundibulaire (en rouge). Adapté de Bjorklund et Dunnett, 2007.

A partir de l'ensemble de ces informations il est maintenant possible de décrire en détail la connectivité des ganglions de la base en condition physiologique puis à l'état Parkinsonien.

3. Connectivité des ganglions de la base en condition physiologique

Selon le modèle dit « classique » établit pour la première fois par Alexander et Crutcher (Alexander *et al*., 1986 ; Alexander *et al*., 1990), le striatum constitue la voie

d'entrée des ganglions de la base, recevant majoritairement des afférences glutamatergiques du cortex cérébral et du thalamus ainsi que des afférences dopaminergiques provenant de la SNpc (Figure 7). Deux voies efférentes du striatum sont alors possibles : la voie directe ou la voie indirecte (Albin *et al*., 1989).

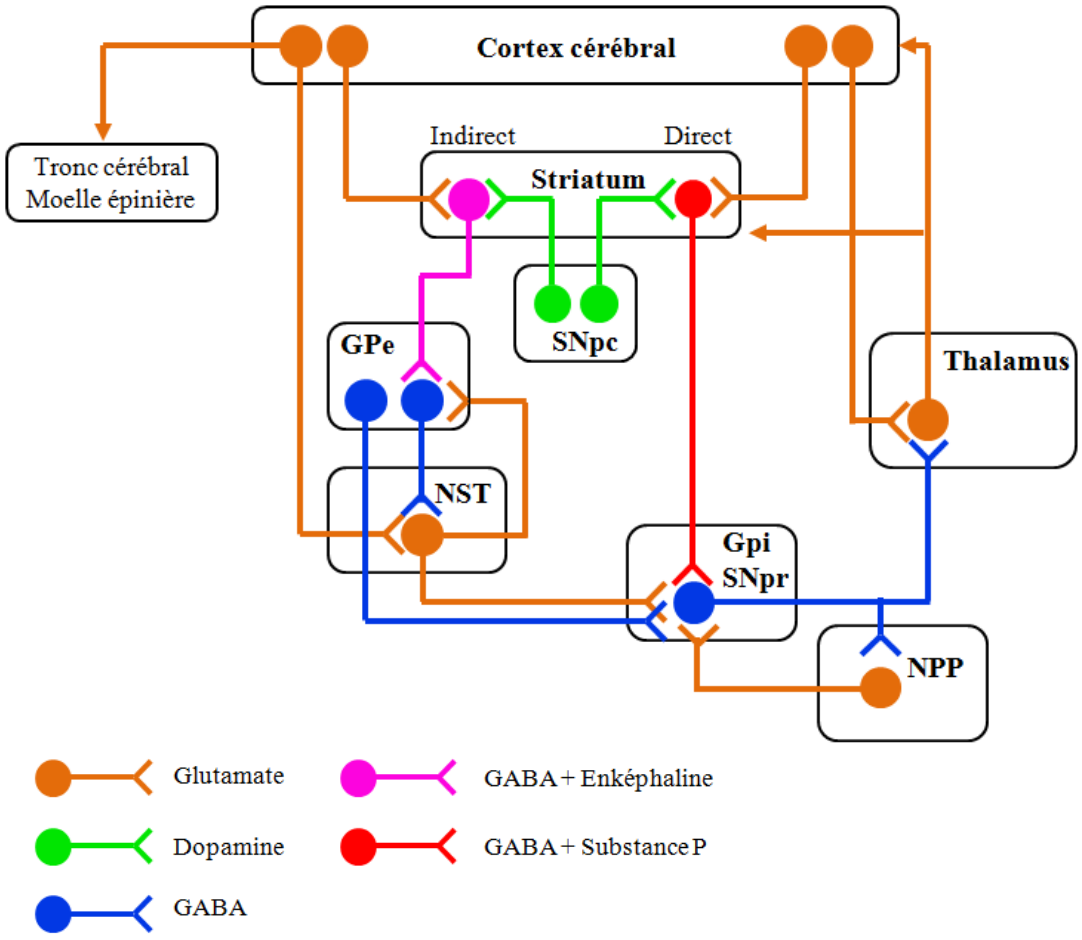
Les afférences glutamatergiques corticales activent les neurones épineux de taille moyenne (NEM) qui projettent sur la SNpr et le Gpi constituant la voie directe. Ces NEM GABAergiques exercent une action inhibitrice sur les neurones SNpr eux-mêmes également GABAergiques. Cette inhibition conduit à une levée d'inhibition des neurones glutamatergiques du thalamus projetant sur le cortex et conduisant, en fin de chaine à un mouvement locomoteur (Gerfen, 1992).

A l'inverse, l'activation des NEM striato-pallidaux projetant de façon indirecte vers la SNpc *via* le GPe et le NST (constituant donc la voie indirecte), inhibent les neurones GABAergiques du GPe, conduisant à une désinhibition des neurones glutamatergiques du NST (Figure 7). L'augmentation de décharge de ces derniers, qui sont excitateurs entraine l'activation des neurones GABAergiques projetant vers le thalamus et *in fine* à la réduction du mouvement (Gerfen, 1992).

De plus, les NEM du striatum sont caractérisés par l'expression de récepteurs dopaminergiques distincts, fonctions des voies directes ou indirectes. En effet, comme il a été vu précédemment, la voie directe met en action des récepteurs dopaminergiques de type D1. A l'inverse, l'inhibition des neurones GABAergiques passe par l'intermédiaire des récepteurs dopaminergiques de type D2 (Figure 7). Cette distinction neurobiologique est considérée comme le support de la subdivision des effets d'activation des voies directe et indirecte.

En conclusion, ce modèle permet d'expliquer le contrôle du mouvement d'une part, par l'activation de la voie directe facilitant le mouvement par désinhibition de la voie thalamo-corticale et d'autre part, par l'activation de la voie indirecte produisant l'effet inverse. Il est admis que l'équilibre entre ces deux voies est maintenu par l'innervation dopaminergique émanant de la SNpc (par l'intermédiaire en particulier des récepteurs D1 et D2). Dans le cadre de la MP, la dégénérescence de ces neurones dopaminergiques provoque un déséquilibre entre ces deux voies et plus précisément, une hypoactivité de la voie directe ainsi qu'une levée d'inhibition du NST, phénomènes tous deux conduisant à l'inhibition de la sortie thalamo-corticale et donc du mouvement.

Il est à noter toutefois que ce modèle « classique » a beaucoup évolué au travers des nombreux travaux réalisés depuis 1986 et que de multiples éléments ont complété par la suite ce schéma. Nous noterons en particulier que les récepteurs de la famille D1 et D2 sont de nombreuses fois colocalisés sur les mêmes neurones du striatum. De plus, les phénomènes de libération somato-dendritiques ne limitent pas la libération dopaminergique au niveau du striatum et mais permettent des projetions vers d'autres structures des ganglions de la base comme les GPi et GPe, le NST ou la SNpr. Enfin, le modèle considérant le striatum comme l'unique voie d'entrée est reconsidéré après la découverte de projections glutamatergiques provenant du cortex cérébral vers le NST, le thalamus et même vers le tronc cérébral (Kitai et Deniau, 1981).



<u>Figure 7:</u> Schématisation des relations fonctionnelles des structures des ganglions de la base et des neurotransmetteurs mis en jeu. Gpi : Globus pallidum interne ; Gpe : Globus pallidum externe ; NPP : Noyau pédonculopontin ; NST : Noyau sous-thalamique ; SNpc : Substance noire *pars compacta* ; SNpr : Substance noire *pars reticulata*.

4. Connectivité des ganglions de la base en condition Parkinsonienne

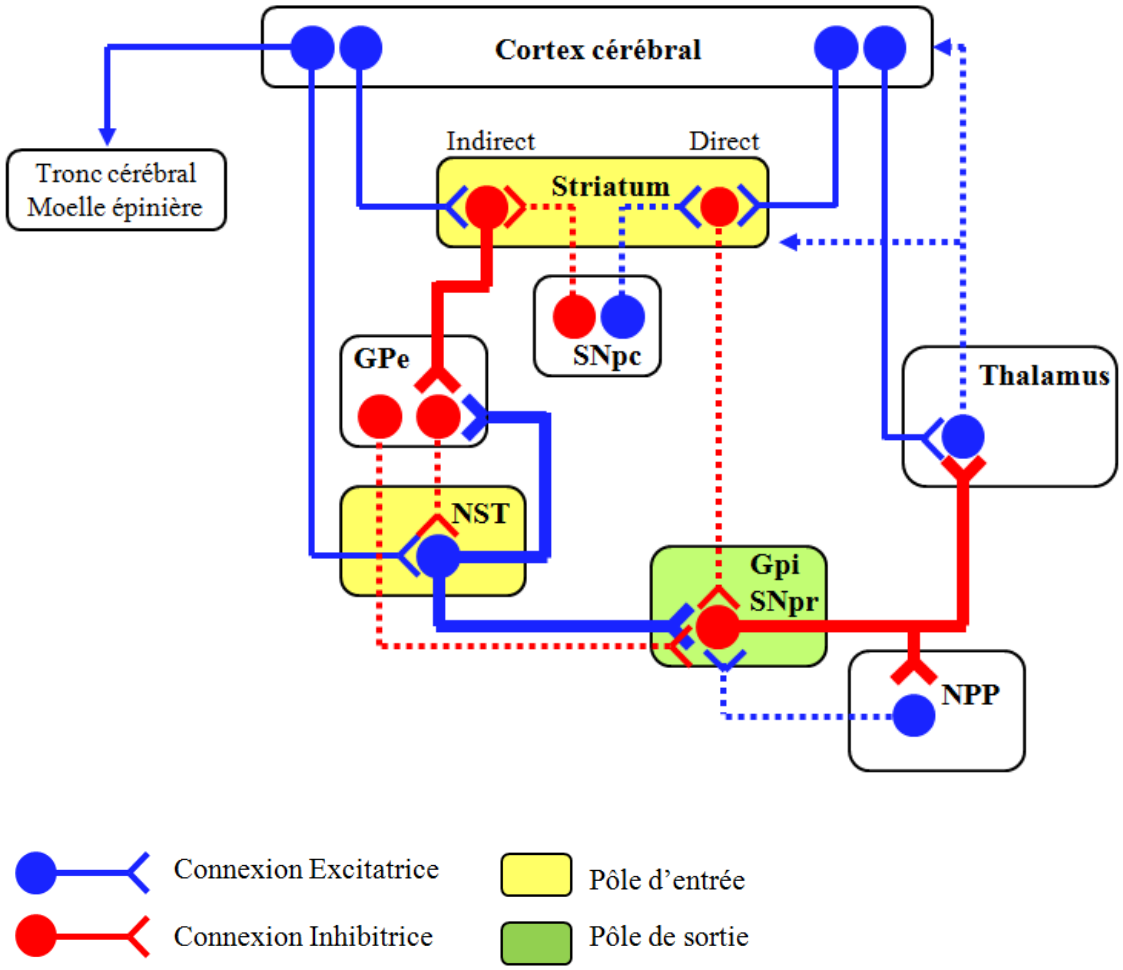
De manière générale chez un patient Parkinsonien, la perte neuronale dans la SNpc est estimée à plus de 75% et la répartition de cette dégénérescence au sein même de cette structure est très hétérogène. En effet, au moment de l'apparition des symptômes, la perte de neurones dopaminergiques au niveau du tiers ventrolatéral de la SNpc est estimée entre 60 et 70 %, évoluant par la suite vers le tiers médian pour atteindre enfin le tiers dorsal (Fearnley et Lees, 1990 ; Lang et Lozano, 1998a). Cette dégénérescence neuronale au sein de la SNpc se traduit par une dénervation progressive de la voie nigro-striée avec *in fine*, la perte de plus de 80% des terminaisons dopaminergiques (Rajput *et al*., 1991 ; Hughes *et al*., 1992) ainsi que la réduction importante des niveaux de DA au niveau du striatum et notamment dans la région dorsolatérale du putamen (Fearnley et Lees, 1991).

De ce fait, au niveau du fonctionnement des ganglions de la base, la dégénérescence neuronale entraîne l'inhibition des voies directes et l'excitation des voies indirectes (Figure 8) soit, une régulation inverse de l'état normal. En effet, ces pertes de neurones dopaminergiques entrainent une hypoactivation des neurones de la voie directe exprimant le récepteur D1. Ceci entraine une levée de l'inhibition du Gpi et donc une hyperactivité de ce dernier ainsi que de la SNpr. L'hyperactivation de ces deux structures entraine alors une inhibition de la voie thalamo-corticale entrainant *in fine* une hypoactivation de cette voie facilitatrice du mouvement.

De plus, la voie indirecte est également touchée puisque l'absence de neurones dopaminergiques produit une hyperactivation des neurones exprimant les récepteurs D2 entrainant de ce fait, une hypoactivation du GPe, à l'origine de la levée d'inhibition des NST. Enfin, l'hypoactivation du GPe et l'hyperactivation des NST agissent de concert en hyperactivant les deux structures de sorties que sont le GPi et la SNpr conduisant à l'hyperactivité de la voie thalamo-corticale, inhibitrice du mouvement. Cette inhibition thalamique peut alors expliquer simplement la présence des divers symptômes moteurs tels que l'akinésie ou la bradykinésie.

Toutefois, les tremblements observés chez le patient ne sont quant à eux, pas réellement expliqués par la seule théorie décrite par Alexander et ses collaborateurs. C'est en 2004 que les travaux d'Hutchison ont apporté une explication à ces évènements, mettant en jeu des phénomènes oscillatoires circulant dans les ganglions de la base en l'absence de DA (Hutchison *et al*., 2004). Il développe l'idée selon laquelle des oscillations de basses

fréquences (< 10 Hz) émises par le cortex et dirigeant le NST entraineraient des effets anti-kinétiques. De plus, il suggère que dans un contexte Parkinsonien, la propagation des oscillations de hautes fréquences entrainant des effets pro-kinétiques serait supprimée.



<u>Figure 8 :</u> Schématisation des relations fonctionnelles des structures des ganglions de la base en condition Parkinsonienne. Les principales structures sont encadrées. Les connexions excitatrices sont en bleu et inhibitrice en rouge. En condition Parkinsonienne on observe la diminution (trait pointillé) ou l'augmentation (trait épaissit) des signaux excitateurs ou inhibiteurs des circuits. Les cadres jaunes représentent les structures d'entrées des ganglions de la base, le cadre vert la structure de sortie. On notera ici, en condition Parkinsonienne, que la dégénérescence des neurones DA de la SNpc entraine l'inhibition des voies directes et l'excitation des voies indirectes, état inverse du schéma classique. Gpi : Globus pllidum interne ; Gpe : Globus pallidum externe ; NPP : Noyau pédonculopontin ; NST : Noyau sous-thalamique ; SNpc : Substance noire *pars compacta* ; SNpr : Substance noire *pars reticulata*.

Visuellement, la dégénérescence des neurones dopaminergiques se traduit par une dépigmentation (Schrerer, 1939 ; Marsden *et al*., 1983) au niveau de la SNpc (Figure 9). En effet, ces neurones sont riches en neuromélanine (un pigment brun foncé/noir), marqueur naturel des neurones catécholaminergiques chez l'homme (Bazelon *et al*., 1967 ; Marsden *et al*., 1969).

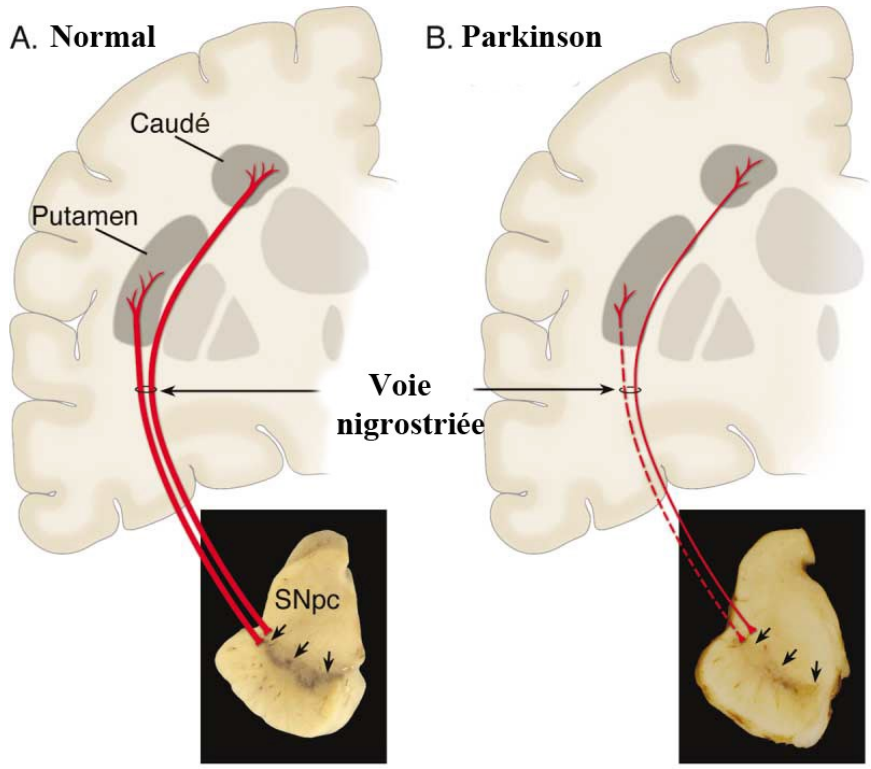


Figure 9 : Neuropathologie de la Maladie de Parkinson. Schématisation d'une coupe frontale de cerveau humain en condition normale en (A) : La voie nigro-striée est représentée en rouge, composée des projections des neurones dopaminergiques de la Substance noire *pars compacta* (SNpc) au niveau du striatum (soit ici les noyaux caudé et putamen). Les corps cellulaires de ces neurones DA de couleur brun foncé sont visualisables au niveau des flèches noires. On notera en (B) que dans le cadre de la maladie de Parkinson, une dépigmentation de la SNpc provoquée par la perte neuronale ainsi qu'une dégénérescence de la voie nigro-striée (lignes rouge plus fine et pointillée) sont observées. D'après Dauer et Przedborski, 2003.

La neuromélanine, présente dans le péricaryon des neurones est entourée d'une double membrane (Duffy et Tennyson, 1965) et le lien entre son accumulation dans les neurones dopaminergiques et la dégénérescence de ces derniers a de nombreuses fois été controversé (Ezrin-Waters et Resch, 1986 ; Hirsh et Dalton, 1988 ; Gibb *et al*., 1990 ; Aime *et*

al., 2000). De plus, certaines études mentionnent que la synthèse de neuromélanine serait le résultat de l'auto-oxydation de DA (Double *et al*., 2002 ; Sulzer *et al*., 2000) et agirait comme un mécanisme supplémentaire dans la régulation de la DA cytosolique.

La DA appartient à la famille des catécholamines (de même que la noradrénaline et l'adrénaline), découverte par G. Barger et J. Ewens en 1910. Cette petite molécule ne possède pas la capacité de traverser la barrière hémato encéphalique et c'est à partir de la tyrosine, son acide aminé précurseur, qu'elle pourra être synthétisée dans le cerveau. Classifiée uniquement de précurseur de la noradrénaline jusqu'à la fin des années 1950, son rôle propre de neurotransmetteur assurant la transmission dopaminergique dans le cerveau ne sera exposé qu'en 1957 par A. Carlsson et N.A. Hillarp (Carlsson *et al*., 1957). Les neurones dopaminergiques libérant la DA au niveau central ne représentent, au sein de la population neuronale du cerveau, qu'un faible pourcentage (0,3% environ) mais sont cependant responsables d'un grand nombre de pathologies lors d'un dysfonctionnement réduisant ou augmentant les taux de DA (MP, schizophrénie, trouble déficitaire d'attention avec hyperactivité).

La synthèse des catécholamines (Figure 10) débute à partir de la **L-tyrosine**. Elle peut provenir directement de l'alimentation, acheminée du milieu extracellulaire vers le cytoplasme cellulaire par un transporteur actif (Na^+ dépendant), ou provenir du foie *via* l'hydroxylation de la **L-phénylalanine**. Par la suite, la L-tyrosine peut être captée par les neurones dopaminergiques et hydroxylée par la tyrosine-hydroxylase (TH) en **L-dihydroxyphénylalanine** (L-DOPA). Cette première étape de la synthèse des catécholamines constitue, du fait de la saturation rapide de la TH, l'étape limitante de la biosynthèse des catécholamines (Nagatsu *et al*., 1964). Par la suite, la L-DOPA est décarboxylée en **DA** *via* la DOPA-décarboxylase nommée également décarboxylase des acides aminés aromatiques (AAAD). Il est à noter que cette enzyme n'est pas spécifique des neurones dopaminergiques et peut donc être retrouvée à la fois au niveau cérébral dans les neurones sérotoninergiques mais également au niveau périphérique dans les cellules hépatiques. De fait, cette deuxième étape est, dans le traitement de la MP par administration de L-DOPA, la cible pharmacologique d'inhibiteurs périphériques limitant la décarboxylation de la L-DOPA, permettant ainsi un apport plus important de DA au niveau du cerveau. La troisième étape de synthèse des catécholamines se poursuit par une β-hydroxylation de la DA en **noradrénaline** *via* la DA β-hydroxylase (β-H). A l'inverse des étapes précédentes se déroulant dans le cytoplasme des cellules, cette troisième étape est réalisée au sein de vésicules de sécrétion.

Enfin une quatrième et dernière étape se déroulant spécifiquement dans les neurones adrénergiques permet la N-méthylation de la noradrénaline en **adrénaline** par l'intermédiaire de la phényléthanolamine-N-méthyl-transférase (PNMT) (pour revue : Meiser *et al*., 2013).

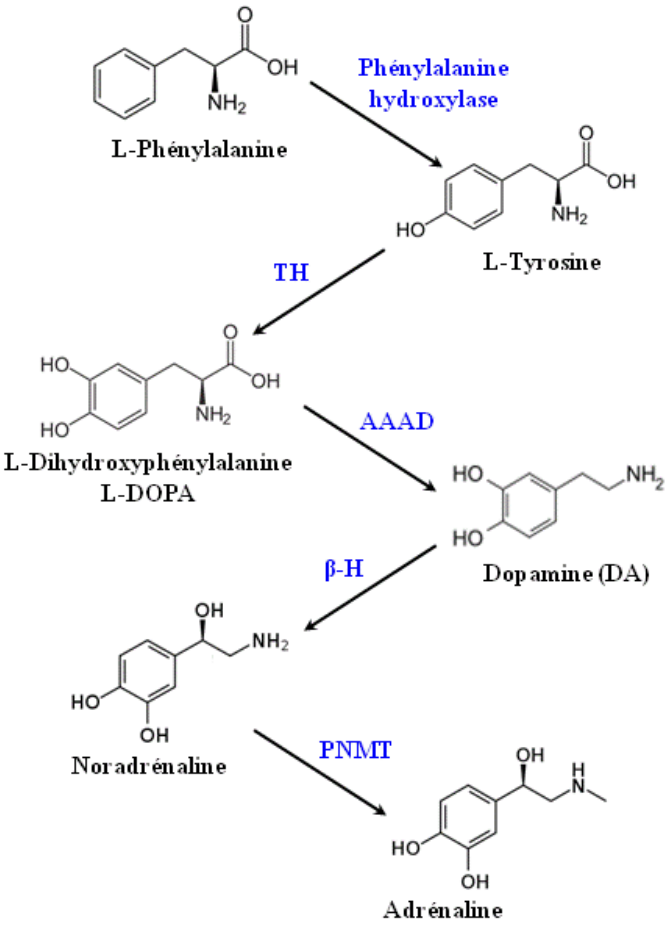


Figure 10 : Principale voie de biosynthèse des catécholamines. AAAD : Acides aminés aromatiques décarboxylase ; β-H : β-hydroxylase ; PNMT : Phényléthanolamine-N-méthyl-transférase ; TH : Tyrosine hydroxylase.

Une fois synthétisée, la DA se retrouve dans le compartiment cytosolique de la cellule et est, par l'intermédiaire d'un système de transport actif échangeant 2 protons contre une molécule de DA, internalisée dans des compartiments de stockage *via* le transporteur vésiculaires des monoamines 2 (VMAT-2) (Vergo *et al*., 2007). Cette internalisation de plus de 80% de la DA est nécessaire pour empêcher sa dégradation en acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (DOPAC) par la monoamine oxydase mitochondriale (MAO). C'est l'apparition d'un potentiel d'action qui va permettre la libération de la DA par exocytose. Cette libération de DA se fait non seulement au niveau des terminaisons de l'axone mais aussi

le long de cet axone, particularité du neurone dopaminergique pourvu de varicosités, ainsi qu'au niveau somatodendritique (Rice et Patel, 2015). La dépolarisation neuronale, permet la libération de la DA par exocytose au niveau de la fente synaptique, phénomène Ca^{2+} dépendant par entrée d'ions calcium (Kelly *et al*., 1993). Une très grande partie de cette DA libérée (plus de 80%) est rapidement recaptée par un transporteur sélectif présent au niveau de la membrane pré-synaptique des neurones dopaminergiques uniquement, le transporteur à la DA (DAT) (Ciliax *et al*., 1995). Ce transporteur à 12 domaines transmembranaires agit, de la même façon que l'ensemble des transporteurs de monoamines, selon un mécanisme actif Na^+/Cl^- dépendant dont la consommation d'énergie, est générée par la pompe Na^+/K^+ ATPase. Il est à noter également que ce transporteur DAT, très longtemps supposé impliquer uniquement dans la recapture, a démontré des propriétés de libération extracellulaire *via* un système plus lent Na^+ dépendant, contrôlant ainsi la régulation de l'homéostasie dopaminergique, supposée impliquer lors de dysfonctionnement dans la MP (Leviel, 2001). Enfin, nous ajouterons que la recapture de la DA est nécessaire au maintient de l'efficacité de la neurotransmission de sorte qu'une fois libérée, la DA doit être évacuée avant l'arrivée d'un nouveau potentiel d'action. Pour ce faire, la DA peut i) se fixer sur les récepteurs pré ou post-synaptiques spécifiques, ii) être recaptée par les transporteurs DAT ou iii) être catabolisée.

Le catabolisme de la DA (Figure 11) peut être effectué à deux niveaux ; soit au niveau du cytoplasme du neurone par les MAO, soit au niveau de la fente synaptique par la catécholamine-O-méthyltransférase (COMT) (Pour revue : Meiser *et al*., 2013). Il existe deux isoformes des MAO, les MAO-A et MAO-B localisées respectivement au niveau de la membrane externe mitochondriale des neurones ou au niveau des cellules gliales. La désamination oxydative de ces enzymes va produire le 3,4-dihydroxyphénylacétaldéhyde (DOPAL) qui pourra être réduit en 3,4-dihydroxyphényléthanol (DOPET) ou oxydé en DOPAC. La DA peut également être dégradée successivement par les COMT en 3-méthoxytyramine puis par les MAO en 3-méthoxy-4-hydroxyacétaldéhyde conduisant enfin à l' acide homovanillique (HVA).

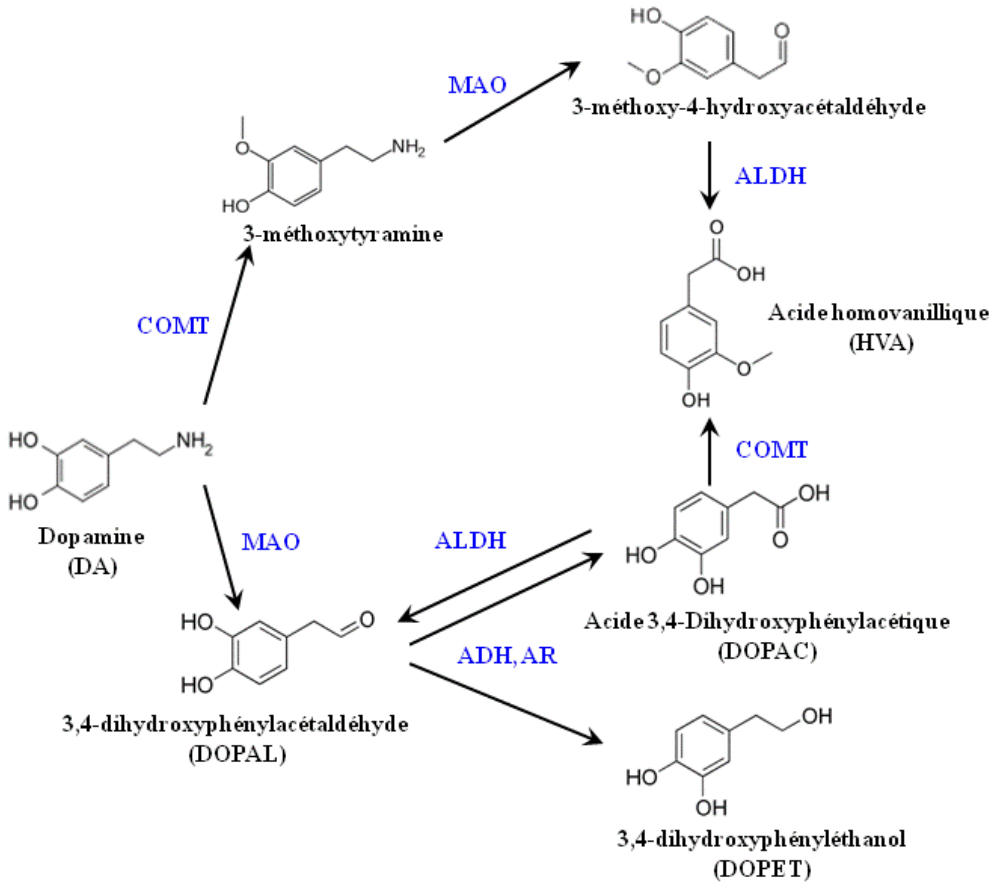


Figure 11 : Principaux produits de dégradation de la dopamine. ADH : Alcool déshydrogénase ; ALDH : Aldéhyde déshydrogénase ; AR : Aldéhyde réductase ; COMT : Catécholamine-O-méthyltransférase ; MAO : Monoamine oxydase.

B. Conséquences histo-pathologiques de la MP : Les corps de Lewy

La seconde caractéristique histo-pathologique relative à la MP est la présence, dans les neurones restant de la SNpc, d'inclusions cytoplasmiques éosinophiles nommées Corps de Lewy. Découvert en 1912 par Friedrich Heinrich Lewy, ces inclusions sont à l'époque, retrouvées dans de nombreuses structures cérébrales (noyaux de la *substantia innominata*, noyau dorsal vagal), après examen post-mortem de patients souffrants de paralysie agitante ou de MP, et c'est en 1923 que sont retrouvés les Corps de Lewy au niveau de la SNpc de patients Parkinsoniens (Bethlem et Den Hartog Jager, 1960). L'étude de la composition de ces inclusions a permis d'identifier un large panel de protéines différentes dont la composition

biochimique précise n'a pas encore été clairement élucidée (Beyer et Ariza, 2007). Il semblerait que ces Corps de Lewy soient composés majoritairement d'α-synucléine retrouvée dans une conformation anormale (Figure 12), ainsi que d'ubiquitine (Baba *et al*., 1998) qui à la suite d'une agrégation favoriserait la capture et l'accumulation d'autres protéines dans ces inclusions. Ces protéines accumulées peuvent être des éléments structuraux, des composantes du système ubiquitine-protéasome ou encore des protéines du cycle cellulaire (Wakabayashi *et al*., 2007).

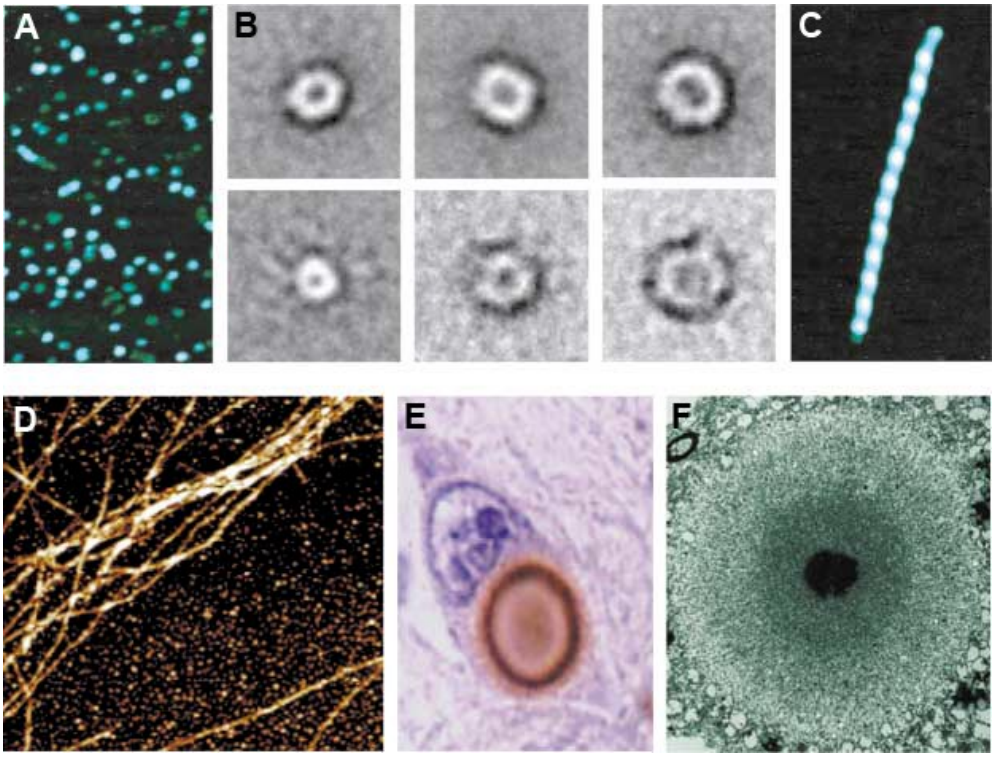


Figure 12 : Différentes possibilités de conformation de l'α-synucléine. L'α-synucléine monomérique (A) peut se rassembler pour former des conformations oligomériques également nommées protofibrilles. Ces protofibrilles peuvent se conformer en structures circulaires ou elliptiques (B), ou en fibrille (C et D). Ces dernières peuvent s'agréger par la suite au sein des corps de Lewy (E et F). On peut noter sur ces photographies que le centre de ces Corps de Lewy est dense et granuleux tandis que l'anneau les entourant est beaucoup plus clair et formé par des fibrilles d'α-synucléine irradiant du noyau central. D'après Maries *et al*., 2003.

Les Corps de Lewy ont une taille variant de 5 à 25 µm de diamètre, de formes arrondies ou ovales et possèdent un noyau bien définit fortement acidophile entouré d'un halo de coloration plus claire (Greenfield et Bosanquet, 1953). Bien que les mécanismes conduisant à la dégénérescence neuronale soient encore largement méconnus, de nombreuses pistes ont proposé l'hypothèse de l'agrégation anormale de l'α-synucléine en protofibrilles puis en fibrilles amyloïdes (Olanow, 2007; Schapira, 2008; Betarbet *et al*., 2000) conduisant à l'agrégation excessive de l'α-synucléine (Figure 12). D'autres hypothèses plus récentes proposent que l'α-synucléine anormale serait capable de se propager de neurones en neurones à la manière d'une protéine prion (Dunning *et al*., 2012; George *et al*., 2013; Olanow et Brundin, 2013). Enfin, il est à noter que la présence de Corps de Lewy dans la SN n'est pas spécifique à la MP puisqu'ils peuvent être également retrouvés dans d'autres pathologies impliquant un syndrome Parkinsonien telles que les démences à corps de Lewy (Okazaki *et al*., 1961).

Enfin, d'un point de vu moléculaire, l'analyse des formes monogéniques de la MP a permis d'obtenir un ensemble de données confirmant certaines hypothèses en faveur d'une agrégation anormale d'α-synucléine dont les mécanismes impliqueraient le métabolisme mitochondrial (Figure 13). En particulier, le complexe I de la chaîne mitochondriale jouerait un rôle majeur dans la dégénérescence des neurones (Schapira *et al*., 1989 ; Betarbet *et al*., 2000 ; Gandhi et Wood, 2005; Klein et Lohmann-Hedrich, 2007; Klein et Schlossmacher, 2007). A titre d'exemple, les études réalisées suite aux intoxications au MPTP, connu pour être un inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire, ont permis de mettre en évidence la forte augmentation de la production de radicaux oxygénés responsables de la physiopathologie de la MP (Nicklas *et al*.,1987).

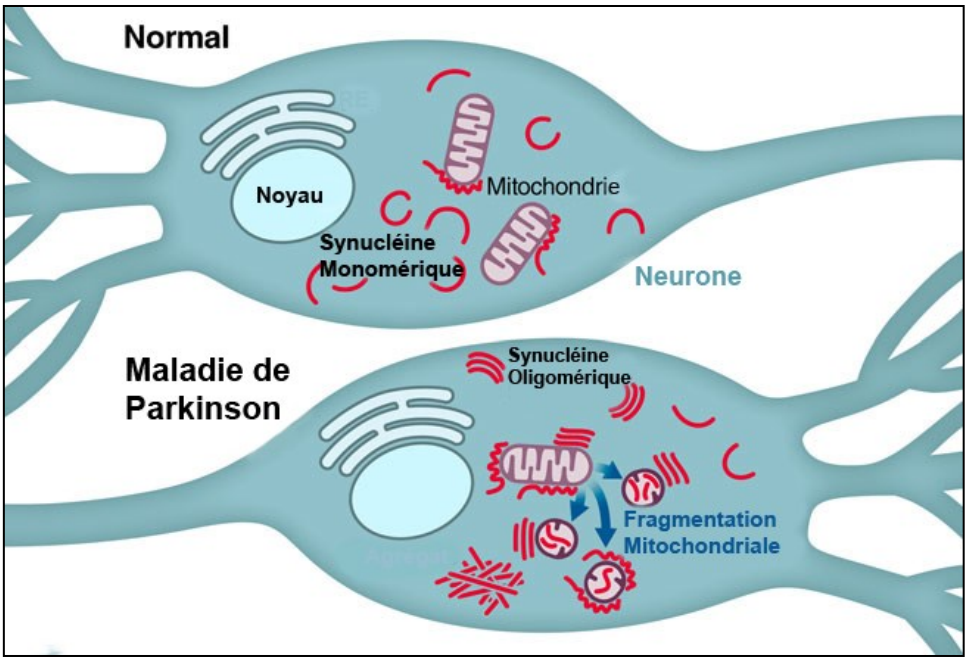


Figure 13 : Schématisation hypothétique des interactions entre la mitochondrie et l'α-synucléine en condition normale ou dans le cadre de la MP. Dans des conditions physiologiques, l'α-synucléine peut être soit sous forme monomérique cytosolique (en conformation dite « fermée ») soit, et dans de plus faible proportion, retrouvée liée à la mitochondrie sous une forme stabilisée dite « ouverte ». A l'inverse dans le cadre de la MP, les niveaux d'α-synucléine augmentant, une forte proportion se retrouve sous forme à la fois monomérique et oligomérique entrainant des phénomènes de fission des mitochondries conduisant à une fragmentation de mitochondriale. RE : Réticulum endoplasmique. Adaptée de Nakamura, 2013.

III. Modèles animaux associés à l'étude de la MP

Dans le but de comprendre les mécanismes physiopathologiques de la MP et pour permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, le recours à de bons modèles animaux de la MP s'avère être fondamental. Ces modèles doivent de ce fait, présenter une lésion de la voie nigro-striée spécifique et évidement reproductible. Ce modèle doit permettre à la fois d'étudier les conséquences fonctionnelles à la suite de cette lésion et de tester des stratégies réparatrices. Les deux principaux modèles animaux utilisés dans le cadre de la MP sont les modèles de lésion à la 6-OHDA et au MPTP. Nous mentionnerons également l'existence

d'autres substances toxiques comme le LPS (lipopyloysacharride) ou la roténone capables d'induire une anatomopathologie de la MP. Nous indiquerons aussi que certaines études utilisent également des modèles transgéniques de la MP et notamment le modèle hSynA53T, exprimant l'α-synucléine humaine mutée. Du fait de l'utilisation du modèle de lésion à la 6-OHDA dans notre étude, nous nous focaliserons dans la suite de cette partie sur les caractéristiques de cette toxine.

A. Modèle de lésion à la 6-OHDA

La 6-OHDA (analogue hydroxylé de la DA) a été utilisée pour la création du premier modèle animal de la MP après son injection dans la SNpc de rat en 1968 induisant une dégénérescence de la voie nigro-striée (Ungerstedt, 1968). De par son mimétisme avec les catécholamines, la dégénérescence engendrée par cette toxine est très sélective des neurones catécholaminergiques. La 6-OHDA pénètre dans les neurones dopaminergiques par l'intermédiaire du DAT avant de s'accumuler dans le cytoplasme de la cellule. Elle va alors être responsable de la formation d'un taux important de radicaux libres (H2O2) dû à son auto-oxydation provoquant, en partie par des phénomènes de stress oxydatif, la mort des neurones dopaminergiques.

La 6-OHDA n'est pas capable de passer la barrière hémato encéphalique, il est donc nécessaire de réaliser une injection stéréotaxique au niveau de la région cérébrale d'intérêt pour induire la lésion. De ce fait, il est possible de réaliser une lésion unilatérale ou bilatérale. Bien que le modèle bilatéral réalisé chez le rat possède l'avantage de présenter des caractéristiques comportementales de la MP comme la perte d'équilibre ou les phénomènes de tremblements, il est toutefois peu utilisé en raison de la forte proportion de mortalité ainsi que de l'intensité des soins à apporter. En revanche, la lésion unilatérale à la 6-OHDA permet de créer chez les modèles animaux un syndrome hémi-Parkinsonien possédant le double avantage i) d'avoir un hémisphère intact pouvant être comparé à l'hémisphère lésé et ii) de présenter un déficit sensorimoteur controlatéral au coté de la lésion très largement utilisé dans l'élaboration de tests comportementaux permettant l'étude des conséquences fonctionnelles de la lésion et/ou d'une stratégie réparatrice.

B. Lésion Unilatérale à la 6-OHDA : Considérations fonctionnelles

La lésion unilatérale à la 6-OHDA entraine des déficits dans l'exécution des fonctions motrices. Afin d'évaluer chez ce modèle, les effets sur les fonctions motrices, en conditions pathologiques ou dans le cadre de stratégies réparatrices, il existe à notre disposition un grand nombre de tests comportementaux. Le choix du test de comportement est important. En effet, alors que certains tests permettent une analyse globale de la motricité, d'autres permettent une étude très fine des fonctions motrices. De plus, il est nécessaire de prendre en compte le caractère « spontané » du mouvement effectué par l'animal lors du test (mouvement d'exploration, marche spontanée) permettant une répétition du mouvement sans entrainer de récupération motrice. Au contraire, un mouvement « forcé » à effectuer pendant le test (préhension de nourriture, descente d'une tige) entraine des phénomènes de récupération et ne permet donc pas une répétition trop importante du test. Nous allons présenter brièvement l'ensemble des tests comportementaux utilisés au cours de ce projet ainsi que leurs principales caractéristiques.

1. Test de rotation induit par l'apomorphine

Le test de rotation permet l'évaluation de l'étendue de la dénervation nigro-striée après injection d'un agoniste dopaminergique : l'apomorphine. En effet, en raison d'une hypersensibilité des récepteurs dopaminergiques due à une dénervation de plus de 50% des neurones DA, les animaux vont présenter des rotations dans le sens controlatéral au coté de la lésion (Ungerstedt, 1968 ; Ungerstedt *et al*., 1970 ; Hudson *et al*., 1993). Le caractère prédictif de l'étendue de la dénervation en fait un test couramment utilisé mais ne permet cependant qu'une analyse globale des fonctions motrices.

2. Test de la descente de tige

Ce test permet une évaluation globale de la coordination motrice et de l'équilibre de l'animal. Placée tête vers le haut sur une tige verticale, la souris va descendre en effectuant un retournement de 180° puis une descente complète de la tige. Les durées du mouvement de retournement ainsi que de la descente totale de la tige sont ainsi fournies. Ce mouvement

n'étant pas un mouvement spontané, ce test nécessite une phase d'habituation courte et ne peut être effectué un grand nombre de fois.

3. Test du cylindre

Ce test permet également une évaluation globale des déficits unilatéraux des membres antérieurs. Placés dans un cylindre translucide, les animaux vont effectuer spontanément des comportements d'exploration du nouvel environnement par la réalisation de mouvements de redressement et de contacts des pattes avant contre les parois du cylindre. Le nombre de contact effectué respectivement par l'une ou l'autre des pattes est alors comptabilisé. Ce test présente l'avantage de ne nécessiter aucune habituation et de par ce mouvement de redressement spontané n'engendre aucune récupération.

4. Test de la poutre modifié

Ce test permet l'évaluation de la coordination motrice, la synchronisation et la démarche de l'animal. L'animal marche sur une grille de largueur décroissante. Le nombre de traversées des pattes à travers la grille (dérapages) ainsi que le temps total nécessaire à la traversée de la poutre sont des paramètres analysés. Ce test nécessite un apprentissage et le nombre d'erreurs lors de la traversée tend à diminuer au fur et a mesure des passages.

5. Test de l'escalier

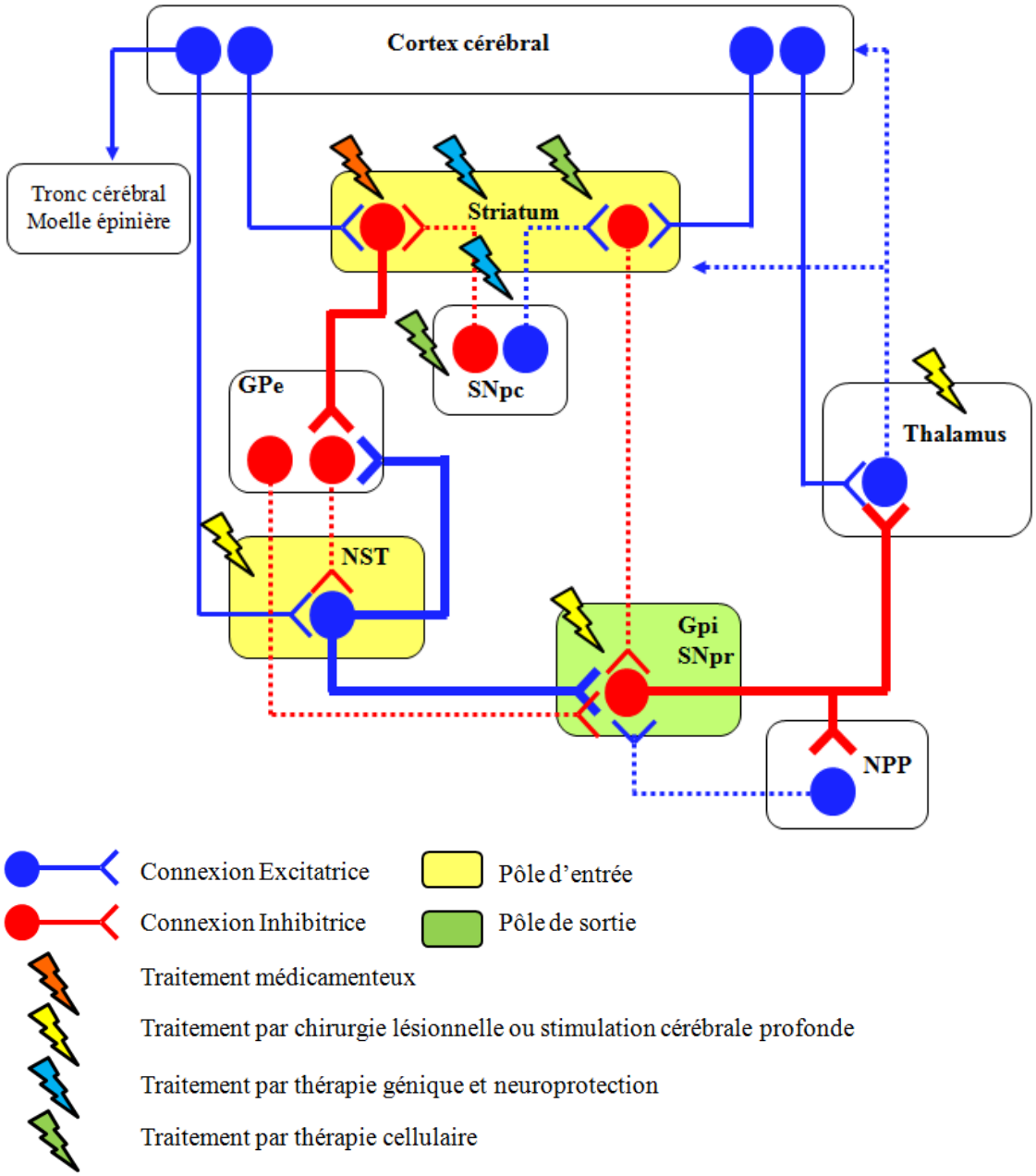
Le test de l'escalier (staircase test) permet d'évaluer les capacités de préhension de nourriture effectuée par les pattes antérieures de l'animal. Ce test permet d'évaluer la motricité fine de l'animal. L'animal doit attraper à l'aide de sa patte, des boulettes de nourriture placées sur les marches d'un escalier. De par la configuration du dispositif, ce test permet d'évaluer les aptitudes de chaque patte antérieure de façon spécifique. Ainsi, il est possible de mettre en évidence des déficits unilatéraux. Ce test de préhension de nourriture nécessite un apprentissage assez conséquent ainsi qu'une restriction alimentaire. L'animal doit comprendre la nécessité de l'utilisation de ses pattes pour pouvoir attraper les boulettes de nourriture. De plus, un trop grand nombre de réalisation de ce test conduit à la une récupération motrice spontanée.

6. Test de la marche

Ce test permet, lors d'un mouvement volontaire et spontané de marche, d'évaluer la démarche globale de l'animal ainsi que les paramètres de placement de chaque patte individuellement. Pour ce faire, l'animal doit marcher de façon régulière sur une plaque de verre ou les appuis de chaque patte sont captés par une caméra située sous le dispositif. Les informations de déplacement à la fois spatiale (longueur ou largeur de l'appui, longueur de la foulée) et temporelle (vitesse de déplacement, durée de la foulée) peuvent être alors fournies.

IV. Stratégies thérapeutiques de la maladie de Parkinson

En dépit du nombre croissant de données obtenues suite à la caractérisation physiopathologique de la MP, les causes de dégénérescence neuronale restent méconnues, si bien qu'il n'existe, à ce jour aucun traitement efficace à long-terme contre cette maladie. Néanmoins, la compréhension des circuits et mécanismes impliqués dans cette maladie a permis le développement de traitements symptomatologiques ciblant principalement les symptômes moteurs de la MP et agissant à différents niveaux. Les principaux traitements et leurs localisations au niveau des circuits ou de la synapse dopaminergique sont consignés dans la Figure 14 ci-dessous.



<u>Figure 14 :</u> Schématisation des relations fonctionnelles des structures des ganglions de la base en condition Parkinsonienne et localisation des principales régions cibles des stratégies thérapeutiques de la maladie de Parkinson. Les cibles majeures des thérapies se situent au niveau du striatum, au départ des voies dopaminergiques, dont les traitements médicamenteux, de thérapies géniques ou cellulaires corrigent la chute des taux de DA. D'autres structures plus en aval de ces voies sont elles la cible de stimulations cérébrale profonde (NST, Gpi, Thalamus). Gpi : Globus pallidum interne ; Gpe : Globus pallidum externe ; NPP : Noyau pédonculopontin ; NST : Noyau sous-thalamique ; SNpc : Substance noire *pars compacta* ; SNpr : Substance noire *pars reticulata*.

Comme il a été décrit précédemment dans le chapitre physiopathologie de la MP, les symptômes moteurs résultent principalement du déficit en DA au niveau du striatum conduisant à l'inhibition de la voie thalamo-corticale de par les projections inhibitrices du GPi sur le thalamus et ceci découlant de l'implication de 1) la voie directe entrainant une levée d'inhibition du striatum sur le GPi et de 2) la voie indirecte entrainant une augmentation de l'activité du noyau sous thalamique résultant de l'inhibition du GPe, après augmentation de l'activité inhibitrice du striatum .

C'est avec l'ensemble des connaissances de ces circuits que des stratégies visant à combler le déficit dopaminergique et ainsi corriger la symptomatologie ont été mises en place, notamment par :

- Le traitement médicamenteux agissant au niveau du striatum
- Le traitement chirurgical, avec la stimulation cérébrale profonde (stimulation haute fréquence) réalisée au niveau du noyau sous thalamique mais également du Gpi ainsi que du thalamus.

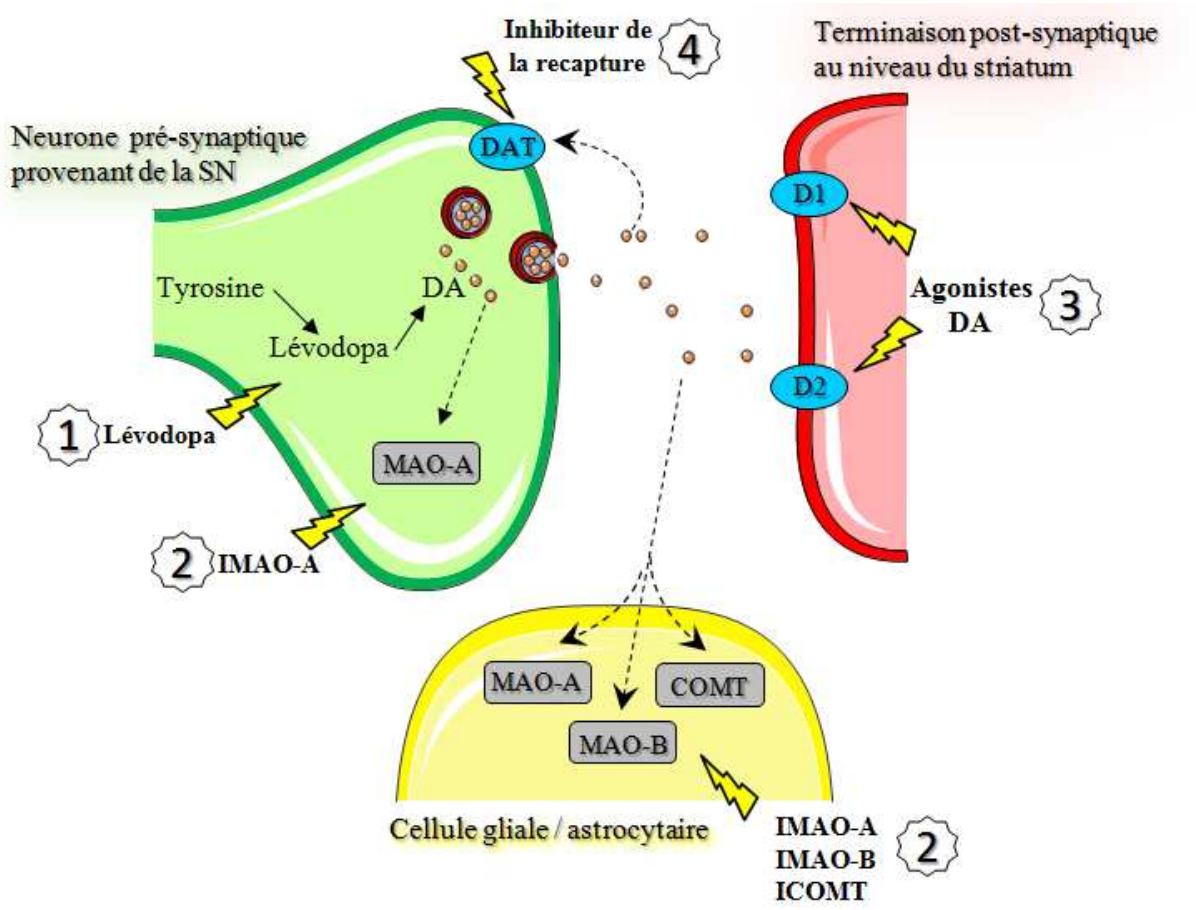
De plus, certaines thérapies visent à limiter la dégénérescence neuronale par divers procédés ou encore s'attachent à remplacer les neurones dopaminergiques perdus et ce par l'intermédiaire de traitements par :

- Thérapie génique ou de neuroprotection
- Thérapie cellulaire

A. Les traitements médicamenteux

La majorité des symptômes moteurs de la MP étant principalement liée à la chute des niveaux de DA au sein du striatum, il a été alors cohérent de concentrer les recherches autour d'une restitution de ces concentrations. Ces travaux ont conduit à la découverte des effets thérapeutiques de la L-DOPA (Cotzias *et al*., 1969), de nombreux agonistes dopaminergiques ainsi qu'à la potentialisation de l'effet de ces traitements en les combinant à des inhibiteurs enzymatiques de sa dégradation.

Les principales stratégies médicamenteuses agissant en vue de contrer la perte de DA suite à une dégénérescence neuronale et leurs localisations sont consignées dans la Figure 15 ci-dessous dont les principaux acteurs seront développés dans la suite de cette partie.



<u>Figure 15 :</u> Schématisation de la synthèse dopaminergique et localisation des principaux sites d'actions des stratégies médicamenteuses. La synthèse dopaminergique débute avec la tyrosine catalysée en Lévodopa puis en dopamine. Cette dernière peut-être métabolisée au sein du neurone par la monoamine oxydase A (MAO-A) ou au niveau glial (en particulier astrocytaire) par les monoamines oxydases A et B (MAO-A et MAO-B). La première stratégie médicamenteuse (1) est l'administration de Lévodopa permettant la synthèse de dopamine. De plus, nombreuses sont les stratégies misent en place en vue de limiter la dégradation de la DA par l'utilisation des inhibiteurs des MAO (IMAO-A et IMAO-B) ou des catéchol-*O*-méthyltransférase (ICOMT) (2). Une troisième possibilité d'action est l'administration d'agonistes dopaminergiques (3) agissant sur les récepteurs D1 et D2 à la surface de la membrane des neurones post-synaptiques présents au niveau du striatum. Enfin, nous mentionnerons les inhibiteurs de la recapture de la DA (4) limitant le retour de la DA au niveau du neurone pré-synaptique. Les éclairs jaunes localisent les sites d'actions médicamenteux ; DA : Dopamine ; DAT : Transporteur de la dopamine ; D1 / D2 : Récepteurs dopaminergiques 1 et 2. Adaptée de Youdim *et al*., 2006.

1. La dopathérapie

C'est dans les années 1960 que les puissants effets de la L-DOPA sur les symptômes moteurs de patients atteints de la MP après une simple administration orale ont été découverts (Carlsson *et al*., 1958; Birkmayer et Hornykiewicz, 1961; Cotzias *et al*., 1969). La DA n'étant pas capable de passer la barrière hémato-encéphalique, c'est donc son précurseur direct, la L-DOPA, possédant cette capacité qui est utilisée en thérapie. Une fois administrée, la L-DOPA arrive au niveau cérébral pour être captée par l'extrémité des prolongements des neurones dopaminergiques de la SNpc encore présents. Elle est par la suite synthétisée en DA par décarboxylation *via* la DOPA-décarboxylase (Figure 16). De plus, en raison du faible nombre de neurones dopaminergiques présents, d'autres types cellulaires (neurones sérotoninergiques ou cellules gliales) auraient la capacité de réaliser cette décarboxylation (Schawarting et Huston, 1996; Carta *et al*., 2008; Navailles *et al*., 2010). Il est également à noter que la L-DOPA administrée chez le patient peut également être décarboxylée en périphérie sous l'action de DOPA-décarboxylase périphériques entrainant de nombreux effets secondaires néfastes tels que des vomissements ou de l'hypertension artérielle. Pour limiter ces effets secondaires, il est administré en plus de la L-DOPA, un inhibiteur de la DOPA-décarboxylase (benserazide ou carbidopa) n'ayant pas la capacité de franchir la barrière hémato-encéphalique et empêchant la dégradation de la L-DOPA uniquement au niveau périphérique. Ce traitement médicamenteux est le plus efficace à court terme pour corriger les symptômes moteurs mais la dégénérescence neuronale se propageant, l'administration de L-DOPA ne suffit plus à corriger les troubles moteurs qui réapparaissent de plus en plus fréquemment. Au fur et à mesure de la progression de la maladie, de nouveaux troubles moteurs apparaissent sous la forme de mouvements anormaux et involontaires nommés dyskinésie, perturbant de façon dramatique la motricité des patients.

2. Les agonistes dopaminergiques

En parallèle de la dopathérapie, de nombreux agonistes dopaminergiques se sont développés. Analogue de la DA d'un point de vue structural, ils agissent directement sur les récepteurs de la DA. Contrairement à la L-DOPA, leur efficacité n'est pas dépendante du nombre de neurones dopaminergiques restant chez le patient, puisqu'ils agissent directement sur les récepteurs post-synaptiques. Ils sont cependant de plus faible efficacité que la L-DOPA malgré une demi-vie plus longue et sont souvent prescrit chez le patient en complément de la

dopathérapie. De plus, en dépit d'une fréquence d'apparition des dyskinésies moindre, les effets secondaires et notamment psychiques (hallucination, psychose, somnolence) sont similaires à ceux de la L-DOPA avec une intensité et fréquence d'apparition plus importante, ceci de par l'activation longue et directe des récepteurs dopaminergiques. Les agonistes dopaminergiques les plus utilisés en thérapie se subdivisent en deux groupes : 1) les agonistes ergotés dérivant de l'ergot de seigle (bromocriptine, pergolide) dont les propriétés thérapeutiques puissantes sont également associées à de nombreux effets secondaires particulièrement néfastes (fibroses, œdèmes) 2) les dérivés non ergotés comprenant le ropinirole ou l'apomorphine, ce dernier étant le traitement de référence des périodes d'invalidité motrice (phase Off) dont la survenue est particulièrement invalidante et brutale. De plus, l'apomorphine à la propriété de ne provoquer que de faibles effets secondaires psychiques.

3. Les inhibiteurs du catabolisme de la dopamine

Une autre option dans le traitement médicamenteux de la MP est l'ajout, en parallèle du traitement L-DOPA cité ci-dessus, d'inhibiteur de la dégradation de la DA. L'idée sous-jacente est d'étendre les effets du traitement médicamenteux en augmentant la demi-vie de la DA par l'inhibition des enzymes nécessaires à son catabolisme. En particulier, les deux inhibiteurs du catabolisme de la DA classiquement utilisés en thérapie sont les inhibiteurs de la monoamine-oxydase de type B (IMAO-B) et les inhibiteurs de la Catéchol-O-Méthyl transférase (ICOMT) (Figure 16). Les IMAO-B sont les inhibiteurs non compétitifs sélectifs de la MAO-B capables de passer la barrière hémato-encéphalique et réduisant l'incidence des fluctuations motrices en empêchant principalement la dégradation de la DA en (DOPAC). Les ICOMT quant à eux augmentent à la fois la disponibilité de la L-DOPA en inhibant son catabolisme en 3-O-méthyldopa mais agissent également au niveau de la DA en inhibant sa dégradation en 3-méthoxytyramine (Figure 16). Ces deux types inhibiteurs de la dégradation de la DA permettent, lorsqu'ils sont prescrits en complément dans le cadre de la dopathérapie de diminuer les doses de L-DOPA associées et d'améliorer la motricité chez les patients.

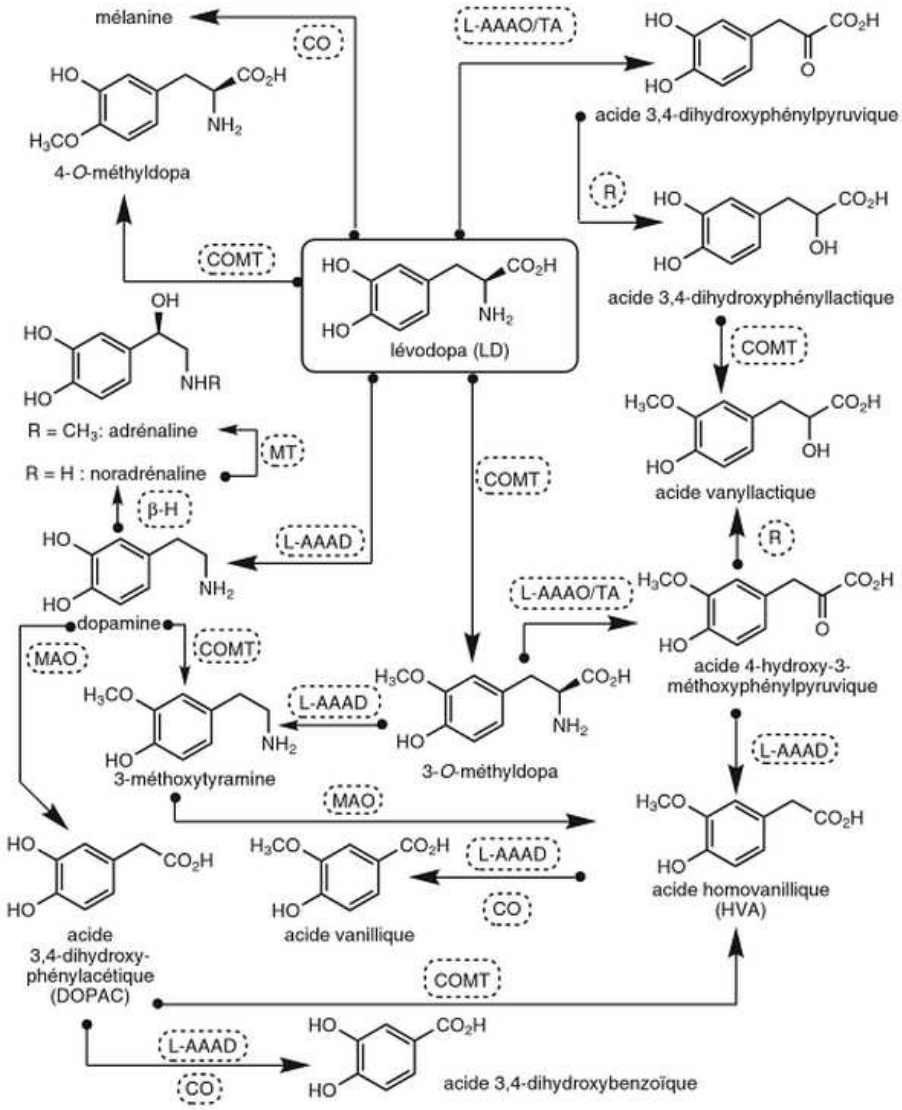


Figure 16 : Métabolisme de la Lévodopa. D'après AFECT, 2011.

Il est important de mentionner que la ou les stratégies thérapeutiques misent en place dans le cadre de la MP sont relativement bien renseignées pour le stade initial de la maladie suite aux nombreuses études réalisées chez le patient, mais que les multiples évolutions plausibles des stades avancés de la maladie ne permettent pas d'établir des protocoles de façon standard. En considérant la phase initiale de la maladie, les patients sont sélectionnés en fonction de leurs âges et des gênes fonctionnelles importantes qu'ils subissent. Les patients âgés de moins de 70 ans reçoivent alors dans un premier temps, un traitement d'agonistes dopaminergiques pour retarder au maximum l'apparition de dyskinésies provoquées par la L-DOPA. Par la suite, la L-DOPA est associée aux agonistes dopaminergiques ainsi qu'aux ICOMT. Chez les patients de plus de 70 ans, la L-DOPA est prescrite de façon isolée de par les forts effets secondaires engendrés par le traitement d'agonistes dopaminergiques sur cette

catégorie de patients. Dans le cas de patients présentant un stade plus avancé de la maladie, les traitements peuvent varier en fonction de l'état du patient afin de cibler les symptômes moteurs permettant d'améliorer ses conditions de vie.

B. Chirurgie par lésion et stimulation

Les traitements chirurgicaux, autrefois réalisés sur la base de la destruction partielle ou totale des zones cérébrales responsables de troubles moteurs ont débutées dans les années 1930 avec l'ablation de structures cérébrales telles que le cortex moteur primaire, ou le pallidum (Bucy et Case, 1939 ; Meyers, 1951). Du fait de l'irréversibilité de la chirurgie, du fort taux de mortalité associé, de l'unilatéralité obligatoire de l'ablation et de l'introduction dans les années 1970 de traitements médicamenteux extrêmement efficaces comme la L-DOPA, ces techniques ont été délaissées. Malgré une bonne réponse à la dopathérapie, certains patients conservent malheureusement une symptomatologie extrêmement invalidante avec notamment des complications telles que les dyskinésies, fluctuations motrices ou hallucinations engendrées par les traitements anti-Parkinsoniens (Houeto *et al*., 2003; Singh *et al*., 2007) conduisant à la réapparition des techniques chirurgicales. La progression des connaissances de l'organisation fonctionnelle des ganglions de la base et notamment la mise en évidence de la dérégulation de structures telles que le Gpi, le NST ou le thalamus, il est évident que ces structures soient des cibles thérapeutiques d'un intérêt majeur dans l'élaboration d'une nouvelle technique, moins invasive, réversible, modulable et plus efficace : la stimulation cérébrale profonde. (Mitchell *et al*., 1985 ; Vila *et al*., 1996 ; Filion, 1979 ; Kreiss *et al*., 1997).

Cette méthode consiste à implanter des électrodes de stimulation au niveau de régions spécifiques du cerveau. Chez le patient, un générateur d'impulsion programmable à distance est implanté, le plus souvent au niveau sous-claviculaire, délivrant une stimulation électrique haute fréquence en continue. Les cibles d'implantations des électrodes de stimulation sont au nombre de trois : Elles peuvent être réalisées au niveau du noyau ventral intermédiaire du thalamus, du Gpi ou du NST montrant pour ce dernier des résultats probants, à la suite d'études réalisées chez le primate lésé au MPTP (Bergman *et al*., 1990 ; Aziz *et al*., 1992). Au cours des années 1990, les stimulations du pallidum ou du NST ont démontré chez l'homme leurs efficacités dans la suppression des symptômes moteurs de la MP (Pollak *et al.*, 1993 ; Siegfried et Lippitz, 1994). En particulier pour le NST, cette technique est efficace à tel point

qu'elle reste encore à ce jour le traitement de référence dans le cas de formes avancées de la MP (Benabid *et al*., 2003) et tend à se développer également pour les formes précoces (Schuepbach *et al*., 2013).

Le principal avantage de cette technique est sa grande flexibilité. Il est possible de modifier la forme et la position des électrodes, ainsi que la fréquence, ou l'intensité de l'impulsion électrique. De plus, il est possible de placer les électrodes de chaque coté du cerveau, permettant une amélioration des symptômes moteurs de façon bilatérale. Cependant, il est nécessaire de mentionner que de nombreux risques liés à la chirurgie peuvent survenir comme des risques d'hémorragie cérébrale se manifestant dans 1 à 2 % des cas, ainsi que des risques d'infections liés à l'intervention dans moins de 1% des cas (Deuschl *et al*., 2006). De même, l'intervention peut également entrainer, et en particulier chez le sujet âgé, des troubles psychiques, moteurs, ou exécutifs (Tir *et al*., 2007 ; Ardouin *et al*., 1999 ; Ballanger *et al*., 2009). De ce fait, seul 5% des patients Parkinsoniens peuvent bénéficier de cette stimulation à haute fréquence. La sélection des patients se fait en fonction de certains critères (présence de la maladie depuis plus de 5 ans, forte amélioration par traitement à la L-DOPA mais conservation de complications motrices, moins de 70 ans, etc.).

Enfin, tout comme la thérapie médicamenteuse, la stimulation cérébrale profonde permet l'amélioration à plus ou moins long terme de la symptomatique du patient mais n'intervient en rien dans le processus dégénératif des neurones dopaminergiques responsable de la pathologie.

C. Thérapie génique et neuroprotection

En considérant que les traitements symptomatiques ne sont pas capables d'atténuer les processus physiopathologiques conduisant inévitablement à la mort progressive des neurones dopaminergiques, le développement de nouvelles stratégies pouvant potentiellement ralentir voir stopper ces dégénérescences neuronales au cours des premières phases de la MP constitue un défi majeur dans le traitement de cette pathologie.

Face à cette constatation, un grand nombre de pistes ont été explorées dont celle de la neuroprotection ayant, pour objectif principal, l'arrêt ou à défaut le ralentissement de la mort neuronale. Parmi l'ensemble des molécules testées pouvant jouer un rôle dans la neuroprotection, les facteurs de croissance neurotrophiques sont des candidats idéaux tant leur

rôle neuroprotecteur est important durant le développement embryonnaire mais également chez l'adulte à la suite d'une lésion (Beck *et al*., 1995 ; Yan *et al*., 1995). Dans le cas de la maladie de Parkinson, les neurones dopaminergiques de la substance noire possèdent des récepteurs permettant aux facteurs neurotrophiques d'augmenter leur survie et leur différentiation (Lin *et al*., 1993 ; Matsuo *et al*., 2000). C'est le cas du BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), de la Neurotrophine 3 (NT-3), facteur neurotrophique que nous développerons plus particulièrement dans ce paragraphe, ou encore le GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor). A la suite des ces observations *in vitro,* de nombreuses études ont mentionné la protection des neurones dopaminergiques contre les atteintes toxiques à la 6-OHDA ou au MPTP chez différentes espèces, après injection de ce GDNF directement au niveau du striatum, de la substance noire ou de manière intra-ventriculaire et certains cas montrent une réelle amélioration fonctionnelle (Krieglstein et Unsicker, 1994 ; Hoffer *et al*., 1994 ; Sauer *et al*., 1995 ; Gash *et al*., 1996 ; Rosenblad *et al*., 1999 ; Xu *et al*., 2010 ; Zuo *et al*., 2013). Diverses études cliniques ont également été menées testant l'effet d'une injection de GDNF au niveau du striatum ou en intra-ventriculaire *via* l'implantation d'une canule avec des résultats allant de l'amélioration majeure des symptômes (Gill *et al*., 2003 ; Patel *et al*., 2005), à l'absence d'amélioration (Lang *et al*., 2006), voir des effets très négatifs (Nutt *et al*., 2003). Suite à l'hétérogénéité de ces résultats, il semblerait que le GDNF puisse parfaitement contribuer à limiter la dégénérescence neuronale chez le patient Parkinsonien. Néanmoins, l'utilisation de ce facteur reste limitée, de par son incapacité à passer la barrière hémato encéphalique et son action encore controversée chez le patient.

Ces résultats ont laissé la place au déclenchement de la recherche d'autres techniques (Figure 17) et en particulier, de la thérapie génique neuroprotectrice, qui va permettre l'apport de facteurs neurotrophiques par l'injection dans les régions spécifiques du cerveau, de vecteurs viraux recombinants dérivés de lentivirus, de l'adénovirus ou de virus associé à l'adénovirus et exprimant le gène codant pour un facteur trophique donné (Naldini *et al*., 1996 ; Kordower *et al*., 1999 ; Déglon *et al*., 2000 ; Kordower *et al*., 2000 ; Bartus *et al*., 2015). Les virus codant pour le GDNF ont montré leurs potentiels thérapeutiques à la fois dans les modèles animaux de la MP (Bilang-Bleuel *et al*., 1997 ; Kordower *et al*., 2000 ; Kirik *et al*., 2000 ; McGrath *et al*., 2002 ; Kirik *et al*., 2004) mais également chez le patient Parkinsonien avec l'administration dans le putamen de virus adéno-associé 2 contenant la neurturine, une cytokine de la famille du GDNF (Marks *et al*., 2008 ; Marks *et al*., 2010). Malgré un potentiel neuroprotecteur important, il est toutefois essentiel de mentionner que des

résultats variables laissant place à de nombreux effets néfastes comme des hémorragies, des infections ou des tumeurs impliquent la nécessité de standardisation des actes chirurgicaux ainsi que du maintien sur le long terme de l'expression génique.

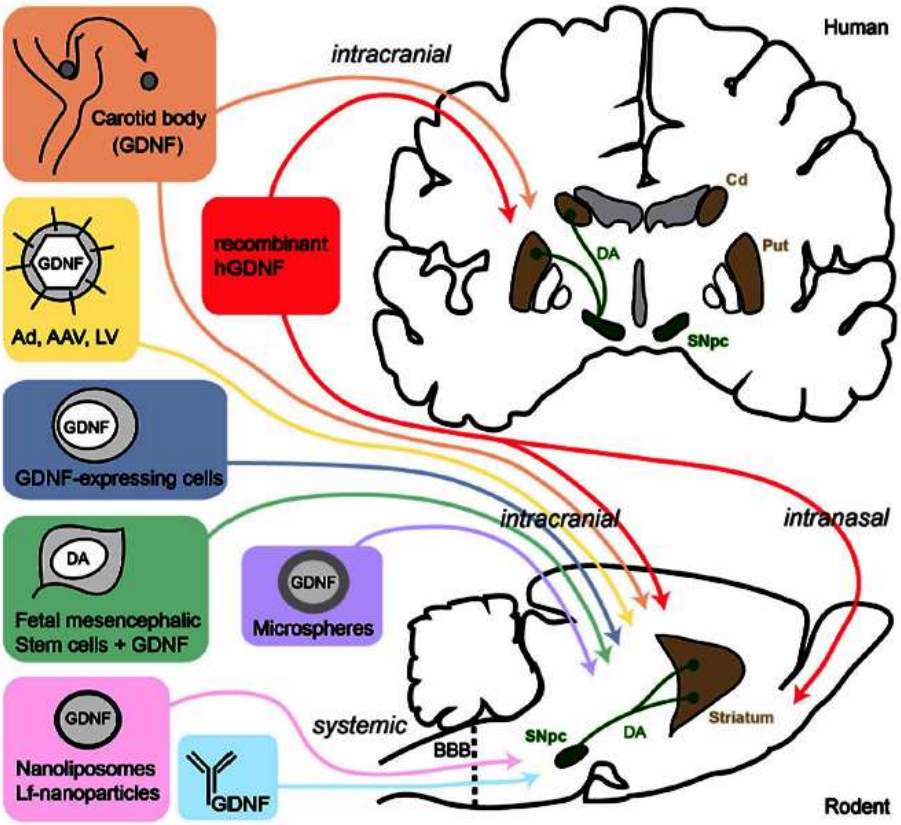


Figure 17 : Schématisation de l'ensemble des stratégies thérapeutiques de neuroprotection liées au GDNF chez l'humain ou le rongeur. Coupe coronale de cerveau humain (en haut) et frontale de rongeur (en bas). Les techniques d'injection se sont fortement développées et sont aujourd'hui très variables allant de i) l'administration de GDNF recombinant, ii) l'utilisation de vecteurs viraux recombinants, iii) cellules exprimant cette protéine iv) l'utilisation de microsphères v) l'administration systémique de nanoliposomes. Chez le rongeur, les voies d'administration peuvent être intracraniale, intranasale ou systémique mais seule la voie intracraniale est utilisée chez l'homme. AAV: virus adéno-associé ; Ad: adénovirus; LV: lentivirus; Lf: lactoferrine; SNpc substance noire *pars compacta*; DA: dopamine; Cd: Noyau caudé; Put: putamen; BBB: barrière hémato-encéphalique. D'après d'Anglemont de Tassigny *et al*., 2015.

D. Thérapie cellulaire et maladie de Parkinson

Durant de nombreuses années, l'idée même de la régénération, ou de la croissance de neurones dans le cerveau adulte des mammifères était impossible. Ces arguments, fortement soutenus par Cajal (1928), sont à la base du scepticisme et de la mise de coté d'un certain nombre de travaux mentionnant des résultats prometteurs suite à des transplantations neurales et s'avérant être à l'aube de la thérapie cellulaire. Cette thérapie cellulaire peut se caractériser par l'ensemble des techniques permettant de prévenir, freiner ou limiter une pathologie entrainant le dysfonctionnement d'un organe ou d'un ensemble de cellules, par le biais de greffe d'organe, de tissu, ou de cellules pouvant être modifiées ou non.

En particulier pour la MP, la pathologie est un processus neurodégénératif entrainant la perte des neurones dopaminergiques de la SNpc. Contrairement aux thérapies énoncées précédemment et ciblant la symptomatique de cette neuropathologie, l'idée sous-jacente de cette nouvelle approche est de remplacer les neurones perdus par la transplantation de précurseurs neuronaux provenant d'embryons, dans le cerveau des patients.

C'est en 1979 et dans le cadre de la MP qu'a été mis en évidence pour la première fois, la manifestation d'un effet fonctionnel suite à la greffe chez le rat, de neurones dopaminergiques embryonnaires du mésencéphale (Perlow *et al*., 1979 ; Bjorklund et Stenevi, 1979). Dès lors, la thérapie cellulaire a tenté de faire ses preuves aux travers de nombreuses études réalisées sur divers modèles animaux (rat, souris ou primate non-humain) avec pour objectif principal la ré-innervation du striatum ainsi que l'amélioration des fonctions motrices à la suite d'une transplantation. Certaines études rapportent, à la fois dans des modèles de lésion à la 6-OHDA chez le rat ou au MPTP chez le primate non-humain, que la greffe de tissu embryonnaire de mésencéphale ventral (MV) placée de façon ectopique au niveau du striatum, permet une survie et une intégration des cellules transplantées, une ré-innervation du striatum lésé et, de façon variable, l'observation d'une amélioration des fonctions motrices (Dunnett *et al*., 1987 ; Bjorklund, 1992 ; Nikkhah *et al*., 1993 ; Abrous *et al*., 1993 ; Winkler *et al*., 2000 ; Hargus *et al*., 2010 ; Rylander *et al*., 2013 ; Grealish *et al*., 2014).

Très rapidement sont apparus au travers des études réalisées, plusieurs facteurs influant sur la survie et le développement du greffon dans le cerveau adulte (Stenevi *et al*., 1976) :

- Les modalités techniques
- L'âge du donneur
- L'âge de receveur
- L'origine des tissus utilisés pour la transplantation
- Le site de transplantation

1. Les modalités techniques

Les facteurs techniques jouent un rôle important dans la standardisation du procédé de transplantation et la survie de la greffe. L'asepsie de la chirurgie tout d'abord et indispensable avec la stérilisation de l'ensemble des appareils ou solutions utilisés lors de la greffe (Stenevi *et al*., 1976). Les hématomes formés à la suite de saignements éventuels survenant lors de la transplantation altèrent les résultats finaux et doivent être stoppés. De plus, la méthode de prélèvement du tissu ainsi que la technique de transplantation dans le cerveau sont des étapes cruciales. Lors des premières approches de transplantation, les greffons se présentaient sous la forme de fragments de tissus placés dans des cavités corticales situées au dessus du striatum (Bjorklund et Steveni, 1979 ; Dunnett *et al*., 1981a,b). Les approches ultérieures se sont attachées à perfectionner la technique de transplantation *via* l'utilisation non pas de blocs de tissu mais de suspension cellulaire. Ces dernières, réalisées par dissociation enzymatique et/ou mécanique peuvent conduire à une suspension soit unicellulaire soit en agrégats et permettent d'être injectée par stéréotaxie directement et de façon reproductible dans le striatum des animaux lésés sans la nécessité de préparation du site de transplantation (Schmidt *et al*., 1981 ; Bjorklund *et al*., 1981a,b ; Dunnett *et al*., 1983 ; Dunnett *et al*., 1984 ; Nikkhah *et al*., 1994). Enfin, il a été démontré que de petits dépôts, souvent injectés en plusieurs sites rapprochés, de par la minimisation du traumatisme d'implantation et la maximisation des interactions hôtes-greffon, permettent i) la survie des cellules greffées ii) la survie des neurones TH au sein du greffon iii) la ré-innervation de la région cible : le striatum iv) la libération de DA au niveau du striatum et v) de nombreux bénéfices fonctionnels (Stenevi *et al*., 1976 ; Nikkhah *et al*., 1993 ; Nikkhah *et al*., 1994 ; Nikkhah *et al*., 2009).

2. Age du donneur et localisation du tissu source

Il a été rapporté que la survie et l'intégration du transplant sont beaucoup plus importantes lorsque le prélèvement est réalisé au stade embryonnaire en comparaison avec les stades prénataux ou adultes. Un certain nombre de recherches se sont attachées à établir le stade embryonnaire idéal pour la transplantation permettant une viabilité, une survie et une intégration du greffon maximale. Il a été montré que la transplantation de cellules juste avant leurs dernières divisions mitotiques avaient un potentiel de survie plus important ainsi qu'un volume de greffon également augmenté (Fricker *et al*., 1997a,b ; Gates *et al*., 2006 ; Torres *et al*., 2007 ; Bye *et al*., 2012). En particulier chez le rat, il a également été décrit que la transplantation intrastriatale de MV issu d'embryon à E12 entrainait i) un volume de greffe plus de deux fois supérieur, ii) un nombre de neurones dopaminergiques en moyenne cinq fois plus important, iii) une surface d'innervation du striatum deux fois plus large et enfin iv) une densité de fibres au niveau du greffon également deux fois plus grande en comparaison avec une transplantation identique de MV issu d'embryon à E14 (Torres *et al*., 2008). De plus, il est important de rappeler que les tissus embryonnaires du mésencéphale comprennent des progéniteurs de différents sous-types de neurones dopaminergiques. En effet, trois grandes sous-populations de neurones dopaminergiques sont distinguées dans le développement du mésencéphale incluant les neurones de types A8 de la région rétro-rubrale, les neurones A9 de la SNpc et les neurones A10 de la VTA (Dahlström et Fuxe, 1964 ; Andén *et al*., 1964, 1965, 1966 ; Ungerstedt, 1971 ; Yetnikoff *et al*., 2014). L'identification des dates de naissance de ces diverses sous-populations de neurones dopaminergiques (Altman et Bayer, 1981 ; Sinclair *et al*., 1999 ; Marti *et al*., 2002 ; Bye *et al*., 2012) a révélé que chez la souris, la neurogenèse des neurones A9 précède celle des neurones A10 de la VTA. De plus, la greffe de MV précoce (E10 en comparaison de E12) engendre la formation d'un greffon plus large possédant une plus grande population de neuroblastes. Cette transplantation précoce permet d'enrichir le greffon en neurones dopaminergiques de type A9, capable d'une innervation du striatum dorso-latéral cible plus importante complétée par une libération de DA également supérieure (Bye *et al*., 2012). Enfin, il a été noté que la récupération motrice suite à une transplantation s'est révélée être directement corrélée avec le degré de ré-innervation du striatum par le transplant (Bjorklund *et al*., 1980 ; Dunnett *et al*., 1981 ; Dunnett *et al*., 1984 ; Torres et Dunnett, 2007).

En outre, de nombreuses études ont indiqué que l'origine des neurones dopaminergiques utilisés pour la transplantation joue un rôle majeur dans la récupération fonctionnelle des animaux. En effet, les greffons issus des régions autres que le MV fœtal ne permettent pas de renverser les effets observés suite à la lésion de la SNpc (Freed, 1983) c'est le cas pour des tissus provenant du noyau du raphé ou du striatum (Dunnett *et al*., 1988).

3. Age du receveur

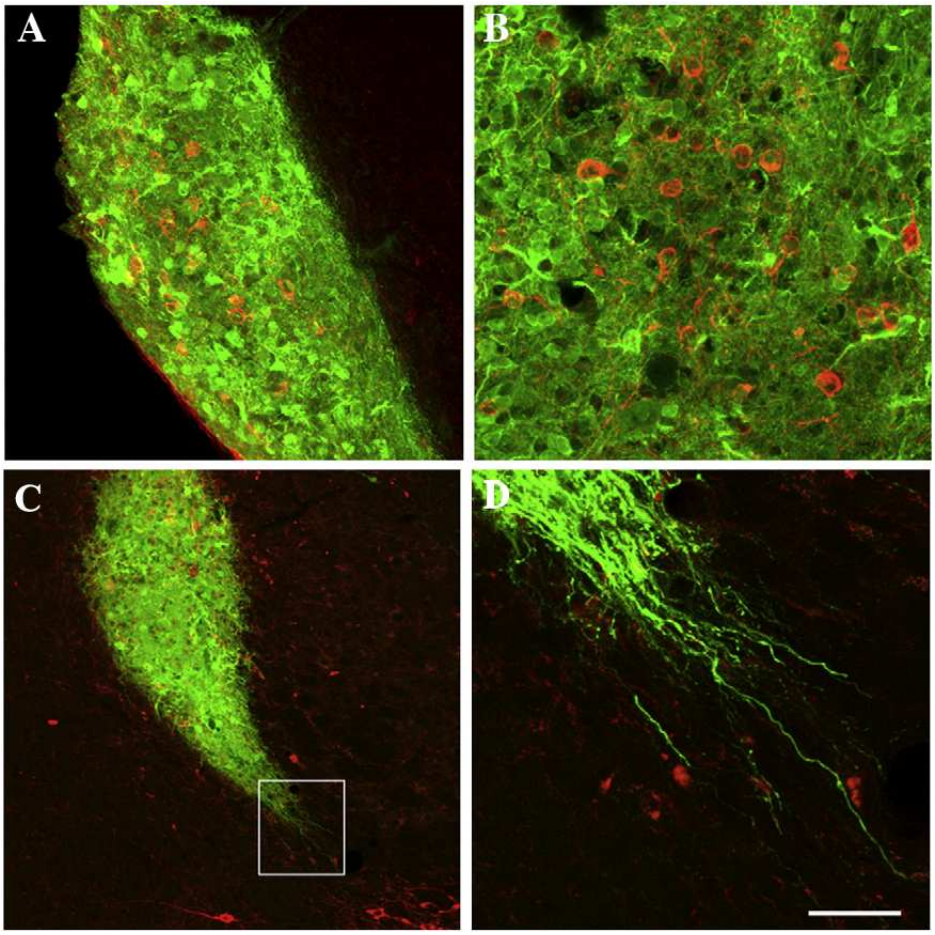
Pendant longtemps, le système nerveux central a été considéré comme étant un système figé ne permettant aucun phénomène de plasticité, de neurogenèse ou de repousse axonale. C'est pourquoi, la plupart des études antérieures employant la technique de transplantation dans le système nerveux central utilisaient des receveurs nouveaux nés plutôt que des adultes. En effet, il a été supposé que l'âge du receveur est inversement proportionnelle au développement du transplant (Hallas *et al*., 1980) ainsi qu'à la formation d'interconnexions entre l'hôte et le greffon (Lund *et al*., 1981). C'est dans les années 1990 que de nombreuses études ont observé chez le rat, des phénomènes de récupération fonctionnelle suite à la transplantation de tissu embryonnaire chez un receveur adulte. Que ces travaux aient été réalisés après transplantation de tissu cortical fœtal (Plumet *et al*., 1993) ou de MV embryonnaire (Dunnet *et al*., 1989 ; Nikkhah *et al*., 1993), les études anatomiques réalisées suite à ces transplantations ne permirent pas ou uniquement partiellement, de mettre en évidence une reconstruction des voies lésées chez l'adulte. Les limites d'identification du transplant et de ses projections ont été surmontées après la découverte de la protéine fluorescente verte, la GFP (Green Fluorescent Protein), outil pertinent pour la mise en évidence du transplant ainsi que des projections en émanant (Gaillard *et al*., 2004). Enfin, les travaux réalisés chez la souris ont permis d'affirmer que du tissu embryonnaire cortical de souris transplanté dans le cortex moteur lésé de souris adultes était capable de survivre et d'émettre des projections vers les cibles appropriées reconstruisant point-à-point les circuits moteurs lésés (Gaillard *et al*., 2007).

4. L'origine du tissu cérébral utilisé pour la transplantation

De nombreuses études ont établies que la transplantation de neurones dopaminergiques embryonnaires provenant de régions cérébrales autres que le MV (comme l'hypothalamus par exemple), chez des modèles animaux lésés spécifiquement à la 6-OHDA ou au MPTP n'engendrait qu'une faible survie (environ 2%) des cellules dopaminergiques transplantées (voir pas de survie dans certains cas), aucune ré-innervation du striatum et ne permettait pas d'induire d'amélioration comportementale et notamment *via* des tests de rotations induits à l'amphétamine (Abrous *et al*., 1988 ; Zuddas *et al*., 1991 ; Hudson *et al*., 1994 ; Frodl *et al*., 1994)

L'idée sous-jacente à ces expériences et ayant une importance capitale dans l'ensemble des stratégies thérapeutiques de transplantation cellulaire et en particulier dans le cadre de la MP est la maitrise de l'identité exacte (phénotype) des neurones dopaminergiques transplantés. En effet, il a été exposé que des cellules provenant d'une sous-population différente des cellules de la SNpc (issues de bulbe olfactif à E13.5), mais exprimant le phénotype dopaminergique, transplanté dans la SN de souris lésées unilatéralement à la 6-OHDA, n'étaient pas capable d'émettre des projections au delà des frontières du transplant et n'induisait pas d'amélioration des fonctions motrices (Figure 18) (Gaillard *et al*., 2009).

Ces résultats ont permis d'affirmer que pour une émission de projection vers les structures cibles et une ré-innervation du striatum lésé, les neurones dopaminergiques transplantés doivent obligatoirement présenter le phénotype nigral.



<u>Figure 18 :</u> Transplantation de bulbe olfactif embryonnaire de souris dans la substance noire lésée. A) Cellules embryonnaires de bulbe olfactif provenant de souris GFP à E13.5 (en vert) et transplantées dans la substance noire de souris lésée unilatéralement à la 6-OHDA exprimant la tyrosine hydroxylase (en rouge). B) Agrandissement de la photographie (A). C) et D) Les projections GFP ne sont retrouvées qu'à proximité du greffon et n'atteignent jamais le striatum. D) Agrandissement de l'encadré en (C). Barre d'échelle 50µm pour A, 40µm pour B, 130µm pour C et 30µm pour D. Modifié d'après Gaillard *et al*., 2009.

5. Le site de transplantation

a) <u>Transplantation Ectopique / Intrastriatale</u>

Dans la majorité des études, qu'elles soient expérimentales ou cliniques, le site de transplantation est le striatum, région cible des terminaisons nerveuses des neurones dopaminergiques dont les corps cellulaires sont présents au niveau de la SN.

i) Chez l'animal

Cette localisation ectopique de la greffe est selon certaines études nécessaire pour obtenir une vaste ré-innervation du striatum par les neurones transplantés (Bjorklund *et al*., 2003). En outre, plusieurs études ont contesté la capacité des cellules du greffon à étendre leurs prolongements sur de longues distances et dans le cas de la greffe intrastriatale chez le rat adulte, la limite de cette distance serait entre 1000 et 1500µm (Abrous *et al*., 1988 ; Bjorklund *et al*., 1980 ; 1983 ; Doucet *et al*., 1990 ; Freund *et al*., 1985). Cette limitation d'extension des prolongements serait liée non pas aux propriétés du greffon mais à celles du tissu hôte. En effet, plusieurs équipes ont mis en évidence l'étendue des prolongements de neurones DA jusqu'à 3 cm dans le cas de co-transplantation utilisant les nerfs périphériques comme ponts entre les neurones transplantés et la région cible (Gage *et al*., 1985 ; Abrous *et al*., 1988). De plus, les neurones greffés étendent également leurs prolongements sur de longues distances chez des receveurs rats nouveau nés (Herman *et al*., 1991) ou dans le cas de xénogreffes après transplantation de cellules humaines chez le rat (Strömberg *et al*., 1992 ; Wictorin *et al*., 1990). De ce fait, les arguments mis en avant pour affirmer que chez l'adulte, les prolongements des neurones greffés ne peuvent se développer sur de longues distances peuvent être attribués à i) l'existence de molécules inhibitrices sécrétées par les oligodendrocytes (Schwab *et al*., 1990), ii) la composition de la matrice extracellulaire non permissive chez l'adulte (Nikkhah *et al*., 1995 ; Bentlage *et al*., 1999) iii) la présence de facteurs trophiques inadéquats au sein du tissu hôte ou liés à l'implantation du greffon lui-même.

L'influence de la dénervation précédant la transplantation est également un facteur important. En effet, bien que la survie des neurones dopaminergiques greffés ne soit pas influencée par une dénervation préalable du striatum, il a été décrit que l'innervation par des neurones dopaminergiques greffés dans un striatum intact est deux fois moins importante que celle observée dans un striatum dénervé, ceci à la fois en ce qui concerne la taille de l'aire de ré-innervation qu'en terme de densité d'innervation au sein de cette surface (Schmidt *et al*., 1981 ; Gage *et al*., 1983 ; Doucet *et al*., 1990). L'hypothèse sous-jacente de ces études a été renforcée par la découverte d'une augmentation de production de facteurs de croissance diffusibles au niveau du striatum après élimination des afférences dopaminergiques (Carvey *et al*., 1996) dont notamment l'implication du BDNF et du GDNF (Zhou *et al*., 1996 ; Yurek et Fletcher-Turner, 2001).

Dans la majorité des cas, les taches comportementales complexes nécessitent un haut degré de reconnexion des circuits. En effet, certaines études ont rapporté que la récupération fonctionnelle limitée dans certains cas, voir parfois totalement absente était dû en majorité à une reconstruction fortement incomplète des circuits nigro-striés (Bjorklund *et al*., 1994 ; Lindvall *et al*., 1997). De ce fait, la greffe ectopique de neurones dopaminergiques, en particulier localisée au niveau du striatum, permet une ré-innervation de celui-ci ainsi qu'une libération de DA au sein même de cette structure, mais ne permet pas la reconstruction de la voie nigro-striée à proprement parler (Dunnett *et al*., 1987 ; Bjorklund *et al*., 1992 ; Nikkhah *et al*., 1993 ; Abrous *et al*., 1993 ; Winkler *et al*., 2000 ; Hargus *et al*., 2010 ; Bye *et al*., 2012 ; Rylander *et al*., 2013).

Il est nécessaire d'ajouter qu'en position ectopique, les cellules greffées sont totalement privées de leurs afférences et environnement physiologique. De ce fait, la libération de DA par ces neurones ne serait pas aussi bien régulée qu'en position homotypique (Winkler *et al*., 2000, Bjorklund *et al*., 2003). En effet, la position ectopique du transplant exclu les neurones greffés de leurs afférences appropriées présentes au niveau de la SNpc ainsi que des facteurs trophiques présents au niveau du site homotypique (Bjorklund et Lindvall, 2000). De plus, il serait envisageable de penser que la position homotypique du transplant dans la SNpc permettrait la libération de facteurs trophiques par ce dernier favorisant la survie des neurones dopaminergiques endommagés ou toujours intacts au sein de l'hôte (Nikkhah *et al*., 1994 ; Mukhida *et al*., 2001).

En résumé, malgré leur position ectopique les précurseurs dopaminergiques du MV greffés dans le striatum survivent, forment des contacts synaptiques avec les neurones striataux et libèrent de la DA dans le tissu environnant (Freund *et al*., 1985 ; Doucet *et al*., 1990 ; Fisher *et al*., 1990 ; Wictorin *et al*., 1990, Wictorin *et al*., 1992).

ii) <u>Chez le patient Parkinsonien</u>

A la suite des premières conclusions obtenues suite aux transplantations chez le rat adulte et montrant à la fois la survie, l'intégration du greffon, la ré-innervation du striatum, le rétablissement des niveaux de DA et surtout l'amélioration des performances motrices, les premiers essais cliniques ont été planifiés. Ces essais ont utilisé dans un premier temps des cellules de la médullosurrénale, connues pour produire des catécholamines, en particulier la DA, et permettre d'inverser les symptômes moteurs chez le rat (Backlund *et al*., 1985;

Borlongan *et al*., 1998). Malheureusement, malgré un grand nombre de métabolites catécholaminergiques retrouvés après la greffe, de faibles effets cliniques ont été constatés (Backlund *et al*., 1985). C'est au Mexique que le premier essai rapportant une amélioration spectaculaire de la rigidité et de l'akinésie des patients a été observée après transplantation de fragments médullo-surrénaliens (Madrazo *et al*., 1987). Cette dernière étude a suscité un grand nombre de travaux tentant de reproduire les résultats sans pour autant percevoir les quelconques améliorations précédemment obtenus par Madrazo (Goetz *et al*., 1990). Néanmoins, ces résultats ont permis non seulement de standardiser et d'améliorer les pratiques chirurgicales compte tenu du nombre de décès des patients suite aux transplantations (environ 50%), mais également de conclure à l'utilisation d'autres sources de cellules, avec pour alternative la plus prometteuse, celle du tissu nigral.

En dépit de résultats très variables, plusieurs essais cliniques pilotes ont mis en évidence que du tissu provenant de MV fœtal directement transplanté dans le putamen de patients atteints de la MP pouvait survivre et engendrer des bénéfices fonctionnels (Lindvall *et al*., 1988; Freed *et al*., 1990 ; Kordower *et al*., 1995 ; Olanow *et al*., 1996 ; Lindvall *et al*., 1999 ; Piccini *et al*., 1999). Mais ce n'est qu'en 2001 que la première étude en double-aveugle, permettant d'analyser spécifiquement l'efficacité du traitement a été réalisé chez 40 patients (Freed *et al*., 2001). Bien que les premiers résultats un an après la transplantation de tissu mésencéphalique embryonnaire humain n'aient permis de mettre en évidence une quelconque amélioration significative entre les deux groupes de patients, une analyse complémentaire étudiant la corrélation entre les capacités motrices et l'âge des patients a révélé les réels bénéfices de la transplantation.

Suite à cette étude, il a été établi i) la survie du greffon et le développement de fibres dopaminergiques, ii) l'augmentation de l'absorption de (18F)-Dopa dans l'hémisphère traité, révélé par des analyses d'imagerie et iii) l'amélioration chez les jeunes patients des symptômes moteurs. En dépit de ces résultats plutôt prometteurs, cette étude a également fournie la preuve des faibles capacités de récupération motrices chez les sujets âgés de plus de 60 ans et a été la première à décrire pour plus de 15% des patients transplantés, les dyskinésies induites par le greffon (Graft induced dyskinesias (GID)). Des résultats similaires ont été obtenus dans une seconde étude réalisée en 2003 où malgré une bonne survie des cellules greffées et une ré-innervation correcte du striatum, il a été impossible de mettre en évidence de manière significative une amélioration des symptômes moteurs chez ces patients Parkinsoniens (Olanow *et al*., 2003). Plus récemment, trois études cliniques ont présenté pour

la première fois l'analyse sur le long terme de la survie des neurones dopaminergiques greffés chez des patients atteints de la MP (Mendez *et al*., 2008 ; Li *et al*., 2008 ; Kordower *et al*., 2008). Malgré des résultats concluant sur la survie au delà de 14 ans des transplants ainsi que sur les bénéfices fonctionnels observés, deux de ces travaux ont rapporté la présence, dans un faible nombre de cellules greffées, d'α-synucléine ainsi que d'inclusions cytoplasmiques ressemblant à des corps de Lewy, signes caractéristiques retrouvés dans les neurones dopaminergiques de la SN de patients atteints de la MP et suggérant l'hypothèse d'une transmission des corps de Lewy de l'hôte vers le greffon (Li *et al*., 2008 ; Kordower *et al*., 2008).

Ces données ont mis en avant la théorie mentionnant le terme « prion » pour décrire les mécanismes de transmission potentiel de l'α-synucléine dans le cerveau humain. Dans ce modèle, l'α-synucléine serait libérée dans le milieu extracellulaire par des cellules vivantes ou mourantes puis captée par les neurones greffés. Une fois à l'intérieur de ces neurones, l'α-synucléine exogène pourrait entrainer un mauvais repliement de l'α-synucléine endogène conduisant à la formation de corps de Lewy. De nombreux points ont du être vérifiés pour supporter cette hypothèse, en particulier la capacité de sécrétion (Lee *et al*., 2005) et d'internalisation (Hansen *et al*., 2011) de la cellule vis-à-vis de l'α-synucléine, ainsi que la possibilité de propagation de cette dernière de cellule en cellule (Desplats *et al*., 2009 ; Lee *et al*., 2014). En outre la transmission de l'α-synucléine humaine de l'hôte vers le greffon a été mise en lumière chez le rat (Kordower *et al*., 2014) et chez le primate non humain (Recasens *et al*., 2014). A l'heure actuelle, bien que de nombreuses preuves aient été fournies quant à l'implication de mécanismes de type prion (Olanow, 2014 ; Peelaerts *et al*., 2015), d'autres hypothèses ont été proposées expliquant la présence de corps de Lewy dans une faible proportion de neurones greffés chez l'homme. Parmi ces hypothèses serait impliquées i) le complexe majeur d'histocompatibilité de Classe I, exprimé par les vaisseaux sanguins du donneur (Appel *et al*., 2009), cette inflammation locale des tissus serait en partie liée à la méthode chirurgicale ou à une incompatibilité des tissus donneur – hôte (Mendez *et al*., 2008 ; Kordower *et al*., 2008 ; Villoslada *et al*., 2008 ; Cooper *et al*., 2009) ii) le stress oxydatif ou encore iii) un processus de vieillissement accéléré des cellules transplantées dont la position ectopique du transplant très distante de l'ensemble des facteurs trophiques présents dans la SNpc, rend le microenvironnement autour du site de transplantation hautement défavorable et potentialiserait la transmission de l'α-synucléine au sein des cellules greffées (Brundin *et al*., 2008 ; Mendez *et al*., 2008 ; Behari *et al*., 2011).

Bien que cette stratégie de transplantation plaçant le greffon dans une position principalement ectopique, ait été bénéfique dans certains cas, elle reste tout de même limitée révélant de faibles récupérations motrices observées dans de nombreuses études que ce soit chez le patient (Olanow *et al*., 1996 ; Lindval, 1997 ; pour revue : Lindvall et Hagell, 2000), ou chez les modèles animaux de la MP (Annett *et al*., 1994 ; Winkler *et al*., 2000). En effet, la transplantation au niveau du striatum ne parvient pas à normaliser l'activité de certaines structures des noyaux gris centraux touchées par la MP. Par exemple, ces greffes ne permettent pas i) de restaurer l'activité des cytochromes oxydases dans le GPe et le NST (Nakao *et al*., 1998), ii) de normaliser l'activation de c-Fos dans le NST de rats lésés à la 6-OHDA (Nakao *et al*., 1998 ; Hassani et Féger, 1999 ; pour revue : Winkler *et al*., 2000). En outre, bien que la position ectopique de la greffe soit capable de restaurer l'activité fonctionnelle des neurones projetant vers la voie directe, il semble que cette activité ne soit pas complètement restaurée pour les neurones de la voie indirecte (Geffen *et al*., 1976 ; Winkler *et al*., 2000). Enfin, nous pouvons également mentionné que le greffon, placé dans un environnement défavorable, est privé des facteurs trophiques nécessaires à son intégration, sa survie et la régulation optimale de la fonction des neurones DA (Mendez *et al*., 2008 ; Brundin *et al*., 2008).

b) Transplantation Homotypique / Intranigrale

La stratégie tardive de transplantation homotypique au sein de la SNpc prend sa source de l'idée selon laquelle dans le cerveau adulte, les neurones dopaminergiques fœtaux transplantés au niveau de la SN sont incapables d'étendre leurs prolongements sur de longues distances et de ce fait, d'atteindre et ré-innerver correctement le striatum. Ce dogme à longtemps été maintenu, appuyé par les premières études de transplantation intranigrale chez le modèle animal de la MP. En effet, ces premières études de transplantation intranigrale de MV menées chez le rat lésé unilatéralement à la 6-OHDA ont conclu à la survie des neurones greffés mais aucun de ces neurones n'a émis de prolongements vers l'hôte, et aucune récupération motrice suite à la greffe n'a été observée (Bjorklund *et al*., 1983 ; Dunnett *et al*., 1983; Robertson *et al*., 1991). Les approches de micro-transplantation, moins invasives, ont également été réalisées par injection de suspensions cellulaire provenant de MV fœtal en de multiples points couvrant la région de la SNpr, avec observation de nombreuses fibres dopaminergiques ré-innervant la SNpr hôte mais, aucun prolongement émanant du transplant n'a été retrouvé au niveau de la voie nigro-striée. Cependant, une récupération fonctionnelle a

été mise en évidence par des tests de rotations induits par apomorphine (Nikkhah *et al*., 1994) ainsi que par des tests comportementaux plus précis comme l'évaluation de l'équilibre ou de la posture (Olsson *et al*., 1995 ; Menez *et al*., 1996 ; Winkler *et al*., 1999), avec toutefois, moins de bénéfices moteurs que ceux retrouvés à la suite d'une transplantation intrastriatale.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'hypothèse d'une non-permissivité du tissu hôte adulte serai responsable de l'impossibilité de repousse axonale de neurones dopaminergiques du MV le long de la voie nigro-striée (Nikkahah *et al*., 1995 ; Bentlage *et al*., 1999). Face à ces constatations, de nombreuses études se sont concentrées sur la formation d'un support de facteurs permettant la croissance axonale en établissement un pont entre la SNpc et sa région cible, le striatum. La composition de ces ponts peut être multiple incluant des suspensions cellulaires de tissu embryonnaire striatal (Dunnett *et al*., 1989), les nerfs périphériques (Aguayo *et al*., 1984), ou les facteurs trophiques comme le GDNF (Wilby *et al*., 1999). Malgré un nombre non négligeable de fibres empruntant ces ponts et donc une reconstruction de la voie nigro-striée suite à cette technique, la restauration des fonctions motrices observée n'a été que seulement partielle (Dunnett *et al*., 1989 ; Brecknell *et al*., 1996).

Il est important de noter que la transplantation intranigrale a également été réalisée dans le cadre de xénogreffe en transplantant du tissu embryonnaire fœtal humain ou porcin dans la région de la SNpc chez le rat adulte et il a été observé que la plupart de ces greffons ont émis des prolongements vers le striatum (Wictorin *et al*., 1992 ; Isacson *et al*., 1995). Les premières explications de ces résultats se sont centrées sur la possibilité que, de par l'origine de l'espèce différente, les xénogreffes seraient insensibles aux facteurs inhibiteurs exprimés chez le rat. Par la suite, les chercheurs se sont tournés vers l'explication d'une différence de technique de visualisation des projections axonales greffées dans ces deux études en rapport avec les précédentes. En effet, le cadre de la xénogreffe permet de réaliser un marquage ubiquitaire du greffon uniquement et mettre en évidence les nombreuses projections axonales émanant du transplant (Wictorin *et al*., 1992 ; Isacson *et al*., 1995 ; Isacson *et al*., 1996).

En parallèle des travaux réalisés dans le contexte de la MP, les travaux réalisés dans d'autres types de transplantations au niveau du système nerveux central ont permis de confirmer l'ensemble des observations obtenues précédemment et de réfuter l'idée d'incapacité des neurones greffés à étendre leurs prolongements sur de longues distances (Bjorklund *et al*., 1986 ; Baker *et al*., 2005 ; Gaillard *et al*., 2007).

En outre, l'avancé des progrès techniques a permis pour de nombreux travaux, d'étudier la croissance axonale de neurones issus de transplantations. En particulier dans le cadre de la MP (Figure 19), l'utilisation, comme source de neurones embryonnaires pour la transplantation intranigrale, de souris transgéniques exprimant de façon ubiquitaire la GFP sous le contrôle du promoteur de la β-actine, a permis de mettre en évidence, de nombreuses projections axonales émanant du transplant (Gaillard *et al*., 2009 ; pour revue Gaillard et Jaber, 2011).

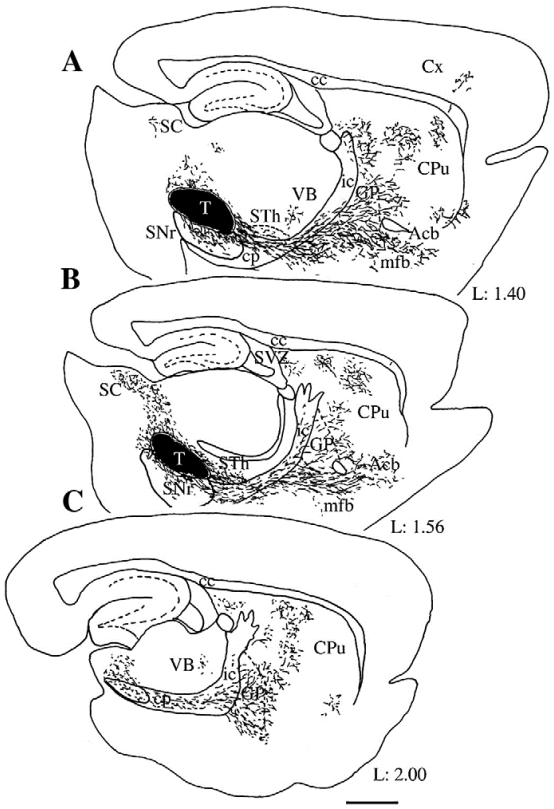
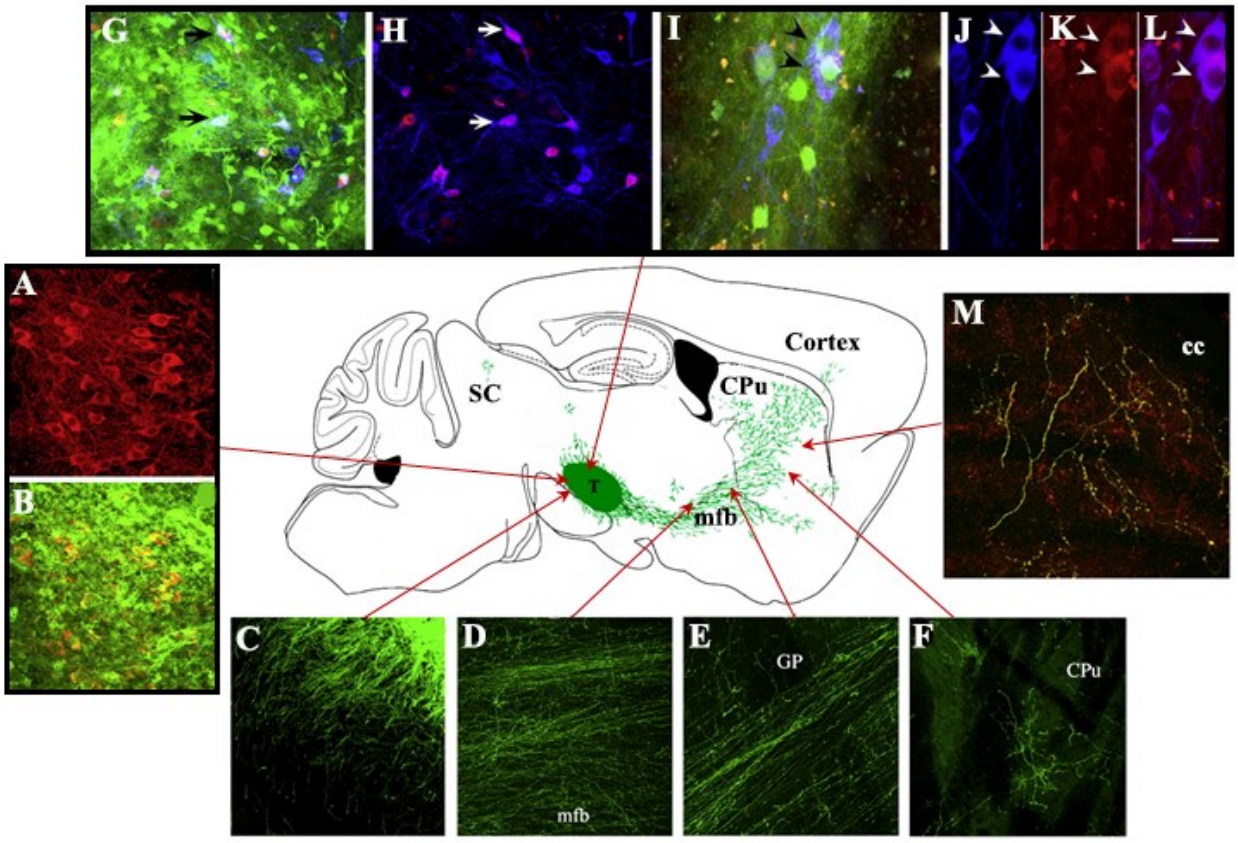


Figure 19 : Illustrations présentant la distribution de projection des fibres GFP deux mois après transplantation intranigrale de mésencéphale ventral fœtal issus de souris GFP. Les neurones dopaminergiques de MV greffés dans la SN envoient des projections vers les régions qui sont normalement innervées par les neurones dopaminergiques du MV natif. Les coupes sagittales de A à C sont organisées selon un ordre latéro-médial. Acb: noyau accumbens; cc: corps calleux; CPu: caudé putamen; cp: pédoncule cérébral; Cx: cortex; GP: globus pallidum; ic: capsule interne; SC: colliculus supérieur; mfb: voie nigro-striée; SNc: substance noire *pars compacta*; SNr: substance noire *pars reticulata*; STh: noyau sous-thalamique; SVZ: zone sous-ventriculaire; T: transplant; VB: noyau thalamique ventro-basal. d'après Gaillard *et al*., 2009.

En effet, ces travaux ont pour la première fois permis d'affirmer que la transplantation, issue de MV embryonnaire de souris GFP sous le contrôle du promoteur de la β-actine, dans la SN lésée à la 6-OHDA de souris adultes permettait d'une part une bonne intégration des cellules greffées au sein de la SN hôte et l'expression par ces cellules de marqueurs dopaminergiques (TH, VMAT-2, DAT). Ces travaux ont également révélé la co-expression, au sein des neurones dopaminergiques greffés, des marqueurs de type A9 (nigral, Girk2) et en plus faible proportion, des marqueurs de type A10 (VTA, calbindine) (Figure 20). D'autre part, cette technique a permis de mettre en avant le développement des projections émanant du transplant et cheminant le long de la voie nigro-striée jusqu'au striatum (Figure 20) ainsi que l'augmentation des taux de DA au niveau du striatum et la restauration des performances motrices *via* des tests de rotations induits par l'apomorphine (Gaillard *et al*., 2009).



<u>Figure 20 :</u> Observation des différents sous-types de neurones dopaminergiques au sein du transplant. (A-B) Immunomarquage des cellules transplantées GFP (en vert) co-exprimant la tyrosine hydroxylase (en rouge). (C) Fibres émanant du transplant. (D-F) Fibres des neurones transplantés projetant le long de la voie nigro-striée passant respectivement par le mfb, le GP pour atteindre finalement le CPu. (G-L) Expression des marqueurs calbindine et Girk2 parmi les neurones dopaminergiques du transplant. Immunomarquage contre la GFP

(en vert), la TH (en bleu) et la calbindine (en rouge) de G à H ou Girk2 (en rouge) de I à L. Les flèches mettent en avant les neurones doublements marqués. (M) Expression du marqueur DAT (en rouge) par les axones des neurones GFP (en vert) au niveau du striatum. cc : Corps calleux ; CPu : Striatum ; GP : Globus pallidum ; mfb : Faisceaux médian du télencéphale Barre d'échelle : 50µm pour (A et B) ; 63µm pour (C-F et G-H) ; 30µm pour (I-M). Adapté de Gaillard *et al*., 2009.

En parallèle de ces travaux, une seconde étude a réalisé la même année, dans le modèle de souris lésée à la 6-OHDA, la transplantation intranigrale de MV d'embryons provenant de souris GFP sous le contrôle du promoteur de la TH. Ces travaux ont confirmé la possibilité d'une reconstruction de la voie nigro-striée à la suite d'une transplantation intranigrale ainsi que la restauration des fonctions motrices *via* des tests de rotations (Thompson *et al*., 2009) .

V. Objectif de la thèse

Ce projet de thèse s'inscrit dans le cadre de l'amélioration des techniques et des concepts de la thérapie cellulaire pour le traitement de la MP et en particulier dans l'apport de nouvelles alternatives de réparation des voies dopaminergiques dégénérées chez un modèle animal de la MP. Il s'appui sur les résultats obtenus suite aux travaux précédemment exposés, mettant en avant la survie et l'intégration du greffon après la transplantation intranigrale de MV fœtal issue de souris GFP dans un modèle de souris adulte lésées unilatéralement à la 6-OHDA. Après l'observation d'une différentiation des cellules transplantées en neurones dopaminergiques développant des projections sur de longues distances au travers de la voie nigro-striée vers l'ensemble des régions cibles et l'expression des marqueurs dopaminergiques, il a été mis en évidence une amélioration des rotations induites par l'apomorphine (Gaillard *et al.*, 2009). Toutefois, la restauration des rotations induites par les drogues a été observée dans de nombreux travaux chez le rongeur à la fois après transplantation intranigrale (Nikkhah 1994 ; Gaillard *et al*., 2009 ; Thompson *et al*., 2009) mais également intrastriatale (Klein *et al.*, 2007 ; Heuer *et al*., 2013). Cependant il n'a pas été encore clairement établit que ces deux types de transplantation soient capables de restaurer des fonctions motrices plus complexes comme des taches de préhension.

Sur la base de ces résultats, l'objectif de ce projet de thèse a donc été d'évaluer le bénéfice de la greffe intranigrale *versus* intrastriatale de neurones DA issus de MV embryonnaire dans un modèle de souris de la MP. Pour ce faire, le modèle animal de la MP est obtenu par injection unilatérale de 6-OHDA au niveau de la SNpc des souris adultes. Trois semaines après la lésion, les neurones DA fœtaux provenant d'embryons de souris sur-exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de la tyrosine hydroxylase seront transplantés sous forme d'une suspension cellulaire dans la SN et dans le striatum pour comparaison. Le devenir de ces cellules transplantées sera étudié sur le plan neuroanatomique par le biais d'analyses immunohistochimiques, ainsi que sur le plan fonctionnel évalué par des tests comportementaux et une étude électrophysiologique.

De ce fait, cette étude mettra en parallèle quatre groupes d'animaux : un groupe de souris n'ayant subit aucune intervention (noté par la suite groupe contrôle) ; un groupe lésé unilatéralement à la 6-OHDA (groupe lésé) ; un groupe lésé puis transplanté dans le striatum (groupe intrastriatal) ; un groupe lésé puis transplanté dans la SN (groupe intranigral).

MATERIELS ET METHODES

I. Procédure expérimentale de lésion à la 6-OHDA

A. Animaux

L'ensemble des expérimentations est réalisé chez la souris femelle de souche C57Bl/6 (R. Janvier, Le Genest-Saint Isles, France), âgée de 6 mois au moment de la première chirurgie. Les animaux ont été maintenus isolés dans des cages ventilées sous un cycle jour/nuit de 12 heures. Durant la totalité des semaines couvrant le test de l'escalier, les animaux ont subit une restriction alimentaire de 20 heures précédent chaque session. En dehors de cette condition, les souris ont eu accès à l'eau et la nourriture *ad libitum.*

Les tissus utilisés pour la transplantation, proviennent d'embryons de souris transgéniques (E12,5) sur-exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de la tyrosine hydroxylase (TH-GFP) permettant ainsi d'identifier le transplant dans le cerveau hôte (Sawamoto *et al*., 2001). Chez ces souris transgéniques, il a été rapporté que l'expression de la GFP est induite au sein des neurones dopaminergiques en développement ainsi que tout au long de la période post-natale (Matsushita *et al*., 2002).

L'ensemble des animaux a été utilisé en accord avec les directives (2010/63/UE) du parlement européen et du conseil de l'union européenne du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

B. Protocole de lésion à la 6-OHDA

De nombreuses pathologies neurodégénératives peuvent être mimées par des modèles animaux en utilisant des procédures standardisées recréant, le plus spécifiquement possible, la neuropathologie de la maladie et/ou les résultats comportementaux. A la suite des découvertes anatomopathologiques de la MP, en particulier de la perte des neurones dopaminergiques de la SNpc, un grand nombre de modèles animaux ont été développés sur diverses espèces dont les plus classiques sont les modèles animaux à la 6-OHDA et au MPTP. Au cours de cette étude nous avons utilisé le modèle de souris lésée unilatéralement à la 6-OHDA, c'est pourquoi nous nous attacherons à ne décrire que la procédure expérimentale de ce modèle.

La 6-OHDA est une analogue hydroxylée de la DA isolée pour la première fois par Senoh et Witkop en 1959 (Senoh et Witkop, 1959) induisant la dégénérescence des neurones

catécholaminergiques incluant, dans notre cas, les neurones de la voie nigro-striée (Ungerstedt, 1968). De par son incapacité à passer la barrière hémato encéphalique, cette neurotoxine doit obligatoirement être injectée par stéréotaxie directement dans le cerveau de l'animal. Les sites d'injection sont divers, et retrouvés en majorité au niveau du striatum, dans le faisceau médian du télencéphale ou directement dans la SNpc (Perese *et al*., 1989). Notre modèle se base sur une lésion unilatérale de la SNpc, capable de générer une dégénérescence neuronale importante et possédant des propriétés de reproductibilités. Ceci nous a permis d'obtenir un modèle de souris hémi-parkinsonien contractant un déficit moteur controlatéral au site d'injection. Pour ce faire, les animaux sont anesthésiés à l'aide d'Avertine (250mg/Kg) par une injection intra-péritonéale puis placés dans l'appareil stéréotaxique. La 6-OHDA (8µg/µl, Sigma) dissoute dans du NaCl contenant 0,1% d'acide ascorbique (prévenant de l'oxydation) est injectée très lentement, pour un volume total de 1 µl à l'aide d'une seringue Hamilton, directement dans la SNpc gauche aux coordonnées stéréotaxiques suivantes : Antéro-postériorité : -3,1mm ; Latéralité : 1,4mm par rapport au bregma et de profondeur 3,8mm par rapport à la surface du cerveau (Paxinos et Flanklin, 2001). Cinq minutes après l'injection, la seringue est remontée lentement afin de minimiser le reflux, le crane de l'animal est essuyé à l'aide d'un coton et la peau est agrafée.

II. Procédure expérimentale de transplantation de mésencéphale ventral

A. Origine des tissus donneurs

Afin de faciliter l'identification des neurones dopaminergiques transplantés ainsi que leurs projections axonales dans le cerveau de l'hôte, les cellules de MV à transplanter sont isolées à partir d'embryons (E12,5) de souris transgéniques exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de la TH (Sawamoto *et al.,* 2001).

La technique de transplantation est adaptée de Björklund et ses collaborateurs (Björklund *et al.*, 1983, Gaillard *et al*., 2009) et réalisée 3 semaines après la lésion. Pour ce faire, des souris gestantes sont générées en croisant des souris femelles C57BL/6 avec des males hétérozygotes transgéniques exprimant la GFP sous le contrôle du gène de la TH (9 kilobases

en amont) (Figure 21). Le jour de visualisation du bouchon vaginal est désigné comme le jour embryonnaire E0,5.

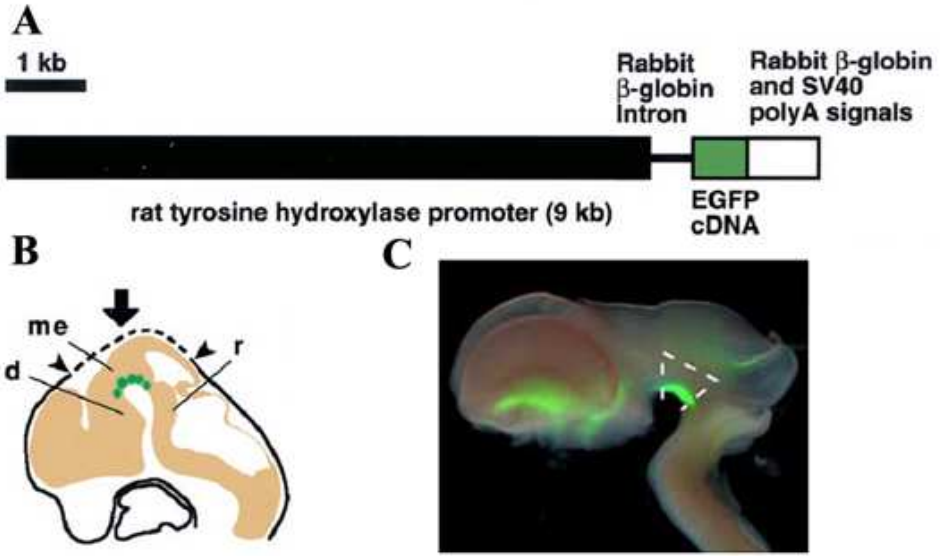
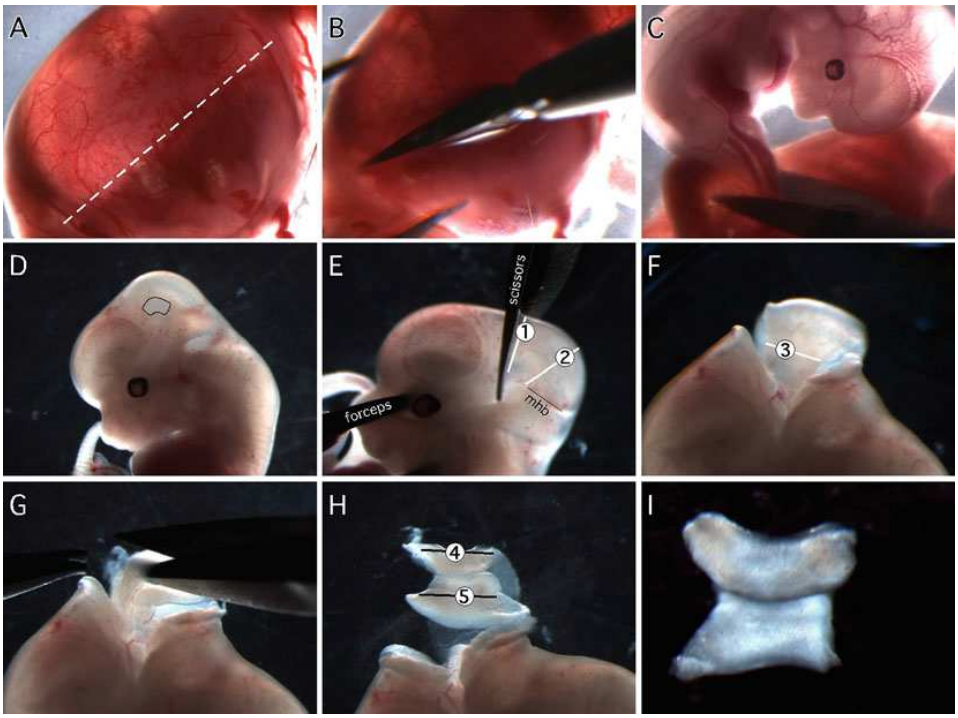


Figure 21 : Caractéristiques de la souris transgénique TH-GFP. Structure et localisation du transgène TH-GFP (A). Schématisation (B) et illustration (C) des neurones dopaminergiques du mésencéphale marqué à la GFP au cours du stade embryonnaire. Les flèches en (B) indiquent la ligne médiane. Les lignes pointillées en (C) présentent les zones de dissections du mésencéphale ventral pour la préparation de la suspension cellulaire en vue de la transplantation. d : diencéphale ; me : mésencéphale ; r : rhombencéphale ; barre d'échelle : 100µm. Adapté de Sawamoto *et al*., 2001.

B. Protocole de dissection du MV et la transplantation

La souris gestante reçoit une dose létale d'anesthésique et les sacs embryonnaires contenant les embryons (Figure 22.A-C) sont rapidement sorties et placés dans une solution saline contenant 0,6% de glucose maintenue sur la glace tout au long de la procédure. Les embryons sont disposés dans ce même milieu et le MV est prélevé en suivant plusieures étapes dont les principales sont répertoriées ci-après (pour revue Thompson et Parish, 2013) (Figure 22). La première étape (Figure 22.E) consiste à inciser la partie séparant le mésencéphale du diencéphale proche de l'extrémité antérieure du tube mésencéphalique, puis de réaliser une seconde incision au niveau de la limite entre le mésencéphale et la partie postérieure du cerveau de l'embryon (Figure 22.E). L'étape suivante consiste à isoler le tube mésencéphalique et séparer le tissu conjonctif entourant le MV (Figure 22.F, G). Le tube

mésencéphalique peut alors être sorti, la face dorsale de celui-ci est maintenue plaquée contre la boite de pétri en vue de sectionner, *via* une coupe parallèle à la ligne médiane du tube et à une distance d'environ un tiers entre la ligne médiane dorsale et ventrale du tube mésencéphalique (Figure 22.H). Enfin, la dernière étape (Figure 22.H, I) permet de libérer le fragment de MV en sectionnant, en parallèle et au même niveau que la section précédente, de l'autre coté du tube mésencéphalique. Les structures telles que les méninges ou les vaisseaux sanguins sont précautionneusement éliminées du prélèvement puis les tissus sont morcelés en petits fragments et dissociés en suspension cellulaire à l'aide d'une pipette pasteur par de légères aspirations. Juste avant la transplantation, la viabilité des cellules est examinée par le test d'exclusion au bleu de Trypan au cours duquel 95% des cellules de la suspension ce sont révélées viables.



<u>Figure 22 :</u> Protocole de dissection du mésencéphale ventral et la transplantation. Thompson et Parish, 2013.

La transplantation est réalisée trois semaines après la lésion. Une fois la suspension cellulaire de MV obtenue, les animaux sont anesthésiés puis placés dans l'appareil stéréotaxique et environ 150.000 cellules (100.000 cellules /µl) sont alors transplantées soit dans la SN soit dans le striatum des animaux à l'aide d'une seringue Hamilton de 5 µl. Les

coordonnées stéréotaxiques utilisées pour la transplantation au niveau de la SN sont les mêmes utilisées pour la lésion (pour rappel : Antéro-postériorité : -3,1mm ; Latéralité : 1,4mm par rapport au bregma et de profondeur 3,8mm par rapport à la surface du cerveau). La transplantation au niveau du striatum a été réalisée aux coordonnées suivantes : Antéro-postériorité : 0,5mm ; Latéralité : 2mm par rapport au bregma et de profondeur 2,8mm par rapport à la surface du cerveau. Cinq minutes après l'injection, la seringue est remontée lentement afin de minimiser le reflux de la suspension cellulaire. Tout au long de la procédure de transplantation, les cellules sont maintenues sur la glace et lentement triturées pour maintenir une homogénéisation de la suspension avant la transplantation. A la suite de la transplantation, les animaux sont placés sous surveillance à l'animalerie pour un rétablissement complet avant d'entamer, au cours de la troisième semaine post-transplantation, les tests de comportements.

III. Procédures expérimentales comportementales

Les tests comportementaux sont des outils majeurs dans l'étude de l'altération des fonctions motrices suite à des lésions totales ou partielles de la voie nigro-striée. Afin d'évaluer les déficits engendrés par la lésion et également de mieux caractériser la récupération fonctionnelle après transplantation intranigrale ou intrastriatale, une batterie de tests comportementaux a été réalisée. Le modèle de lésion unilatérale de la SNpc décrit précédemment se révèle être un outil majeur dans l'étude comportementale. En effet, il possède le double avantage pour un même individu, de présenter un déficit moteur du coté opposé à la lésion et d'être également son propre contrôle de par son hémisphère intact. Nous avons réalisé pour cette étude un ensemble de tests combinant à la fois l'évaluation globale du déficit moteur jusqu'à l'analyse de mouvements fins. De plus, la combinaison de ces tests va permettre l'étude de différents paramètres moteurs tels que la coordination motrice, l'équilibre, la préhension fine ou la démarche.

Le déroulement de l'étude comportementale est basé sur les précédents travaux réalisés chez la souris adulte, après la transplantation intranigrale de MV embryonnaire (Gaillard *et al*., 2009 ; Thompson *et al*., 2009). Plus précisément, Gaillard et collaborateurs ont mis en évidence, 8 semaines après la transplantation, une densité importante de projections issues des

neurones dopaminergiques greffés innervant le striatum. En parallèle, l'étude de Thompson et de ses collaborateurs a confirmé que 6 semaines après la transplantation, les projections des neurones dopaminergiques greffés dans la SN étaient retrouvées au niveau du striatum à plus de 6 mm du transplant et que la densité de ces fibres était augmentée 16 semaines après transplantation. En conséquence de ces observations neuroanatomiques, l'étude comportementale dans notre projet a été divisée en 2 phases. La première phase comprend les semaines 3 à 5 post-transplantation et permettant d'évaluer la récupération fonctionnelle spontanée des déficits moteurs engendrés par la lésion à la 6-OHDA. La seconde phase débute à partir de la 6ème semaine post-transplantation et permet de mesurer la récupération motrice suite à la transplantation. Le déroulement de l'étude comportementale (Tableau 2) et la présentation de l'ensemble de ces tests comportementaux est détaillée ci-dessous.

Tests	**Paramètres étudiés**	**Déroulement**
Rotation	Étendue de la dénervation nigro-striée et les déficits moteurs unilatéraux	- 3ème semaine post-lésion - 13ème semaine post-transplantation
Descente de tige	Coordination motrice et équilibre	- 2ème semaine pré-lésion (Baseline) - 3ème semaine post-transplantation - 7ème semaine post-transplantation
Cylindre	Déficits unilatéraux des membres antérieurs	- 3ème semaine post-transplantation - 10ème semaine post-transplantation
Traversée de la poutre modifié	Coordination motrice et équilibre	- 6ème semaine post-transplantation
Test de l'escalier	Performance motrice et préhension fine des membres antérieurs	- 4ème à 2ème semaines pré-lésion (Baseline) - 3ème à 8ème semaines post-transplantation - 16ème semaine post-transplantation
Mouvement de préhension	Séquence fine des mouvements	- 6ème à 8ème semaines post-transplantation
Analyse de la marche	Coordination motrice, synchronisation et démarche	- 2ème semaine pré-lésion (Baseline) - 3ème semaine post-transplantation - 10ème semaine post-transplantation

<u>Tableau 2 :</u> Descriptif et déroulement de l'ensemble des tests comportementaux réalisés au cours de l'étude.

A. Test de rotation

La perte des neurones dopaminergiques suite à une lésion à la 6-OHDA provoque des déficits moteurs pouvant être révélateurs de l'étendue de la lésion. Dans le modèle de lésion unilatérale à la 6-OHDA, le test de rotations induites par les drogues, et notamment par l'apomorphine (agoniste dopaminergique), va entrainer un mouvement rotatoire controlatéral au coté de la lésion. Il a été décrit qu'après injection de faibles doses d'apomorphine, une lésion de plus de 50% des neurones DA de la SNpc (correspondant à environ 90% des fibres dopaminergiques du striatum) est nécessaire pour induire des rotations (Ungerstedt, 1968 ; Ungerstedt *et al*., 1970 ; Hudson *et al*., 1993). Ces comportements rotatoires seraient dû à l'hyper-sensibilité des recepteurs dopaminergiques localisés au niveau des neurones du striatum du coté de la lésion (Figure 23). De par son potentiel prédictif sur l'importance de la dénervation dopaminergique (Grealish *et al*., 2010), ce test a été réalisé sur l'ensemble des animaux lésés et transplantés et ce à deux reprises. Dans un premier temps, le test de rotations induites par l'apomorphine est effectué trois semaines après lésion unilatérale à la 6-OHDA des animaux afin d'estimer l'étendue de la dénervation dopaminergique. Dans un second temps, ce test est réalisé 13 semaines après la transplantation sur l'ensemble des animaux lésés et transplantés dans les deux conditions afin d'examiner la récupération fonctionnelle spontanée chez les animaux lésés et la potentielle récupération fonctionnelle de la transplantation intranigrale et / ou intrastriatale.

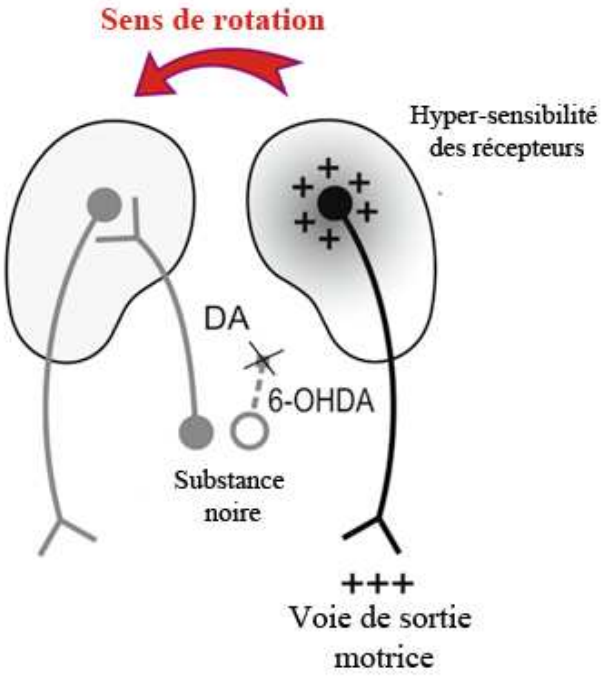


Figure 23 : Représentation schématique de l'effet de l'apomorphine chez un modèle animal de lésion unilatérale à la 6-OHDA. L'apomorphine induit une rotation controlatérale au coté de la lésion par activation des récepteurs post-synaptiques hyper-sensibilisés au niveau du striatum. DA : Dopamine ; 6-OHDA ; 6-Hydroxydopamine. Adapté de Dunnett et Torres, 2011.

Le dispositif nécessaire au test de rotation (Figure 24) comprend un harnais fixé sur le dos de l'animal maintenu par des fils plastiques passant derrières les pattes avant. Le harnais est lui-même relié à un câble métallique souple connecté à un compteur pour l'enregistrement des rotations gauche ou droite. Il est possible de paramétrer le logiciel d'enregistrement pour une comptabilisation des rotations de 180° et de 360° indépendamment dont les sens horaires ou antihoraires sont respectivement identifiables. Chaque souris est alors placée dans un bol métallique de 40 cm de diamètre pour une session de 60 min.

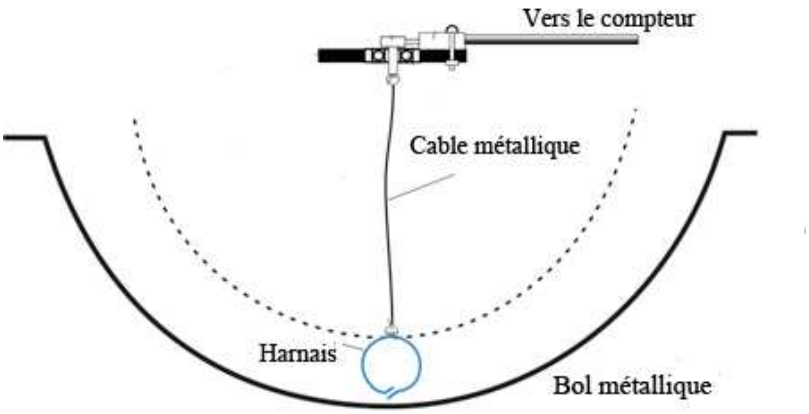


Figure 24 : Schématisation du dispositif nécessaire au test de rotation. Adapté de Dunnett et Torres, 2011.

Trente minutes avant le début du test, les animaux sont placés dans la pièce d'expérimentation pour habituation. La solution d'apomorphine (apomorphine : 0,5mg/kg ; vitamine C : 20mg/kg) fraichement dissoute dans du NaCl 0,9% est administrée par voie sous-cutanée et les souris sont immédiatement installées dans un harnais puis placée dans le bol métallique après l'injection. L'enregistrement démarre dès que l'animal est placé dans le bol. Les données sont exprimées en nombre de rotations controlatérales nettes égales au nombre

de rotations controlatérales – le nombre de rotations ipsilatérales ; réalisées au cours d'une session de 60 min.

B. Test de la descente de tige

Le test de la descendre de tige (pole test) a été mis en place par Ogawa et ses collaborateurs dans le but d'une évaluation de la « bradykinésie globale » après le traitement de souris au MPTP (Ogawa *et al.*, 1985). L'utilisation de ce test a par la suite été étendue à des modèles animaux de la MP où Matsuura et son équipe ont montré l'existence d'une corrélation entre la concentration de DA dans le striatum et le niveau des performances motrices de l'animal (Matsuura *et al.*, 1997). Ce test est très utilisé dans l'étude du contrôle postural et plus généralement dans l'évaluation des mécanismes d'intégration sensori-moteurs (Korpi *et al.*, 1999). Le dispositif est constitué d'une tige de bois verticale, fixée sur un socle sur lequel est réparti de la litière pour inciter l'animal à descendre. La tige d'une hauteur de 50 cm et de 1 cm de diamètre est de surface rugueuse permettant l'agrippement. Chaque souris, placée tête vers le haut au sommet de cette tige va alors réaliser un retournement de 180° pour descendre la tige tête vers le bas (Figure 25.A). Chez les modèles animaux de la MP, le déficit dopaminergique va entrainer un trouble posturale et d'équilibre conduisant à des difficultés de retournements et de descente de la tige. (Figure 25.B).

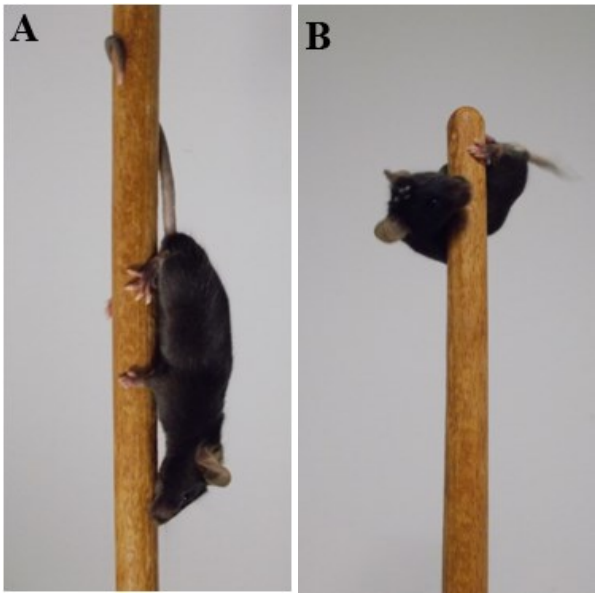


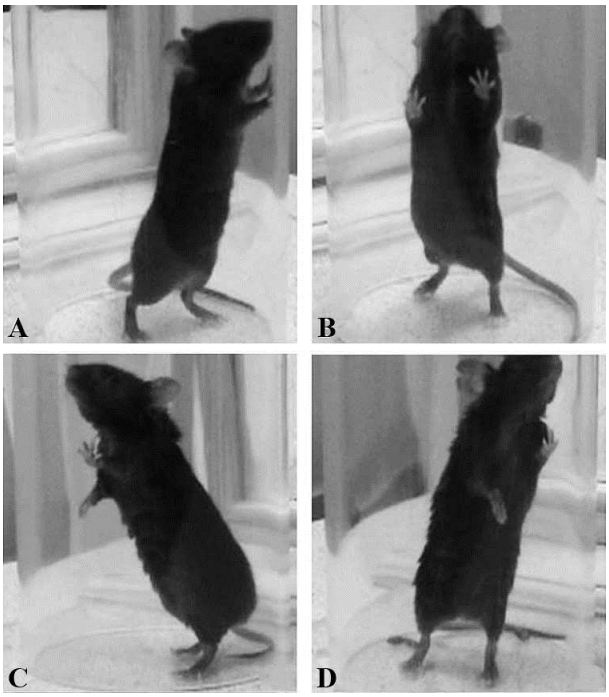
Figure 25 : Photographies présentant la descente de la tige. En (A), descente de la tige après retournement chez un animal normal. La souris descend verticalement, tête vers le bas

jusqu'au sol. En revanche, chez la souris lésée unilatéralement à la 6-OHDA (B), la souris ne parvient pas à réaliser un retournement complet et glisse le long de la tige pour atteindre le sol.

Les sessions sont filmées et ultérieurement analysées pour permettre la mesure précise du temps nécessaire au retournement complet de l'animal (T-Turn) ainsi que du temps total mis pour la descente complète de la tige (T-Total). Une souris descendant la barre sans se retourner complètement se voit attribuer un T-Turn égal au T-Total. Avant le test, une session d'habituation composée de 5 essais est réalisée au cours de laquelle, la remonté de l'animal à mi-hauteur de la tige est fortement dissuadée. Une session baseline est effectuée 5 semaines avant la lésion puis, les 3ème et 7ème semaines après la transplantation, permettant d'évaluer les performances motrices de chaque animal. Chaque session de test comporte 3 essais et les données sont exprimées en fonction de la moyenne de ces 3 essais.

C. Test du Cylindre

Le test du cylindre a été au départ développé par Schallert et Tillerson en 2000 (Schallert et Tillerson, 2000) pour la détection des déficiences des pattes antérieures chez le rat présentant une lésion unilatérale à la 6-OHDA. Ce test se révèle comme étant simple et efficace pour la détection des déficits unilatéraux lors de l'utilisation volontaire des pattes avant. Par la suite ce test a été adapté chez la souris (Iancu *et al*., 2005, Grealish *et al*., 2010). Dans notre étude, les animaux sont placés dans un bécher en verre de 11,5 cm de diamètre pendant 3 min. Deux caméras sont disposées de part et d'autre du bécher pour permettre une visualisation à 360°. Une fois placée dans le bécher, l'animal va présenter des comportements d'exploration du nouvel environnement se manifestant par des redressements et des appuis de ses pattes avant contre la paroi du bécher. Alors qu'une souris contrôle effectue un nombre de contacts équivalent entre ses pattes avant, à l'inverse, une souris lésée unilatéralement à la 6-OHDA va présenter un nombre de contacts moins important avec sa patte controlatérale au coté de la lésion (dans notre cas à droite) en comparaison de sa patte ipsilatérale (à gauche) (Figure 26).



<u>Figure 26 :</u> Photographies présentant le test du cylindre chez des souris contrôles ou lésées à la 6-OHDA. Les souris contrôles (A) et (B) réalisent autant d'appuis droits que gauches. Suite à une lésion unilatérale 6-OHDA à droite (C) et (D), les souris vont présenter un déficit moteur controlatéral à la lésion et réaliser un nombre d'appuis contre la paroi du bêcher plus importants avec la patte ipsilatérale (gauche) au coté de la lésion. Adapté de Starkey *et al*., 2005.

Chaque session est analysée *a posteriori*, et le nombre de contacts réalisé avec la patte droite ou gauche sur la paroi du bécher est comptabilisé. Les contacts sans redressement de l'animal ainsi que les contacts simultanés ne sont pas comptabilisés. Les données sont exprimées sous la forme du pourcentage de contacts controlatéraux à la lésion calculées selon la formule :

$$\%\ \text{Contacts } \textbf{Controlatéraux} = \frac{\text{Nombre de contacts } \textbf{Controlatéraux}}{\text{Nombre de contacts } \textbf{Contralatéraux} + \text{Nombre de contacts } \textbf{Ipsilatéraux}} \times 100$$

D. Test de la poutre modifié

Le test de la poutre modifié « Challenging beam test » est une adaptation du « beam walking test » mis en place par Drucker-Colin et Garcia-Hernandez pour l'étude des déficits moteurs chez le rat. Les animaux doivent cheminer le long d'une poutre inclinée pour atteindre une plateforme et le nombre de dérapages lors de la traversée est alors comptabilisé (Drucker-Colı´n et Garcia-Hernandez., 1991). Ce test a été par la suite adapté chez la souris pour l'étude de l'équilibre et de la coordination motrice. Nous utilisons au laboratoire un dispositif adapté de Carter et ses collaborateurs (Carter *et al*.,1999) complexifié où une poutre de plexiglas d'un mètre de long (Figure 27.A), assemblée de 4 parties longues de 25 cm chacune et à largeur dégressive (3,5 ; 2,5 ; 1,5 ; 0,5 cm). Les animaux partent du coté le plus large vers le plus étroit, cette dernière partie étant directement reliée à leurs cages. Deux jours d'entrainement sont nécessaires avant la phase de test. Le premier jour, les animaux reçoivent deux essais assistés, consistant à déplacer leur propre cage devant eux pour faciliter leur avancée, puis autant de traversée non assistée jusqu'à l'obtention de 5 traversées complètes. Le second jour, les animaux sont entrainés à traverser 5 fois la poutre. Le jour du test, les animaux sont autorisés à traverser une fois la poutre puis une grille, de largeur équivalente et de maille carré de 1 cm, est apposée sur la poutre afin d'augmenter la difficulté de la traversée (Figure 27.B). Les animaux sont alors autorisés à traverser 2 fois la grille puis les mesures sont retenues pour 3 essais. Pour permettre une analyse plus précise des données, chaque session est filmée et analysée *a posteriori*. Les paramètres mesurés lors de ce test sont le temps nécessaire à la traversée de la poutre (en secondes), ainsi que le pourcentage de dérapages (droits ou gauches) effectués par les pattes avant par rapport au nombre d'appuis (droits ou gauches) selon la formule :

$$\%\ dérapages\ droits = \frac{Nombre\ de\ dérapages\ avant\ droits}{Nombre\ d'appuis\ avant\ droits\ (posés +\ dérapés)} \times 100$$

$$\%\ dérapages\ gauches = \frac{Nombre\ de\ dérapages\ avant\ gauches}{Nombre\ d'appuis\ avant\ gauches\ (posés +\ dérapés)} \times 100$$

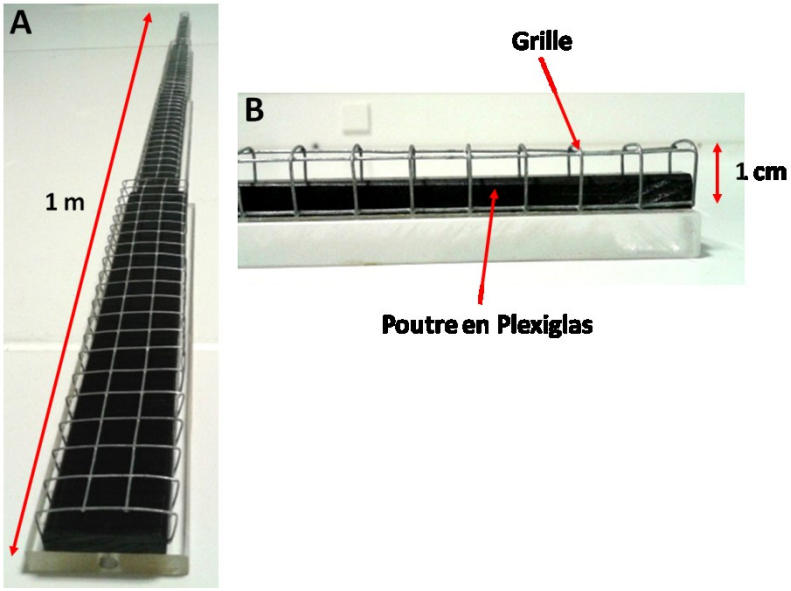


Figure 27 : Illustration du dispositif utilisé dans le test de la poutre modifié. (A) Photographie de la poutre dans son ensemble. (B) Vue de coté du dispositif présentant la poutre de Plexiglas sur laquelle les souris sont entrainées ainsi que la grille de maille carrée de 1 cm de coté.

E. Test de l'escalier

Le test de l'escalier a été développé chez le rat par Montoya et ses collaborateurs en 1991 afin de permettre l'analyse de la motricité fine des membres antérieurs (Montoya *et al.,* 1991), puis adapté chez la souris par Baird en 2001 (Baird *et al.,* 2001). Dans ce test, la souris est placée dans un dispositif en plexiglas (Campden Instruments, Loughborough, UK), composé d'un compartiment de départ fermé par un couvercle et prolongé par un couloir étroit et horizontal avec de chaque coté un réservoir dans lequel peut être inséré un double escalier de 8 marches chacun (Figure 28). Chacune des marches est creusée en son centre pour permettre d'y placer une boulette de nourriture (20 mg, BioServe, Frenchtown, NJ). Les dimensions de l'appareil sont telles qu'une souris peut avancer dans le couloir et atteindre en bas, les boulettes sur l'escalier gauche avec sa patte gauche et sur l'escalier droit avec sa patte droite. L'étroitesse du couloir ne permet pas à la souris de se retourner et de croiser ses pattes pour récupérer les boulettes. De chaque coté du dispositif se trouve une camera miniature

monochrome (ViewPoint Life Sciences, Lyon, France) capable de capter 25 images par seconde avec une résolution de 500 x 582.

Avant le test, les animaux sont familiarisés avec les boulettes de nourriture en plaçant environ 50 boulettes dans chaque cage durant 3 jours consécutifs. La semaine suivante, les souris sont accoutumées avec le dispositif du staircase, durant 3 jours consécutifs en plaçant sur la plateforme centrale du couloir ainsi que sur chaque marche des boulettes de nourriture en excès. La troisième semaine, les animaux sont placés 2 jours consécutifs dans le staircase avec 2 boulettes sur chaque marche puis une session par semaine pendant 3 semaines consécutives durant lesquelles les performances asymptotiques des animaux constitueront leurs valeurs basales. Par la suite, les animaux seront testés pour leurs performances de préhension des semaines 3 à 8 post-transplantation puis 2 jours consécutifs la 16ème semaine post-transplantation. Le nombre de boulettes de nourriture collectées respectivement avec la patte gauche et droite au cours de chaque session est comptabilisé et les résultats sont exprimés en fonction du biais controlatéral au coté de la lésion calculé selon la formule ci-dessous et présentés en fonction de la moyenne des biais controlatéraux des semaines 3 à 5 et 6 à 8 post-transplantation.

$$\%\ \text{Biais } \textbf{Controlatéral} = \frac{\text{Nombre de boulettes collectées en } \textbf{Controlatéral}}{\text{Nombre de boulettes collectées en } \textbf{Contralatéral} + \text{Nombre de boulettes collectées } \textbf{en Ipsilatéral}} \times 100$$

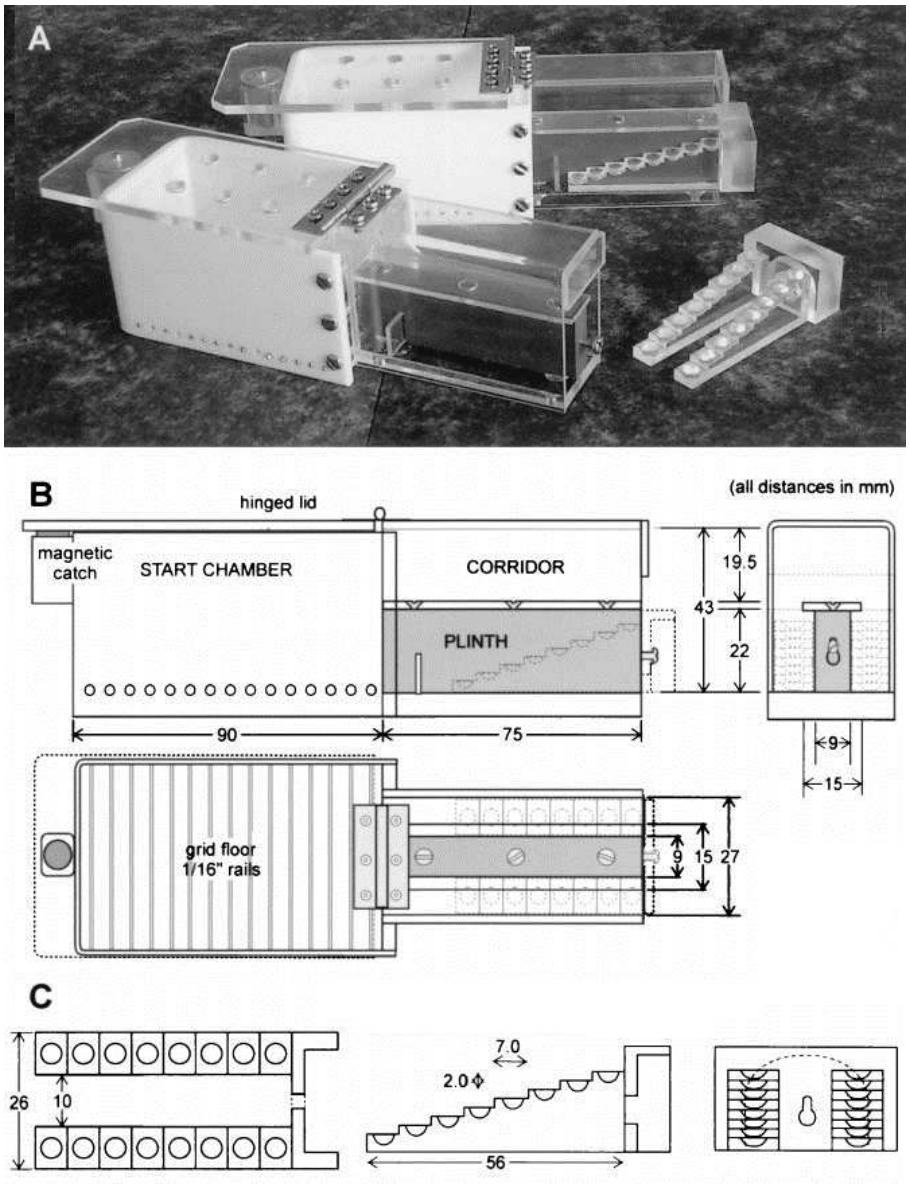


Figure 28 : Dispositif utilisé pour le test de l'escalier chez la souris. Photographie de deux boites de comportement (A). Schématisation et dimension de la boite (B) et de la structure constituant les deux escaliers composés de huit marches (C) en mm. Adapté de Baird *et al*., 2001.

F. Analyse du mouvement de préhension

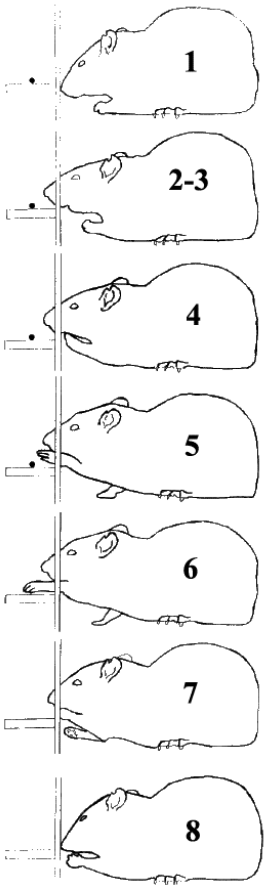
1. Décomposition et sélection du mouvement

Pour aller plus loin dans l'étude du mouvement de préhension de l'animal, nous avons analysé de façon très précise cette action de préhension des boulettes de nourriture lors du test de l'escalier. Pour ce faire nous nous sommes appuyé sur l'étude des mouvements étayée par les travaux de N. Eshkol et A. Wachmann et en particulier, le mouvement de préhension de nourriture, très étudié chez le rat *via* l'utilisation du « single reaching task » (Whishaw *et al.,* 1995 ; Klein *et al*., 2012). Dans ce test, les animaux sont placés dans un dispositif en plexiglas et doivent attraper une boulette de nourriture au travers d'une fente. Ces études ont permis de décomposer le mouvement de préhension en 8 éléments distincts dont les composantes et le descriptif sont répertoriés dans le tableau ci-dessous (Figure 29.A et B).

A

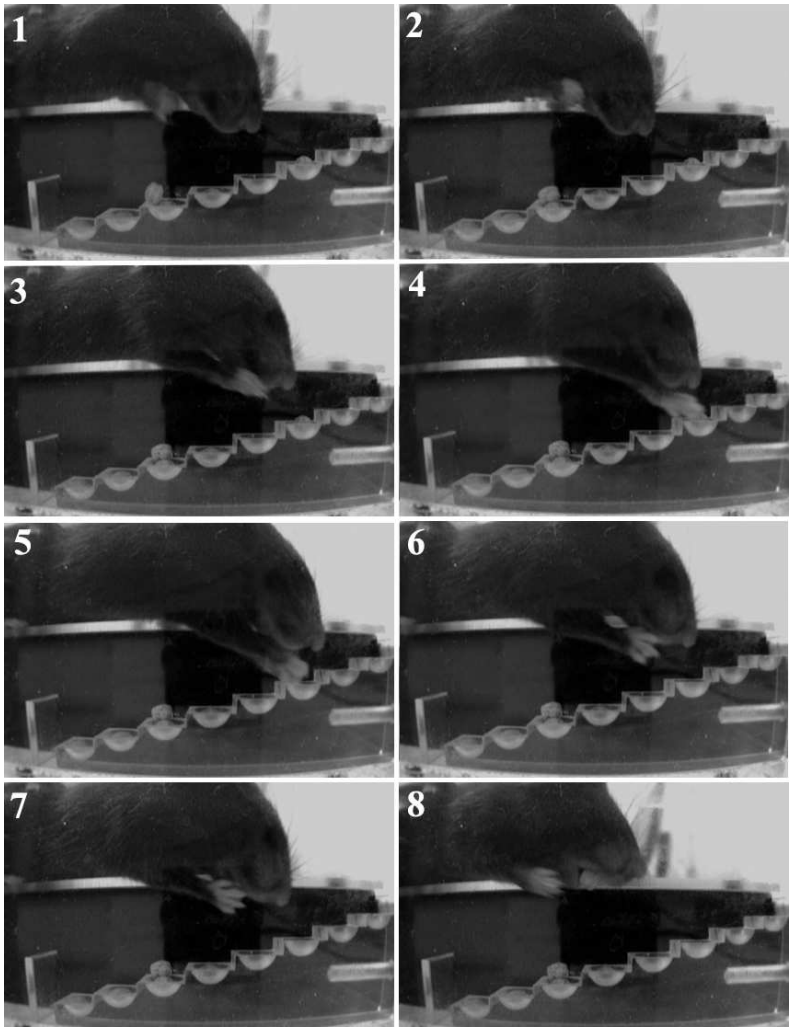
Élément	Sous-élément
1. Orientation	A. La tête se soulève
2. Soulèvement	A. Flexion du coude B. Semi-flexion des doigts C. Supination du poignet D. Alignement des doigts avec la ligne médiane du corps
3. But	A. Adduction du coude
4. Avancée	A. Patte B. Museau
5. Pronation	A. Ouverture des doigts B. Rotation complète de la patte
6. Saisie	A. Saisie ferme de la nourriture B. Extension du poignet
7. Supination	A. La patte se rétracte et réalise une rotation B. Second mouvement de rotation pour porter la boulette à la bouche
8. Lâché	A. La patte touche la bouche de l'animal B. Ouverture des doigts C. Retour de la patte au sol

B



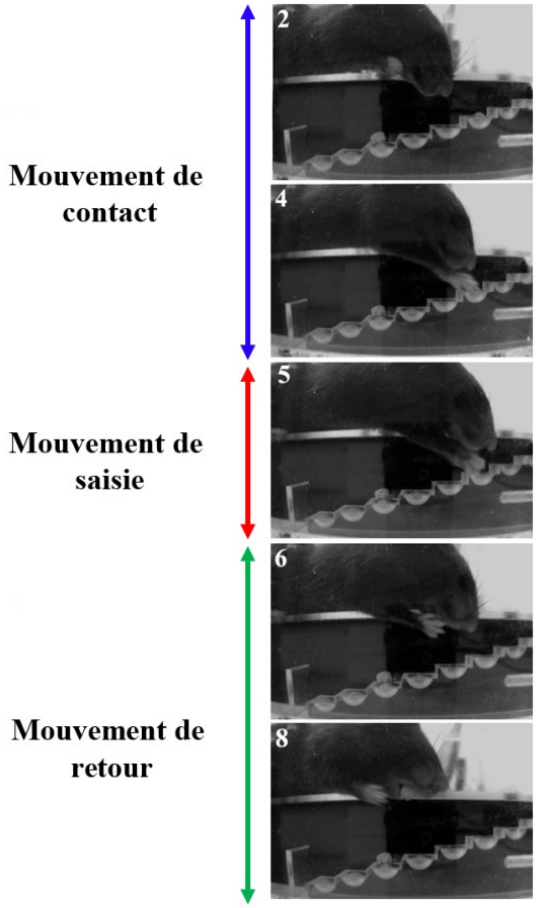
<u>Figure 29 :</u> Description complète du mouvement de préhension de nourriture chez le rongeur lors du « single reaching test ». Tableau récapitulatif de l'ensemble des mouvements de préhension de nourriture retrouvés chez le rongeur (A). Représentation schématique du mouvement de préhension chez le rat (B), les chiffres présents sur les rats correspondent aux différents éléments du tableau. Adapté de Klein *et al*., 2012 ; Whishaw et Pellis, 1990.

L'ensemble de ces composantes de mouvements a également été retrouvé et mis en parallèle chez la souris dans notre test de l'escalier (Figure 30).



<u>Figure 30 :</u> Séquençage du mouvement de préhension de nourriture au cours du test de l'escalier chez la souris. Ces photographies présentent l'ensemble des éléments de préhension indiqués précédemment comprenant, l'orientation de la tête et du museau (1), le soulèvement de la patte et l'adduction du coude (2), l'avancée de la patte et le mouvement de pronation (3-4), la saisie de la boulette (5), le retrait de la patte et les mouvements de supination (6-7) et le lâché de la boulette (8).

Ces éléments, décomposables et identiques pour chaque mouvement de préhension de l'animal, ont permis de discriminer trois aspects du mouvement de préhension, i) le « mouvement de contact » allant du mouvement de redressement de la patte jusqu'au contact de la patte avec la boulette de nourriture (Figure 30 de 2 à 4), ii) « le mouvement de saisie » avec la fermeture des doigts sur la boulette de nourriture (Figure 30.5) et enfin, iii) « le mouvement de retour » jusqu'au lâché de la boulette de nourriture dans la bouche de l'animal (Figure 30 de 5 à 8). Ces trois séquences sont représentées dans la Figure 31 ci-dessous.



<u>Figure 31 :</u> Décomposition des trois séquences lors du mouvement de préhension chez la souris.

Nous rappelons que chaque session de test est filmée en totalité à l'aide de caméras miniatures disposées perpendiculairement de part et d'autre du dispositif nous assurant une vue de coté et permettant d'analyser le mouvement de préhension de l'animal. Grâce à ces vidéos, le mouvement de préhension de chaque animal peut être transformé en une succession

d'images allant du redressement de la patte jusqu'au lâché de la boulette de nourriture dans la bouche de l'animal. Pour pouvoir comparer les mouvements de préhension de nourriture entre nos différents groupes, plusieurs paramètres sont à prendre en compte dans cette analyse :

- Les essais comparés doivent obligatoirement être valides, c'est-à-dire présenter les éléments de départ (redressement de la patte), de saisie (fermeture des doigts sur la boulette) et de fin (lâché de la boulette dans la bouche) pour être comparables et analysables.
- Les tentatives dites : i) ratées (pas de contact avec la boulette durant le mouvement de préhension), ii) déplacées (l'animal touche la boulette de nourriture mais ne la saisie pas) iii) tombées (l'animal saisie la boulette mais la laisse tomber avant d'atteindre sa bouche) ne seront également pas prise en compte dans l'analyse.
- La comparaison entre les groupes d'animaux (contrôle, lésé, transplanté dans la SN transplanté dans le striatum) devra être établie sur la base d'une même marche afin de garantir une même distance entre le point de départ de la patte et la position de la boulette de nourriture. C'est sur la 3ème marche de l'escalier (seule marche présentant le plus grand nombre d'essais valides (supérieurs à 5) pour chaque groupe) que se portera l'analyse.
- Étant donné le faible nombre de prise de boulette de nourriture au cours des premières semaines suivant la transplantation, nous avons réalisé la sélection des mouvements de préhension au cours de la 8ème semaine post-transplantation. Lorsque les animaux ne présentaient pas de préhension de nourriture sur la 3ème marche au cours de cette semaine, nous avons sélectionné les mouvements des sessions de la semaine précédente et ce jusqu'à la 6ème semaine post-transplantation.

Considérant et regroupant l'ensemble de ces paramètres, l'analyse sera effectuée sur la base d'une seule prise de boulette valide par animal sur la 3ème marche de l'escalier. Le nombre de souris par groupe exécutant correctement ce mouvement de préhension sera au final de 6 souris contrôles (sur 8 au total), 5 souris lésées (sur 9 au total), 5 souris transplantées au sein du striatum (sur 11 au total) et 5 souris transplantées au niveau de la SN (sur 11 au total).

Une fois les paramètres de sélection fixés, la fenêtre de vidéo correspondante à chaque mouvement est analysée à l'aide du logiciel LabWatcher (Viewpoint Lyon, France) permettant de convertir image par image les trois aspects du mouvement de préhension (mouvement de contact, mouvement de saisie et mouvement de retour) et ainsi dégager deux informations principales de ces séquences d'images :

- Une information temporelle correspondant au temps nécessaire à la réalisation de chacun des aspects du mouvement de préhension.
- Une information spatiale correspondant à la trajectoire effectuée par l'animal pour attraper la boulette de nourriture.

2. Calcul du temps nécessaire à la réalisation de l'action de préhension de nourriture

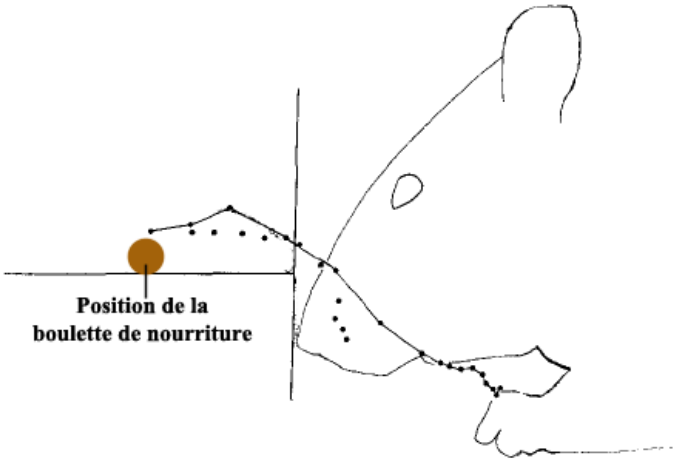
Afin de calculer le temps nécessaire à la réalisation de chaque mouvement, nous avons utilisé les séquences d'images produites grâce aux vidéos obtenues lors du test de l'escalier. Nous rappelons que les caméras sont capables de générer 25 images par seconde de sorte que deux images successives soient espacées de 40 millisecondes. De ce fait, le temps (en milliseconde) nécessaire à la réalisation d'une action est donné par la formule ci-dessous :

(Nombre d'images générées pour l'action – 1) x 40

Cette formule a été appliquée pour l'ensemble des éléments de préhension (mouvement de contact, mouvement de saisie et mouvement de retour) de même que pour l'évaluation du temps nécessaire au mouvement complet, c'est-à-dire du départ de l'action jusqu'au lâché de la boulette dans la bouche de l'animal.

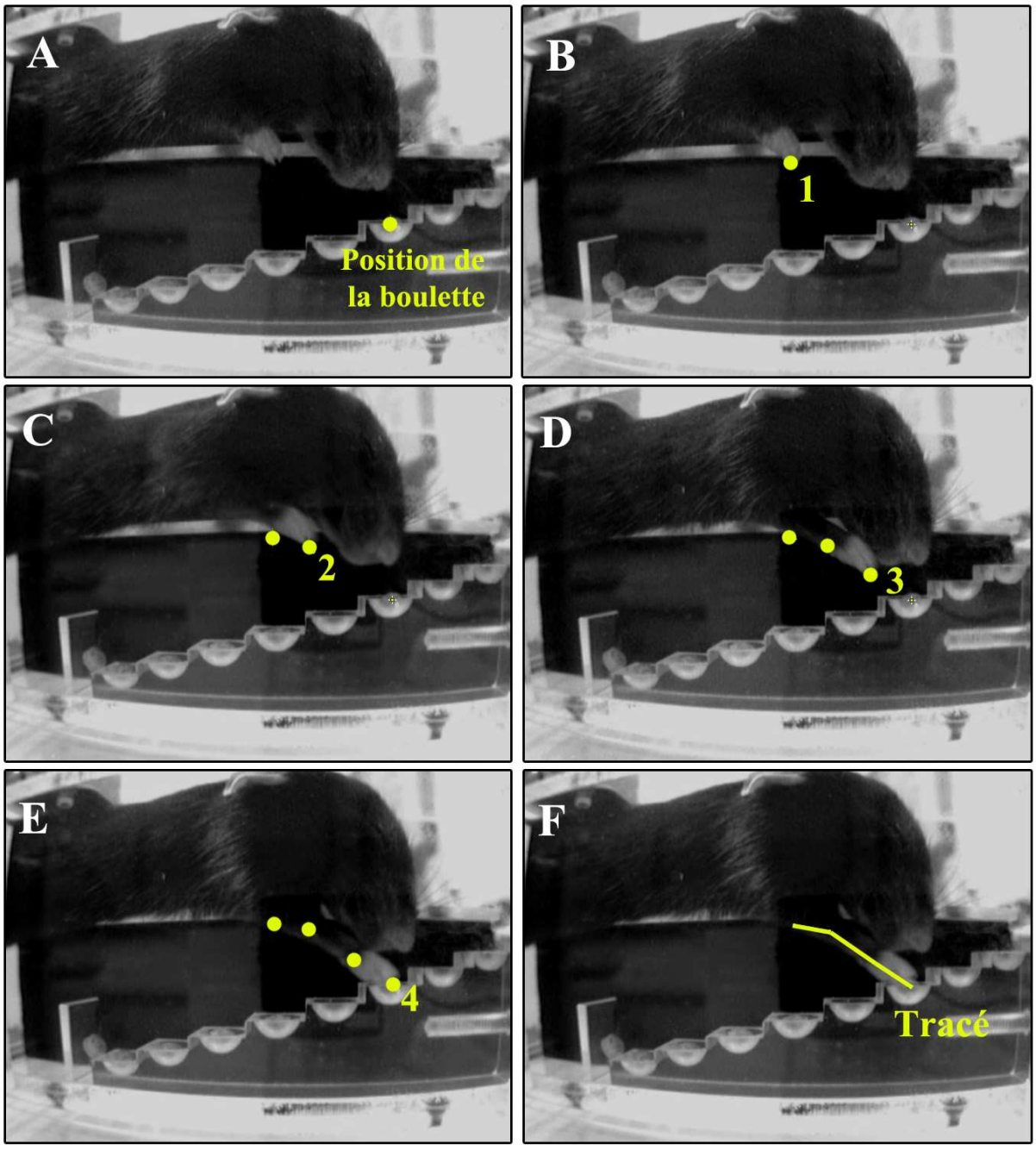
3. Calcul de l'information spatiale du mouvement de préhension

En raison de la place importante dans les nombreux travaux portant sur l'analyse du mouvement, nous avons choisi d'analyser plus particulièrement la séquence de mouvement correspondant au mouvement de contact. Les trajectoires de ce mouvement (depuis le moment ou la patte se soulève du sol, jusqu'au moment ou elle entre en contact avec la boulette de nourriture (Figure 32), ont particulièrement été étudiées dans le cadre du « single reaching task » (Whishaw et Pellis, 1990 ; Esposito *et al*., 2014 ; Azim *et al*., 2014).



<u>Figure 32 :</u> Trajectoire de la patte lors d'un mouvement de préhension de nourriture dans le « single reaching task » chez le rat. La trajectoire d'extension de la patte est illustrée par les points reliés (ligne noire), la trajectoire de rétraction de la patte correspond au point non reliés. Modifié d'après Whishaw et Pellis, 1990.

En ce qui concerne notre étude, nous avons analysé les trajectoires du mouvement de contact pour chaque animal, en utilisant les vidéos et les séries d'images sélectionnées précédemment. Chaque série d'images successives, correspondant au mouvement de contact est importée dans le logiciel Image J 1.48V à partir duquel nous avons (1) pointé la position de la boulette de nourriture ainsi que le troisième doigt de l'animal sur chaque images successives (Figure 33) (2) extrait les coordonnées cartésiennes x/y de chaque point de manière à pouvoir tracer les trajectoires de chaque mouvement de préhension de nourriture. Par la suite, toutes les trajectoires ont, pour chaque groupe, été alignées selon la position constante de la boulette de nourriture (positionnée sur la 3ème marche). De plus, le logiciel Image J permet également d'obtenir, pour chaque animal, la valeur de la longueur de ces tracés (en millimètres) dont les moyennes permettront de comparer ces différents groupes.



<u>Figure 33 :</u> Détails de la méthode d'obtention d'une trajectoire de préhension de nourriture chez une souris contrôle. La position de la boulette de nourriture est pointée (A). Le troisième doigt de la souris est pointé sur chaque images successives (B-E) jusqu'au contact entre la patte de l'animal et la boulette (E). Les coordonnées de chaque point sont extraites et le tracé de la trajectoire est ensuite reconstitué (F).

G. Administration de L-DOPA

Afin de tester l'effet d'une injection unique de L-DOPA sur les capacités motrices et les qualités de préhension, le test de l'escalier a été réalisé 16 semaines après la transplantation sur 2 jours consécutifs. Le premier jour, le test de l'escalier est réalisé comme décrit précédemment, dans le but à la fois d'évaluer les déficits engendrés par la lésion mais également de caractériser la récupération fonctionnelle et ce, après 16 semaines de transplantation. Le second jour une injection unique de L-DOPA est réalisée avant le test.

La L-DOPA méthyl ester (10mg/kg) couplée à l'inhibiteur de la DOPA décarboxylase (benzérazide-HCl ; 10mg/kg) limitant le métabolisme périphérique de la L-DOPA, sont dissous dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%) immédiatement avant utilisation. Les animaux reçoivent une injection intra-péritonéale unique (0,1 ml/10g de poids) 30 min avant de réaliser le test afin de couvrir l'intervalle d'effet maximal de la L-DOPA (Cenci *et al*., 2007 ; Francardo *et al*., 2011).

H. Analyse de la marche

Chez le patient atteint de la MP, les caractéristiques cinématiques de la marche sont extrêmement modifiées avec entre autres une lenteur des mouvements, une diminution de la longueur du pas ainsi qu'une forte baisse de la vélocité. L'ensemble de ces caractéristiques de la démarche a été, chez la souris et en conditions physiologiques très étudiées (Clarke et Still., 1999) et indique que la longueur du pas est une mesure reproductible permettant son application dans des conditions physiopathologiques.

La mesure de la longueur du pas a été standardisée (Fernagut *et al*., 2002) et utilisée notamment chez le rongeur, dans le cadre de dysfonctions du système nigro-strié (Iancu *et al*., 2005). Alors que ces analyses étaient réalisées au départ par la mesure d'empreintes de pas effectuées à l'aide d'encre et de papier, de nombreux dispositifs d'analyses automatiques se sont développés permettant d'ajouter à la longueur du pas, la mesure de divers paramètres de la démarche dont la régularité de la marche ainsi que des valeurs de cinétique. Nous disposons au laboratoire d'un dispositif d'étude, le « Gait Lab » (ViewPoint Life Sciences, Lyon, France), basé sur la méthode de « Catwalk » (Hamers., 2001) et capable de mesurer une importante quantité de paramètres de locomotion chez le rongeur répertoriés dans le tableau 3.

Paramètres	Description
Mean Speed	Vitesse moyenne de la course
Regularity	Constance de la course
Stride Frequency	Durée de la foulée
Stride Length	Longueur de la foulée
Stance Time	Durée au cours de laquelle la patte est en contact avec le sol = phase d'appui
Swing Time	Durée au cours de laquelle la patte n'est pas en contact avec le sol = phase d'oscillation
Fore / Hind Lag	Durée au cours de laquelle une seul patte avant / arrière est en contact avec le sol
Left / Right Pair Lag	Durée s'écoulant entre le début de la pose de la patte avant gauche / droite et celui de la patte arrière gauche / droite
Fore / Hind Gap	Longueur séparant les deux pattes avant / arrière
Left / Right Pair Gap	Distance séparant la patte avant et arrière du coté gauche / droit
Area / Width / Lenght	Aire / Largeur / Longueur de l'empreinte de patte
Fore / Hind Limbs Base Of Support	Écart entre les deux pattes avant / arrière
Left / Right Limbs Base Of Support	Écart entre la patte avant et arrière du coté gauche / droit

Tableau 3 : Ensemble des paramètres de marche et leurs descriptions fournis par le Gait Lab.

Le dispositif est placé dans une pièce sombre (environ 20 lux d'illumination) et silencieuse. Il est composé d'une plaque de verre de 130 cm de long éclairée par une lumière fluorescente venant du coté de la plateforme de verre et se reflétant dans son épaisseur. A

l'une des extrémités du dispositif se trouve une plateforme de départ composée d'un tampon humide et à l'autre extrémité, un compartiment final clos contenant la litière de l'animal (Figure 34. A et B). Dans ce test, les animaux doivent marcher de façon volontaire et constante le long de la plaque de verre. L'humidité des pattes imposée par le tampon au départ permet la réfraction de la lumière à chaque contact des pattes sur la plaque de verre. Cette réfraction est captée par une caméra vidéo placée sous la plaque de verre et analysée par le biais du logiciel Gait Lab (ViewPoint Life Sciences, Lyon, France). De cette façon, lors de la traversée, l'analyse informatique va permettre de discriminer chaque patte de l'animal (avant droite ; avant gauche ; arrière droite ; arrière gauche) et engendrer pour chacune d'entre elle, les données correspondantes aux paramètres de marche (Figure 35).

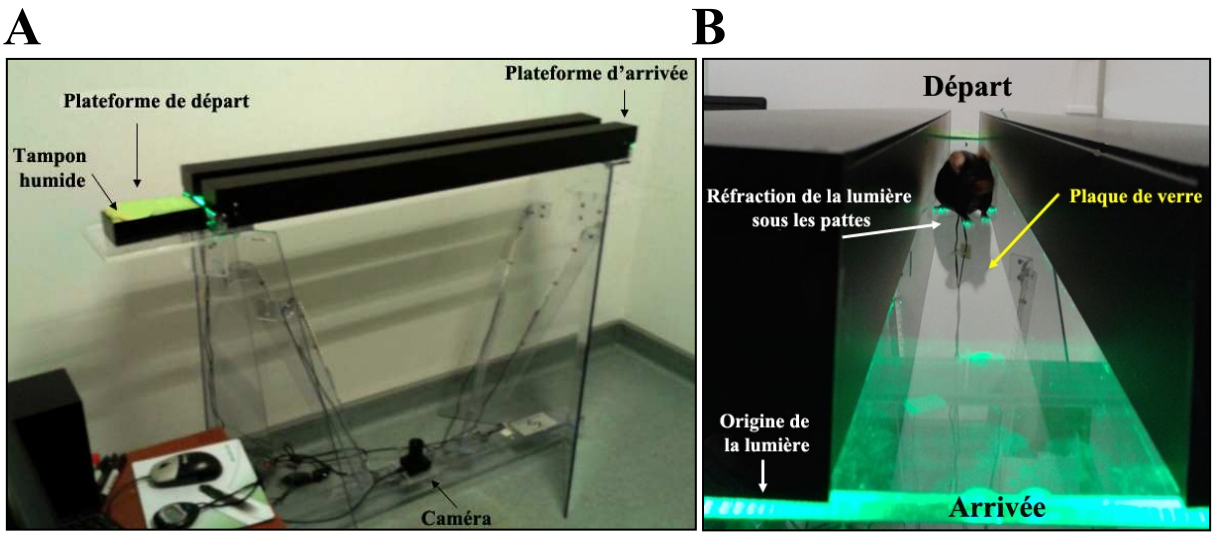
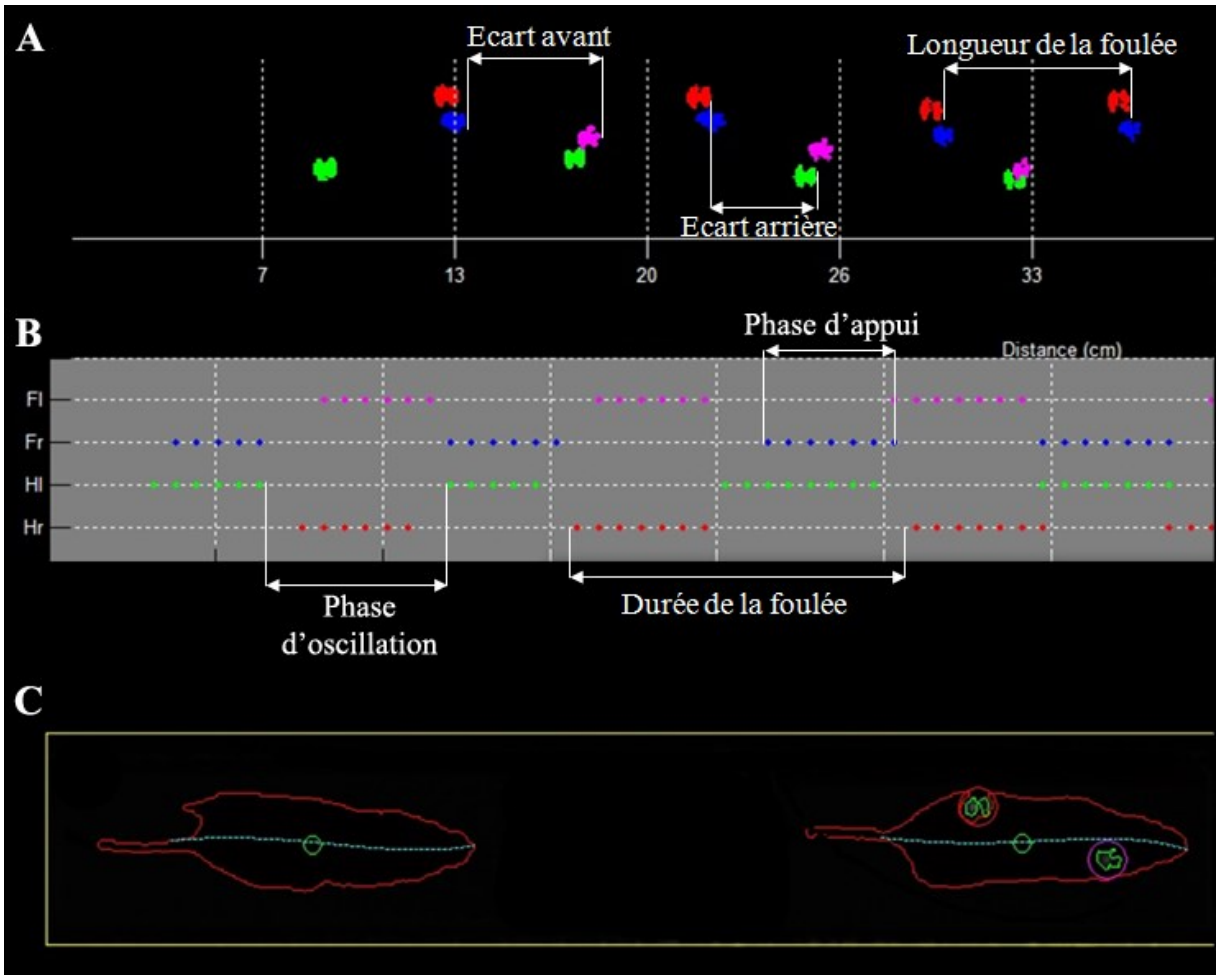


Figure 34 : Photographie illustrant le dispositif du « Gait Lab ». Vue d'ensemble (A) et vue de coté (B). La souris dont les pattes ont été humidifiées par le tampon au départ du dispositif présente, au niveau de celles-ci, une réfraction de la lumière (contours verts) captée par la caméra placée au-dessous. L'origine de la lumière (sur le coté de la plaque de verre) se propage dans toute son l'épaisseur.



<u>Figure 35 :</u> Représentation des données analysables par le logiciel « Gait Lab » et les principaux paramètres analysés. Trois éléments sont représentés : (A) le positionnement des pattes le long de la plaque de verre : Chaque couleur représente une patte. A noter que la caméra placée en dessous de l'animal transpose les données de sorte à ce que la droite et la gauche sont inversées (Bleu : Avant droit ; Rose : Avant gauche ; Rouge : Arrière droit ; Vert : Arrière gauche). (B) Décours temporel de l'appui des pattes. (C) Représentation informatique des contours de l'animal.

Chaque souris est autorisée à circuler librement dans l'ensemble du dispositif pendant 10 min en guise d'habituation. Par la suite, les souris effectuent 5 essais durant 2 jours consécutifs au cours desquels elles sont placées sur la plateforme de départ et sont incitées à traverser toute la longueur de la plateforme de façon constante, en décourageant au maximum les comportements d'exploration à mi-parcours, les arrêts ou les retours en arrière. Une fois cette phase d'habituation terminée, une session de traversé est enregistrée constituant les valeurs de base pour chaque animal (notées par la suite baseline). Chaque session est

composée de 3 essais valides au cours desquels l'animal doit traverser à vitesse constante la totalité de la plateforme. Par la suite, deux sessions de Gait Lab seront effectuées les 4ème et 9ème semaines post-transplantation. Les données sont exprimées selon la moyenne des 3 essais.

IV. Procédures expérimentales électrophysiologiques

A. Anesthésie et procédure électrophysiologique

En amont de la chirurgie, les animaux sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale d'Uréthane (1,8 g/kg) puis placés dans un cadre stéréotaxique (LPC, France). Des capillaires de borsilicate (GC 150 F 10, Harvard Apparatus, Angleterre) ont été étirés puis cassés à une des extrémités pour constituer les électrodes d'enregistrement. Le diamètre formé par la cassure (2 μm) assure une résistance in vitro de 12 à 20MΩ. Les électrodes contenant du NaCl 0,4 M sont descendues dans le striatum dorsal ipsilatéral au coté de la lésion aux coordonnées (0,3-0,6 mm antérieur au bregma ; 2-2,2 mm latéral au bregma ; profondeur 2-3 mm par rapport à la surface du cerveau). Le cortex moteur a été stimulé *via* une électrode concentrique bipolaire (SNEX-100, Rhodes Medical Instruments, USA). Un stimulateur externe (DS3 ; Digitimer, Angleterre) a permis d'appliquer une paire de stimulation de 0,5 ms séparée de 100 ms.

La recherche des neurones striataux a été conduite par double stimulation à une fréquence de 1 Hz pour une intensité de 2 mA. Une fois repérée, la réponse des neurones striataux aux stimulations du cortex a été réalisée à 0,33 Hz limitant les interférences entre les paires de stimulations successives. A la suite de la procédure, les souris ont été immédiatement perfusées (voir protocole ci-dessous).

B. Analyses électrophysiologiques

Les analyses ont été conduites par le logiciel Spike 2 7.0 (Cambridge Electronics design, Angleterre).

Les caractéristiques électrophysiologiques du neurone ont été déterminées par la mesure de i) de la durée du potentiel d'action, ii) de la fréquence de décharge et iii) du courant 50% exprimés ci-dessous :

- La durée du potentiel d'action a été déterminée par la mesure entre le pic le plus dépolarisé et le pic le plus hyperpolarisé
- La fréquence de décharge a été quantifiée sur la durée totale du premier enregistrement (soit 58 secondes). Afin de s'approcher au maximum de l'activité de décharge spontanée, nous avons calculé une fréquence corrigée selon la formule :

$$Fcorrigée = \frac{(Fmesurée \times 58) - Nréponses}{58}$$

Avec Fcorrigée : la fréquence du neurone ; Fmesurée : la fréquence totale mesurée au cours de l'enregistrement ; Nréponses : le nombre de potentiels d'action émis en réponse aux stimulations corticales.

- La mesure du courant 50% correspond à l'intensité du courant pour lequel le neurone répond dans 50% des cas sur la première ou la deuxième stimulation corticale.

Par la suite, les caractéristiques de réponses des neurones ont été évaluées par deux méthodes. Dans un premier temps, la latence de réponse moyenne ainsi que l'écart type de latence à la stimulation corticale est déterminée. Dans un second temps, nous avons enregistré la fenêtre de réponse des neurones du striatum. Pour ce dernier point, les latences de réponse minimale et maximale à la stimulation sont enregistrées. De ce fait, pour un même groupe expérimental, la fenêtre de réponse des neurones a été évaluée en calculant le temps entre la latence minimale moyenne du groupe et la latence moyenne maximale du groupe.

V. Traitement des cerveaux et immunohistochimie

Après une anesthésie létale (Avertine 250mg/kg), les animaux subissent une perfusion intracardiaque de 100mL d'une solution saline (NaCl 0,9%, 37°C) puis de 250mL de paraformaldéhyde à 4% à 4°C. Les cerveaux sont prélevés et cryoprotégés 24 h dans une solution de saccharose 30% (phosphate buffer, 0,1M) avant d'être coupés à l'aide d'un microtome (Leica RM 2145). Les coupes coronales sériées (6 séries) de 40µm d'épaisseur sont rincées trois fois dans du Tris-Buffered Saline (TBS ; 0,05 M pH 7,6) puis incubées 90 min dans une solution bloquante afin de bloquer les sites antigéniques non spécifique (TBS ; 3% Bovine Serum Albumin (BSA ; Sigma) ; 0,3% de triton X-100) à température ambiante. Les coupes sont ensuite misent en présence de l'anticorps primaire dilué dans la solution de blocage pendant une nuit à 4°C, rincées 3 fois au TBS puis mises en présence de l'anticorps secondaire approprié couplé à un fluorochrome Alexa Fluor, dilué dans la solution bloquante, pendant 60 min à température ambiante. Après 3 rinçages au TBS, les coupes sont montées sur lames gélatinées, déshydratées puis couvertes avec un milieu de montage (DePeX). La liste des anticorps primaires, secondaires, des facteurs de dilution et des références est détaillée dans le tableau ci-dessous (Tableau 4)

ANTICORPS PRIMAIRES

Nom	Référence	Dilution
Goat anti-GFP	Abcam	1/1000
Rabbit anti-GFP	Molecular probes	1/1000
Mouse anti-TH	ImmunoStar	1/5000
Rabbit anti-GirK2	Sigma	1/100
Mouse anti-calbindin	Swant	1/1000
Rabbit anti-calbindin	Swant	1/5000
Rabbit anti-DAT	Don du Pr Bertrand Bloch, CNRS UMR 5293	1/5000

ANTICORPS SECONDAIRES		
Nom	**Référence**	**Dilution**
Donkey anti-goat 488	Life technologies	1/250
Donkey anti-rabbit 488	Life technologies	1/250
Donkey anti-mouse 567	Life technologies	1/500
Donkey anti-rabbit 567	Life technologies	1/500
Donkey anti-rabbit 647	Life technologies	1/500
Donkey anti-mouse 647	Life technologies	1/500

Tableau 4 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés.

VI. Microscopie électronique

Dans le cadre de cette étude une analyse des contacts synaptiques est effectuée par microscopie électronique. Pour cela, 2 souris du lot ayant participé à l'étude comportementale (n = 1 transplantée en intranigral ; n = 1 transplantée en intrastriatal) sont perfusée par voie intracardiaque par du NaCl (0,9%), puis par une solution de fixateur (paraformaldéhyde 2%, glutaraldéhyde 0,2%, tampon phosphate 0,1M). Après perfusion, les cerveaux sont rapidement prélevés et maintenus une nuit à 4°C dans la solution paraformaldéhyde 2% sans glutaraldéhyde puis des coupes coronales de 60µm sont réalisées au vibratome (Leica). Les coupes sont incubées dans une solution bloquante de PBS contenant 0,2% de BSA-c (Aurion) pendant 1h30 à température ambiante puis misent en contact avec l'anticorps primaire rabbit anti-GFP au 1/1000 dilué dans la solution bloquante à 4°C sur la nuit. Après 3 rinçages au PBS, les coupes sont incubées avec l'anticorps secondaire anti-rabbit (1/100) couplés à des particules d'or (0,8 nm, Aurion) 4h à température ambiante. Afin d'augmenter le diamètre des particules d'or pour faciliter leurs visualisation les particules d'or sont intensifiées à l'argent (HQ silver; Nanoprobes). Par la suite, les coupes sont post-fixées dans une solution de tétroxyde d'osmium à 2% puis déshydratées par bains successifs d'alcool (2 bains alcool 50° ; 1 bain d'alcool 70° contenant 1% d'acétate d'uranyle ; 2 bains d'alcool 95° ; 2 bains d'alcool absolu ; 2 bains d'oxyde de propylène). A la suite de ces bains, les coupes sont imprégnées

dans une résine époxy (LRWhite) sur la nuit. Les coupes sont ensuite incluses entre 2 lames et polymérisées à 60°C pendant 24h. Après sélection des zones d'intérêts, les échantillons d'environ 1mm de coté sont fixés sur un socle de résine et des coupes ultra-fines sont réalisées (60 nm) puis observées au microscope électronique (JEOL).

VII. Analyses d'images et quantifications

Les coupes immunomarquées ont été analysées à l'aide d'un microscope à Apotome (Zeiss Axio Imager M2) équipé de filtres fluorescéine et rhodamine. Certaines sections sélectionnées ont été examinées et photographiées en microscopie confocal (Bio-Rad MRC 1024). L'étendue de la lésion dopaminergique a été analysée par la quantification du nombre de neurones TH+ restants dans la SNpc lésée en comparaison à la SNpc intacte sur 1 des 6 séries de coupes d'un ensemble de 9 animaux lésés. Le nombre de neurones dopaminergiques contenu dans chaque greffon a été estimé par extrapolation du nombre total de cellules GFP+ détectées par immunofluorescence (Sawamoto *et al*., 2001 ; Thompson *et al*., 2005 ; Thompson *et al*., 2009) et calculé selon la formule d'Abercrombie (Abercrombie, 1946) :

$$P = \frac{1}{f} \times \frac{AM}{(D + M)}$$

Avec P : la correction du nombre de neurones GFP+ présent dans le greffon ; f : la fréquence de sélection des sections sur laquelle le comptage est effectué ; A : le nombre de neurone GFP+ comptabilisé ; M : l'épaisseur de la section ; D : le diamètre moyen du neurone.

Afin d'identifier le nombre de cellules GFP positives co-exprimant la TH au sein du transplant, une série de coupes provenant de chaque greffe (n = 6 intranigrale ; n = 7 intrastriatale) doublement marquée (GFP/TH) a été analysé en utilisant le microscope confocal et la co-localisation confirmée par analyse dans le plan Z. La même procédure a été utilisée pour la quantification de tous les doubles marquages (GFP/Girk2 ; GFP/Calbindine ; GFP/DAT) et triple marquage (GFP/Girk2/Calbindine ; GFP/DAT/TH).

VIII. Analyse statistiques

Dans cette étude, toutes les valeurs sont exprimées en moyenne ± sem (standard error of the mean). Les procédures statistiques ont été réalisées par l'intermédiaire du logiciel StatView V5.0.1. Les résultats présentant des différences significatives lors de la quantification cellulaire entre les deux groupes de souris transplantés (intranigral *vs* intrastriatal) ont été conduis par le test de Student (t-test) non apparié. Avant toutes analyses, la distribution Gaussienne des paramètres étudiés a été vérifiée (test de normalité). Les analyses concernant les tests comportementaux ont été réalisées en utilisant le test d'analyse de la variance (one-way ANOVA) excepté dans le test du Gait Lab où l'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test ANOVA à mesures répétées en utilisant le facteur groupe (contrôle, lésé, transplanté en intrastriatal ou intranigral) et/ou le facteur temps (baseline, $4^{ème}$ et $9^{ème}$ semaines post-transplantation). Lors de la présence d'effets significatifs, un test post-hoc de Fisher (Fisher protected least significance difference (PLSD)) a été conduit. Les corrélations ont été conduites à l'aide du logiciel Graphpad Prism V5.01 en effectuant une régression linéaire simple. En ce qui concerne les analyses électrophysiologiques, après un one-way ANOVA, l'analyse des changements significatifs a été réalisée à l'aide du test de comparaison multiple Holm-Sidak. Pour l'ensemble des analyses statistiques les différences sont considérées comme étant significatives lorsque $p < 0,05$.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

I. Étude neuroanatomique

A. Analyse de la lésion

Afin de connaitre l'étendue de la lésion unilatérale à la 6-OHDA, une des 6 séries de coupes sur un ensemble de 9 animaux lésés, a été utilisée pour visualiser les neurones TH montrant une perte significative du nombre de neurones dopaminergiques en comparaison du coté intact (Figure 36). Pour chaque animal, le nombre de neurones TH+ restant est exprimé en fonction du pourcentage du nombre total de neurones de la SNpc non lésée. Nous avons comptabilisé approximativement 1259±29 cellules TH+ dans la SNpc intacte contre 114±40 cellules TH+ au sein de la SNpc lésée. De ce fait, la proportion de neurones dopaminergiques restants dans la SNpc lésée correspond à 8,5±3% des neurones dopaminergiques comptabilisés du coté intact.

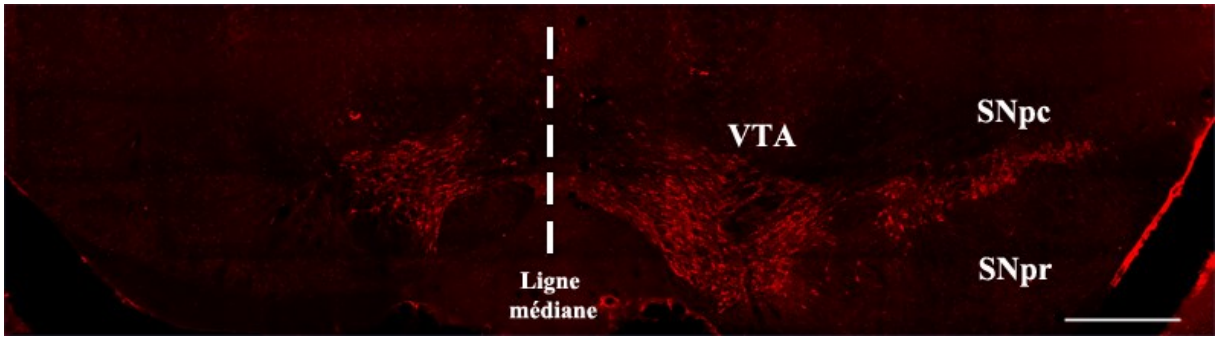


Figure 36 : Illustration en microscopie confocale de l'étendue de la lésion dopaminergique unilatérale à la 6-OHDA chez une souris lésée. Les neurones dopaminergiques marqués à la TH (en rouge) montrent une lésion quasi-totale de la SNpc sans pratiquement affecter les neurones dopaminergiques de la VTA. SNpc : Substance noire *pars compacta* ; SNpr : Substance noire *pars reticulata* ; VTA : Aire tegmentale ventrale. Barre d'échelle : 500µm.

Une dégénérescence correspondante à la lésion de la SNpc été retrouvée au niveau des fibres exprimant la TH dans le striatum ipsilatéral au coté de la lésion. De plus, aucune différence n'a été observée entre le nombre de neurones TH+ au sein de l'aire tegmentale ventrale du coté lésé en comparaison du coté non lésé.

B. Expression des marqueurs dopaminergiques au sein du greffon

Quatre mois après la transplantation, un immunomarquage contre la GFP a été réalisé sur 1 des 6 séries de coupes de la totalité des animaux transplantés (n = 22) afin de déterminer la localisation du greffon soit dans le striatum (n = 11) soit dans la SNpc (n = 11). Les transplants intrastriataux sont principalement localisés dans la partie médiale du striatum, proche du ventricule latéral. Il est a noté qu'un petit nombre de cellules GFP+ a été retrouvé en bordure du ventricule latéral. Le greffon intranigral est quant à lui généralement localisé dans la partie dorsale de la SNpc avec dans de rares cas, quelques cellules GFP+ observées le long de la trace laissée par l'injection.

Le double immunomarquage contre la GFP et la TH a permis de révéler que sur l'ensemble des transplants positionnés dans le striatum ou la SNpc, la quasi-totalité des cellules exprimant la GFP co-expriment également la TH. Ces résultats sont en accord avec les précédentes études de transplantation (intranigrale ou intrastriatale) d'une suspension cellulaire provenant de MV issu d'embryons de souris TH-GFP (Thompson *et al*., 2005 ; Thompson *et al.,* 2009) et montrant que plus de 95 % des neurones GFP+ dans le greffon étaient également TH+.

Par la suite, et dans le but d'évaluer un effet éventuel de la localisation intranigrale *versus* intrastriatale du greffon sur le nombre de neurones dopaminergiques retrouvés au sein de celui-ci, nous avons quantifié le nombre de cellules GFP+ dans le transplant. Cette quantification a été réalisée sur 1 des 6 séries de coupes pour 10 animaux transplantés par groupe (n = 10 intrastriatal ; n = 10 intranigral). L'analyse statistique effectuée à l'aide du test de Student (t-test) non apparié de cette quantification a permis de révéler que les transplants positionnés au niveau du striatum contiennent significativement moins de neurones GFP+ (732±231) que les transplants positionnés dans la SNpc (1426±207), (Figure 37 ; p = 0,0383).

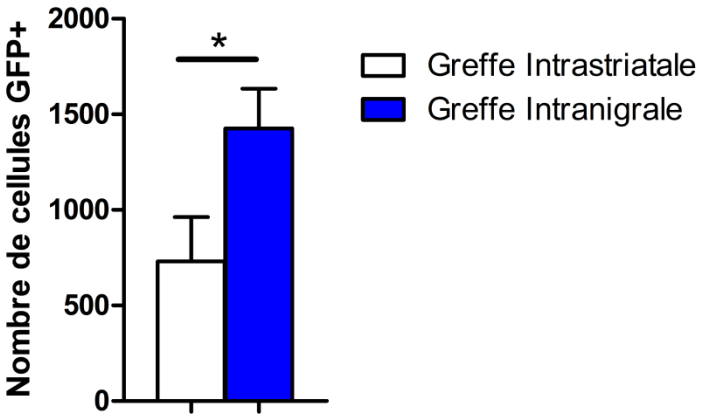
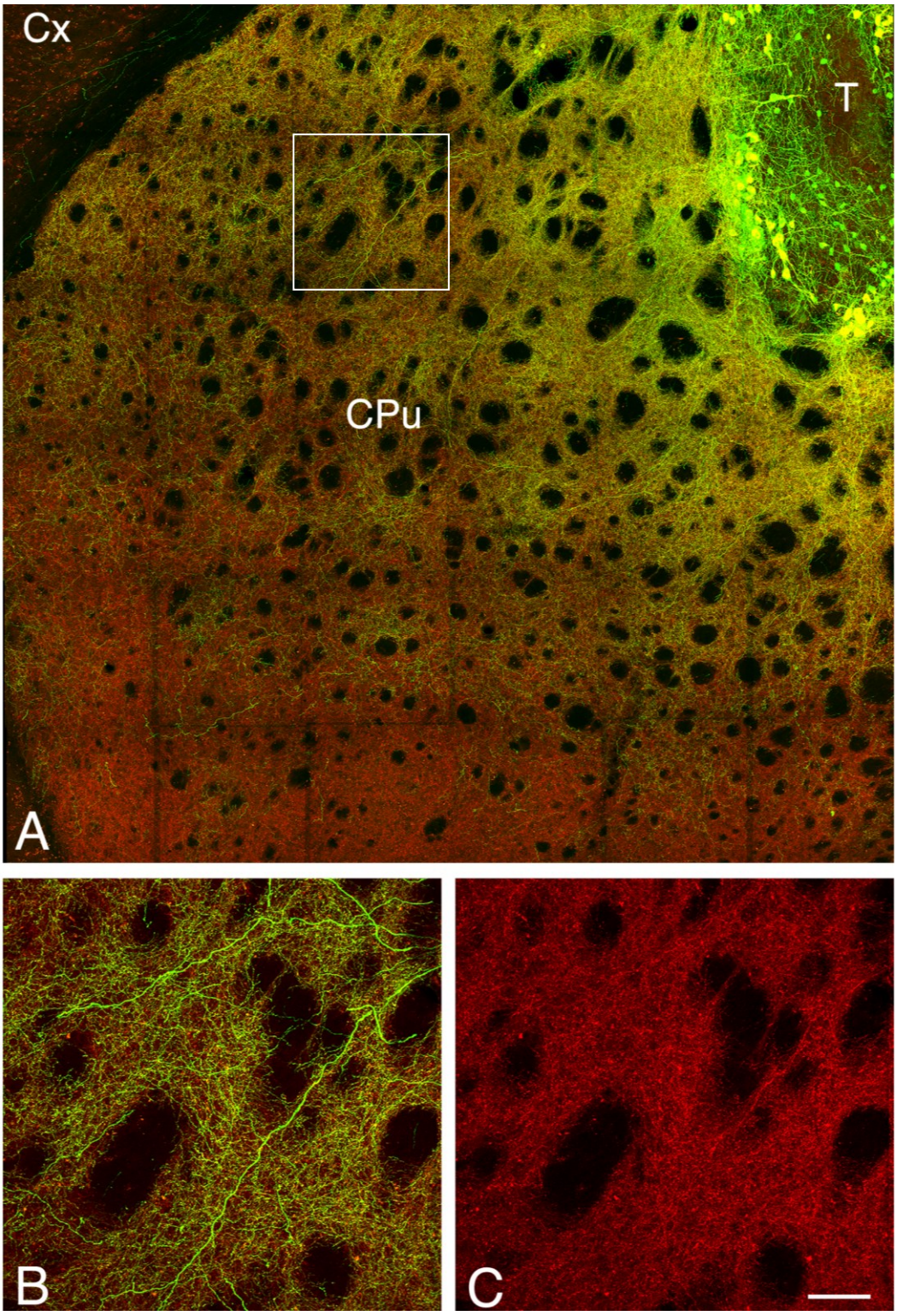


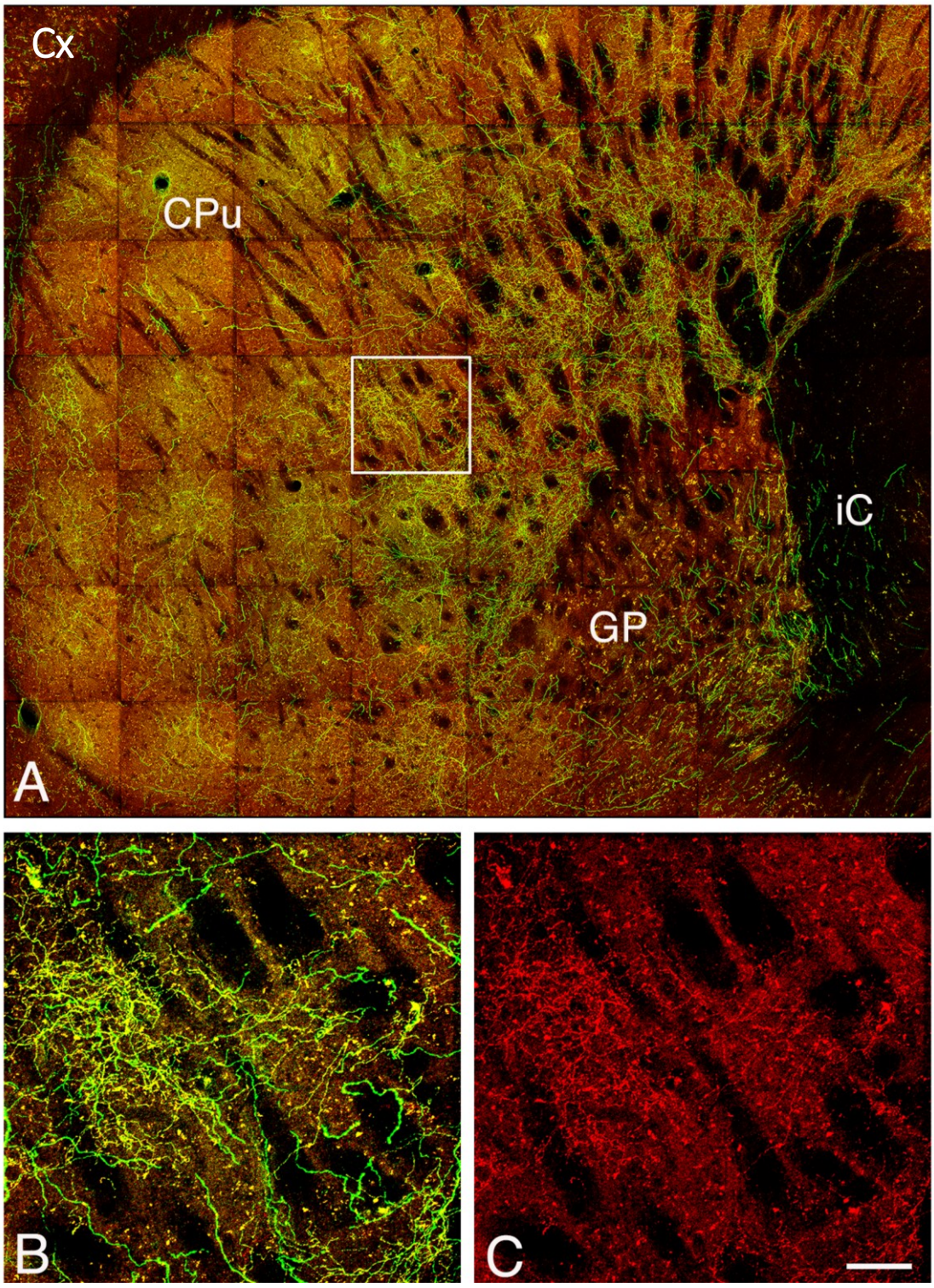
Figure 37 : Quantification du nombre de cellules GFP+ dans le transplant. Les résultats sont représentés en fonction de la moyenne ± sem du nombre de cellules exprimant la GFP au sein de la greffe intrastriatale (en blanc ; n = 10) ou intranigrale (en bleu ; n = 10). Comparaison entre les groupes réalisée à partir d'un t-test non apparié. * : $p < 0,05$.

L'observation des coupes immunomarquées contre la GFP a révélée que les neurones transplantés en position ectopique n'étendent leur prolongement qu'au niveau du striatum, ainsi que dans les couches profondes du cortex mais ne permettent pas une reconstruction de la voie nigro-striée. A l'inverse, les projections des neurones transplantés dans la SN empruntent la voie nigro-striée lésée et sont capables de rétablire spécifiquement l'innervation de l'ensemble des circuits dopaminergiques composant les ganglions de la base dont le striatum, et d'autre régions recevant des projections des neurones dopaminergiques de MV telles que, la zone sous ventriculaire ou les couches corticales profondes.

De plus, afin de confirmer le phénotype dopaminergique des neurones transplantés, un double immunomarquage contre la GFP et le DAT a été réalisé sur l'ensemble des animaux transplantés dans le striatum (Figure 38) ou dans la substance noire (Figure 39). L'observation des coupes immunomarquées a révélé, dans les deux conditions de transplantation que la quasi-totalité des projections émanant des neurones transplantés exprimant la GFP, co-exprimaient égalment le DAT.



<u>Figure 38 :</u> Illustration en microscopie confocale de la distribution des fibres GFP+/DAT+ issues des neurones embryonnaires de MV greffés dans le striatum hôte. (A) La majorité des fibres dopaminergiques co-expriment la TH (en vert) et le DAT (en rouge). (B-C) Illustration à plus fort grossissement de l'encadré blanc en (A) montrant les détails des projections. CPu : Striatum ; Cx : Cortex ; T : Transplant. Barre d'échelle : 170 µm pour A ; 50µm pour B-C.



<u>Figure 39 :</u> Illustration en microscopie confocale de la distribution des fibres GFP+/DAT+ issues des neurones embryonnaires de MV dans la substance noire au niveau du striatum hôte. (A) La majorité des fibres dopaminergiques co-expriment la TH (en vert) et le DAT (en rouge). (B-C) Illustration à plus fort grossissement de l'encadré blanc en (A) montrant les détails des projections. CPu : Striatum ; Cx : Cortex ; GP : Globus pallidum ; iC : Capsule interne. Barre d'échelle : 200µm pour A ; 50µm pour B-C.

C. Expression des marqueurs de types nigral ou VTA au sein du greffon

Le MV contient deux sous-types de neurones DA, les neurones A9 TH+/Girk2+ de la SNpc et les neurones A10 TH+/calbindine+ de la VTA. En outre, le prélèvement de tissu provenant du mésencéphale ventral effectué pour la transplantation contient à la fois les sous-types de neurones dopaminergiques de la VTA et de la SNpc. La transplantation de neurones DA provenant de MV d'embryons de souris (Thompson *et al*., 2005) ou humain (Mendez *et al*., 2005) dans le striatum hôte et co-exprimant Girk2 est capable d'innerver le striatum hôte. A l'inverse, les neurones DA co-exprimant la calbindine ne possédant pas cette capacité.

Nous avons examiné, la distribution des neurones DA exprimant soit Girk2 soit calbindine au sein des greffons placés dans le striatum (n = 7) ou dans la SNpc (n = 6). Nous avons observé dans les deux conditions de transplantation (intrastriatale et intranigrale), que les neurones GFP+/Girk2+ sont retrouvés préférentiellement à la périphérie du transplant et présentent une morphologie large et angulaire caractéristique des neurones dopaminergiques de la SNpc (Figure 40). A l'inverse, les neurones GFP+/calbindine+ ont été retrouvés au centre du transplant et leur morphologie, caractéristique des neurones DA de la VTA était petite et sphérique (Figure 40). La répartition de ces neurones DA retrouvés à la périphérie du transplant (pour les neurones GFP+/Girk2+) ou au centre du transplant (pour les neurones GFP+/calbindine+) est en accord avec les résultats observés dans de précédentes études, après la greffe de tissu mésencéphalique (Mendez *et al*., 2005; Thompson *et al*., 2005, Gaillard *et al.,* 2009, Grealish *et al*., 2014).

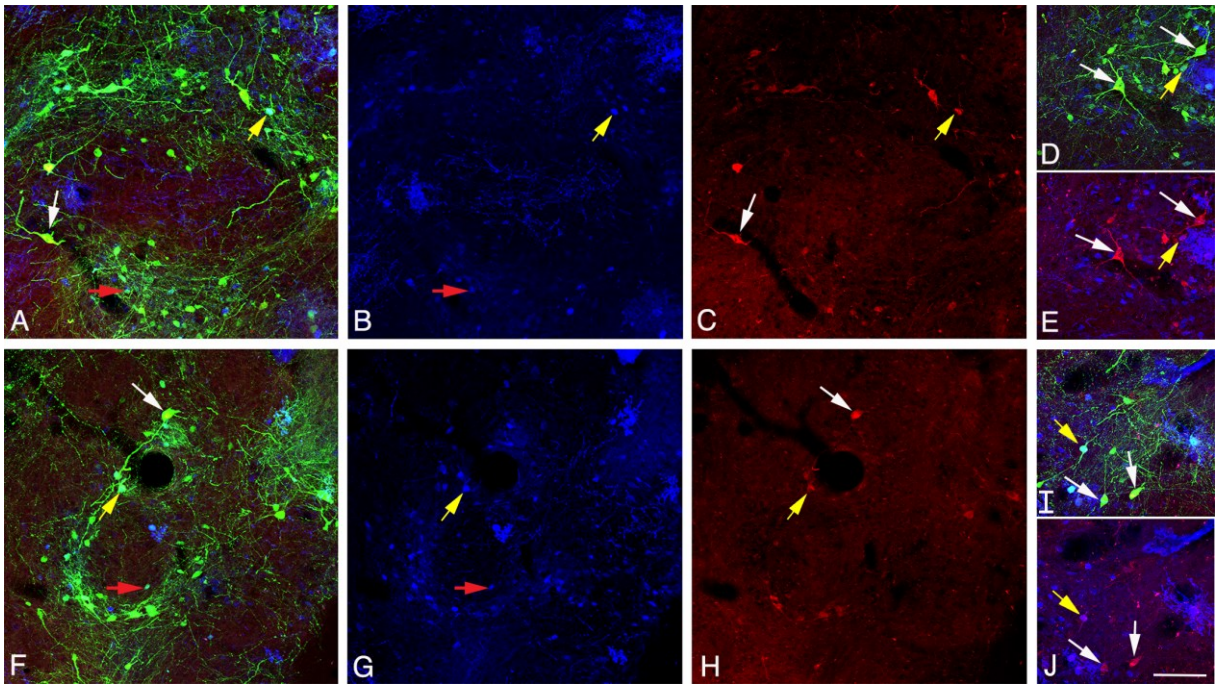
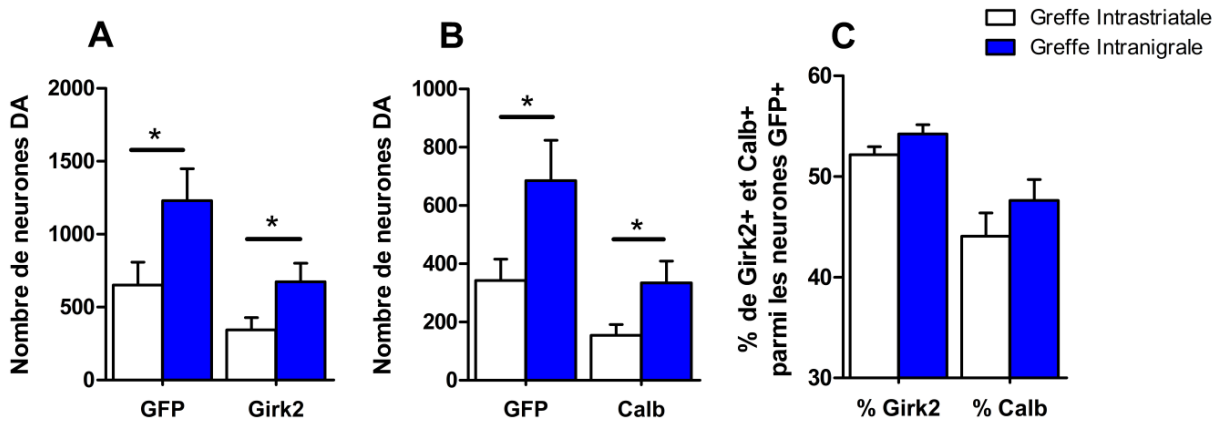


Figure 40 : Illustration en microscopie confocale de l'expression des marqueurs dopaminergiques dans les transplants intranigraux et intrastriataux. (A-E) Transplantation intranigrale. (F-J) Transplantation intrastriatale. Les flèches blanches montrent les neurones dopaminergiques co-exprimant la TH (en vert) et Girk2 (en rouge). Les flèches rouges identifient les neurones dopaminergiques TH+ co-exprimant la calbindine (en bleu). Les flèches jaunes révèlent les neurones dopaminergiques co-exprimant TH+/Girk2+/Calbindine+. Les cellules doublement marquées TH+/Girk2+ sont retrouvées préférentiellement à la périphérie des transplants intranigraux comme intrastriataux et présentent une morphologie large et angulaire caractéristique des neurones dopaminergiques de type A9. A l'inverse, les cellules TH+/Calbindine+ sont retrouvées principalement au centre des transplants et affichent une morphologie petite et ronde typique des neurones dopaminergiques A10. Barre d'échelle : 60µm.

Nous avons par la suite, réalisé une quantification du nombre de neurones GFP+/Girk2+ et GFP+/calbindine+ au sein des transplants sur 1 des 6 séries de coupes pour 6 animaux transplantés en intranigral et 7 animaux transplantés en intrastriatal. Cette quantification a révélé que la majorité des neurones dopaminergiques GFP+ étaient également Girk2+. Plus précisément, dans le cas de la transplantation intrastriatale, sur 653±156 neurones GFP+ retrouvés dans le greffon, 344±85 étaient positifs pour Girk2. De la même façon, sur 343±74 neurones GFP+, 154±37 co-exprimaient la calbindine. En parallèle, dans le cas de greffons

positionnés dans la substance noire, sur 1231±217 neurones GFP+, 674±126 l'étaient également pour Girk2 et sur 685±138 neurones GFP+, 334±74 co-exprimaient la calbindine. En conséquence, la proportion de neurones GFP+/Girk2+ au sein des transplants intrastriataux et intranigraux était respectivement de 52,1% et 54,1% (Figure 41). De la même manière, nous avons déterminé que la proportion des neurones GFP+/calbindine+ dans les deux conditions de transplantation intrastriatale et intranigrale était respectivement de 44,2% et 47,2% (Figure 41).

De plus, considérant d'une part que le nombre de neurones GFP+ est significativement plus important dans le cas de greffes intranigrales en comparaison des greffes intrastriatales et d'autre part que la proportion de neurones GFP+/Girk2+ et GFP+/calbindine+ est similaire pour les deux conditions de transplantation, le test de Student non apparié nous permet de dire que la greffe intranigrale contient à la fois un nombre significativement plus important de neurones GFP+/Girk2+ et de neurones GFP+/calbindine+ par rapport à la greffe intrastriatale (Figure 41 ; $p < 0,05$).



<u>Figure 41 :</u> Quantification du nombre de neurones dopaminergiques dans le transplant. Moyenne ± sem du nombre de cellules GFP+ co-exprimant la protéine Girk2 en (A) ou calbindine (B) au sein de la greffe intrastriatale (en blanc ; n = 7) ou intranigrale (en bleu ; n = 6). (C) Proportion de neurones GFP+/Girk2+ ou GFP+/calbindine+ calculée pour chaque condition de transplantation. La comparaison entre les groupes pour chaque condition a été réalisée à partir d'un t-test non apparié. * : $p < 0,05$.

D. Établissement de contacts synaptiques réciproques entre les neurones greffés et les neurones de l'hôte

Afin d'analyser le niveau d'intégration synaptique des neurones dopaminergiques transplantés, nous avons examiné, par microscopie électronique, l'établissement des contacts synaptiques entre les neurones de l'hôte et les neurones transplantés (Figure 42). Pour pouvoir visualiser en microscopie électronique les neurones greffés, nous avons utilisé un anticorps couplé à des particules d'or colloïdales. Nous avons mis en évidence que les neurones greffés sont innervés par les axones de l'hôte aussi bien en position striatale (Fig. 42A) qu'en position nigrale (Fig. 42C). Nous avons également montré que les axones issus des neurones greffés, établissent des contacts synaptiques avec les neurones striataux de l'hôte. En effet, nous avons observés de nombreux contacts synaptiques axo-dendritiques pour des greffes en position intrastriatale (Fig. 42B) et intranigrale (Fig. 42D). L'établissement de ces contacts synaptiques réciproques entre les neurones greffés et les neurones de l'hôte montrent l'intégration synaptique des neurones greffés dans les circuits de l'hôte.

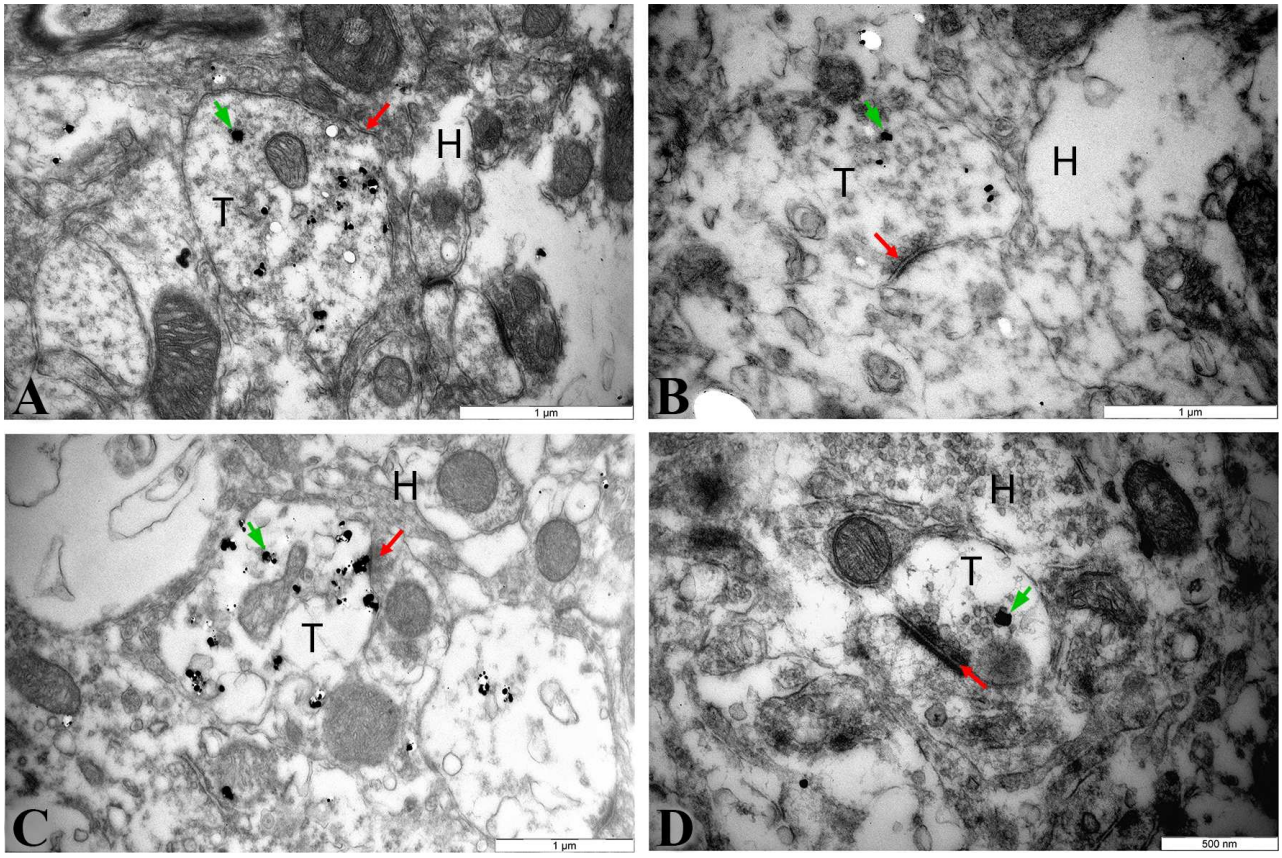


Figure 42 : Etablissement des contacts synaptiques réciproques entre l'hôte et le transplant. Les flèches rouges montrent les contacts axo-somatiques entre les axones des neurones de l'hôte et les neurones greffés en position striatale (A) ou nigrale (C). Établissement de contacts axo-dendritiques entre les axones des neurones greffés et les dendrites des neurones striataux de l'hôte pour des greffes en position striatale (B) et nigrale (D). Les flèches vertes montrent les particules d'or. H : Hôte ; T : Transplant.

II. Évaluation de la fonctionnalité des neurones dopaminergiques du MV transplantés en condition intrastriatale *versus* intranigrale

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'organisation de l'activité motrice est fortement régie par la voie dopaminergique nigro-striée. Dans le cadre de la MP, la transmission des informations motrices au cortex cérébral est altérée du fait de la disparition de l'innervation dopaminergique et est à l'origine des symptômes moteurs de cette maladie. Sur le plan neuroanatomique, nous avons pu mettre en évidence à la fois la survie et l'intégration des neurones transplantés au sein des deux structures nigrales et striatales ainsi que l'expression des marqueurs dopaminergiques au sein des greffons. Cette étude neuroanatomique a été complétée par l'évaluation de l'intégration fonctionnelle des neurones transplantés à la fois par une batterie de tests comportementaux ainsi que par une approche électrophysiologique.

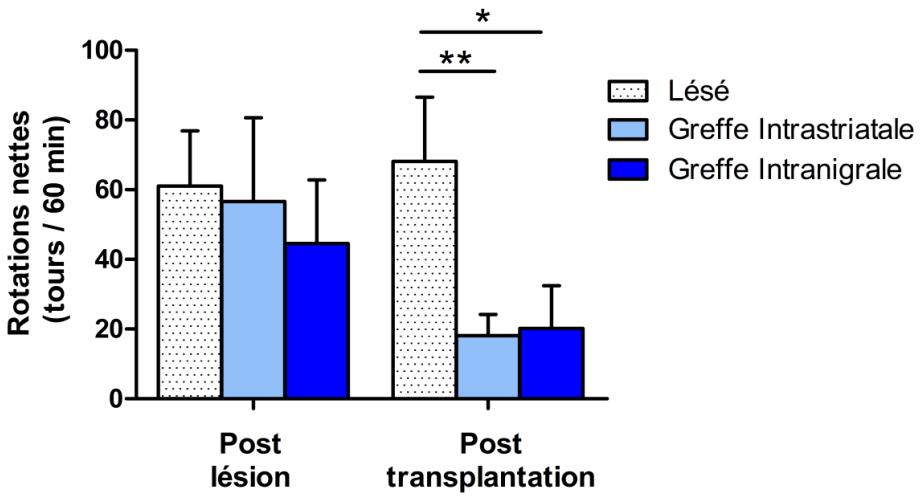
A. Étude comportementale

1. Test de rotation

Le test de rotations induites par l'apomorphine a été réalisé à deux reprises : i) 3 semaines après la lésion, afin d'évaluer les conséquences motrices de la dégénérescence de la voie nigro-striée et permettre la sélection des animaux pour la transplantation et ii) 13 semaines post-transplantation dans le but de caractériser la récupération fonctionnelle suite à la greffe intranigrale *versus* intrastriatale.

Trois semaines après la lésion, l'ensemble des animaux a présenté un nombre de rotations controlatérales au coté de leur lésion supérieur à 4 tours par minute. De plus, la moyenne des rotations nettes réalisées en 60 minutes s'est révélée être respectivement de 61±15 pour le groupe lésé, 56±24 pour le groupe intrastriatal et 45±18 pour le groupe intranigral. Enfin, une analyse de la variance n'a révélé aucune différence entre les différents groupes (Figure 43 ; $F_{2,28} = 0.17$, $p = 0,83$).

Treize semaines après la transplantation, une analyse ANOVA a permis de mettre en évidence, uniquement chez les animaux transplantés, une récupération fonctionnelle dans le test de rotations induites par l'apomorphine (Figure 43 ; $F_{2,28} = 4.745$, $p < 0.05$). En effet, les souris transplantées au niveau du striatum (n = 11) présentent un nombre de rotations (18±6) réduit de 68% par rapport à leurs scores pré-transplantation. De la même manière, le nombre de rotations (20±12) réalisé au cours de la treizième semaine post-transplantation a chuté de 55% chez les animaux transplantés au niveau de la SNpc (n = 11). De plus, l'analyse post-hoc de Fisher montre chez ces animaux transplantés, à la fois au niveau du striatum et de la substance noire, une restauration significative du nombre de rotations controlatérales en comparaison des animaux lésés (respectivement $p<0,01$; $p<0,05$). En revanche, les animaux lésés mais non transplantés (n = 9) ne montrent aucune amélioration spontanée dans le nombre de rotations (68±18) en comparaison de leurs précédents scores (61±15).



<u>Figure 43 :</u> Nombre de rotations induites par l'apomorphine 3 semaines après la lésion et 13 semaines post-transplantation. Le nombre de rotations nettes a été évalué 3 semaines post-lésion (à gauche) et 13 semaines post-transplantation (à droite) chez les animaux lésés (n = 9), transplantés au niveau du striatum (n = 11) ou au niveau de la substance noire (n = 11). Les valeurs sont indiquées en fonction de la moyenne ± sem. L'analyse statistique a été réalisée en appliquant un test two-way ANOVA suivi par un post-hoc test de Fisher, * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ comparé au groupe lésé.

Afin d'établir un lien potentiel entre le nombre de neurones GFP+ quantifié et le nombre de rotations controlatérales au coté de la lésion réalisé, nous avons testé la corrélation entre ces deux paramètres pour chaque souris transplantée en intrastriatal (n = 10) ou en intranigral (n = 10) (Figure 44). L'analyse ne montre aucune corrélation entre le nombre de rotations induites par apomorphine et le nombre de neurones GFP+ quantifié dans le transplant ($p = 0,075$; $r^2 = 0,112$).

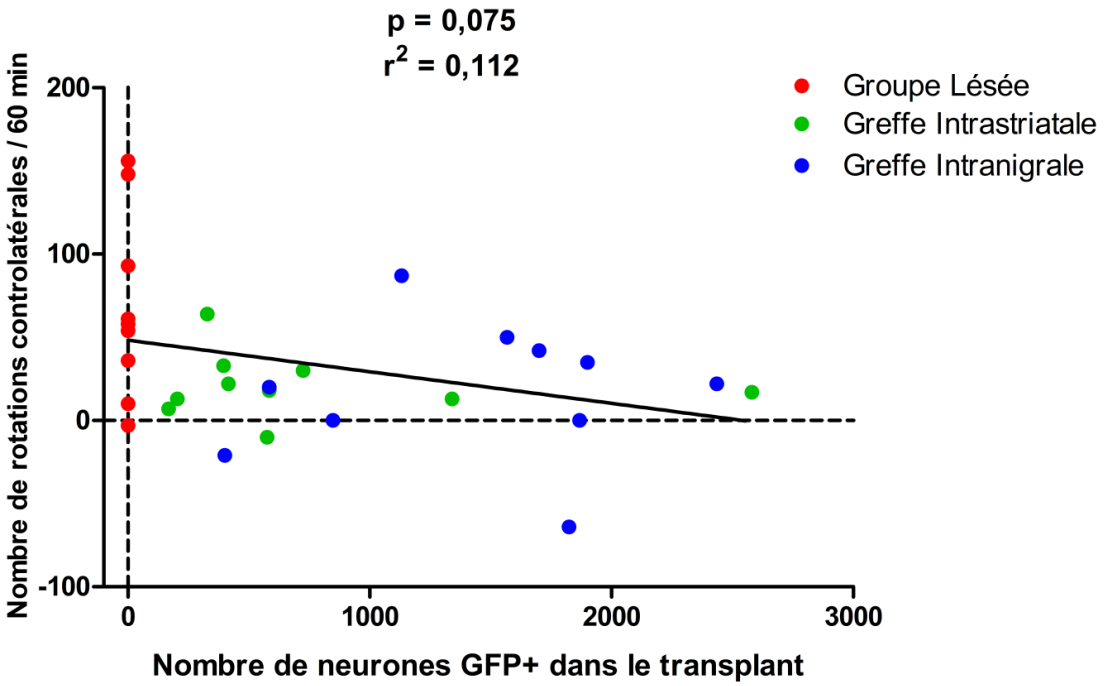


Figure 44 : Diagramme de dispersion représentant les corrélations entre le nombre de neurones GFP+ et le nombre de rotations controlatérales induites par apomorphine effectuée 13 semaines après transplantation. Chaque point représente les données d'une souris. En bleu les souris greffées en intrastriatal (n = 10), en rouge les souris greffées en intranigral (n = 10). La corrélation est calculée selon une régression linéaire simple (p = 0,075 ; r^2 = 0,112).

2. Test de la descente de tige

Le test de la descente de tige permet de mettre en évidence des déficits moteurs ainsi que d'équilibre. Le temp de retournement (T-Turn) ainsi que le temps total nécessaire à la descente complète de la tige (T-Total) ont été mesurés les 3ème et 7ème semaines après la transplantation et comparés aux performances basales pour l'ensemble des groupes contrôle (n = 8), lésé (n = 9) greffé en intrastriatal (n = 11) ou en intranigral (n = 11). Un score T-Turn supérieur à 100% indique que lors de la session, le temps de retournement est plus important que lors de la session basale.

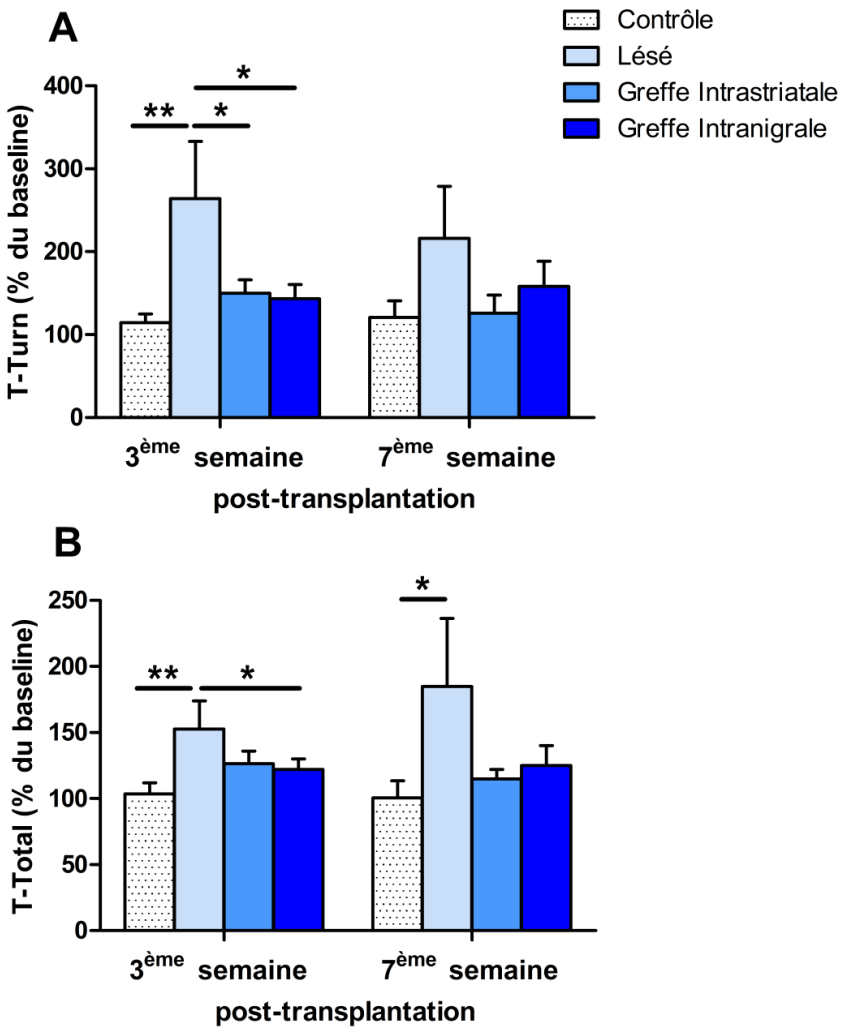
Lorsque les souris sont disposées au sommet de la tige 3 semaines après la transplantation, le score T-Turn du groupe lésé est plus de 2,5 fois supérieur à leurs niveaux de base alors qu'il ne l'est que de respectivement 1,1 ; 1,3 et 1,5 fois pour les souris contrôles, transplantés en

intrastriatal ou en intranigral. L'analyse post-hoc de la variance indique que les animaux lésés prennent donc significativement plus de temps pour effectuer un T-Turn (Figure 45.A. gauche ; $F_{3,35} = 3,558$; $p < 0,01$; $p < 0,05$; en comparaison respectivement des groupes de souris contrôle et transplantés).

De façon surprenante, cette même analyse n'a permis de mettre en évidence aucune différence dans le T-Turn des différents groupes 7 semaines après la transplantation (Figure 45.A. droite ; $F_{3,35} = 1,347$; $p = 0,27$). Malgré un T-Turn 2 fois supérieur au baseline des souris lésées 7 semaines après la transplantation, la grande variabilité de ce groupe ne permet de mentionner qu'une tendance des animaux lésés à effectuer un retournement nécessitant un temps plus important par rapport aux différents groupes contrôle, et transplantés.

De la même manière, 3 semaines après la transplantation, l'analyse ANOVA du temps total de descente de tige (T-Total) a permis de mettre en évidence que les souris lésées nécessitent un temps de descente de la tige significativement plus grand en comparaison à la fois du groupe contrôle et du groupe transplanté en intranigral (Figure 45.B. gauche ; $F_{3,35} = 3,239$ respectivement $p < 0,01$ et $p < 0,05$). De plus, il est à noter que les souris du groupe transplanté en intrastriatal présentent une tendance à descendre la tige plus rapidement que les lésées ($p = 0,064$).

7 semaines après la transplantation, le profil des performances motrices dans la mesure du T-Total semble similaire à celui observé précédemment. Le score T-Total des souris lésées parait être plus important que l'ensemble des autres groupes (184±51 chez les lésées contre 100±12 ; 114±7 et 124±15 respectivement chez les contrôles, transplantées en intrastriatal et intranigral). L'analyse de la variance n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative entre les groupes (Figure 45.B. droite ; $F_{3,35} = 1,851$; $p = 0,155$). Cependant, le test post-hoc de Fisher signal une différence significative entre le groupe lésé et le groupe contrôle ($p < 0,05$).



<u>Figure 45 :</u> Effets de la lésion et / ou de la transplantation sur les performances motrices lors du test de descente de tige les 3ème et 7ème semaines post-transplantation. Le temps de retournement (A) ainsi que le temps de descente complet de la tige (B) sont présentés 3 semaines (à gauche) et 7 semaines (à droite) post-transplantation. Pour chaque groupe contrôle (n = 8), lésé (n = 9), greffés en intrastriatal (n = 11) ou en intranigral (n = 11), les scores de T-Turn et de T-Total sont calculés en fonction du pourcentage des valeurs de base et exprimés en fonction de la moyenne ± sem. L'analyse statistique a été réalisée en appliquant un test two-way ANOVA suivi, le cas-échéant par un post-hoc test de Fisher, * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ comparé au groupe lésé.

3. Test du cylindre

Le test du cylindre a été effectué à trois reprises : avant la lésion afin de constituer une valeur de base, ainsi que les 3ème et 10ème semaines après la transplantation sur l'ensemble des animaux dans le but de tester l'asymétrie des pattes avants (Figure 46). Pour ce test, 2 souris du groupe lésé et 1 souris du groupe transplanté en intranigral ont été retirées de l'analyse car elles ne présentaient pas de comportement d'exploration du cylindre (peu de redressement et un nombre de contacts des pattes avant effectué contre la paroi du cylindre inférieur à 20 au cours de la session). Les données sont représentées pour l'ensemble des animaux contrôles (n = 8), lésés (n = 7), greffés en intrastriatal (n = 11) ou en intranigral (n = 10) en fonction du biais controlatéral exprimé selon la moyenne ± sem. Un animal présentant un nombre de contacts avec sa patte controlatérale à la lésion contre la paroi du cylindre inférieur à sa patte ipsilatérale présentera un biais inférieur à 50%.

Au cours de la session basale, la totalité des animaux a réalisé un nombre de contacts contre la paroi du cylindre équivalent entre leurs deux pattes avant. Le biais controlatéral de l'ensemble des groupes oscillait autour de 50% et aucune différence n'a été retrouvé entre les groupes (Figure 46.A ; $F_{3,32} = 1,252$, $p = 0, 307$; NS).

Trois semaines après la transplantation, l'analyse de la variance a révélé des différences dans la préférence de patte entre les groupes (Figure 46.B ; $F_{3,32} = 4,039$, $p < 0,05$). Le test post-hoc de Fisher a permis de mettre en évidence un déficit significatif dans l'utilisation des pattes avant controlatérales à la lésion chez les animaux lésés et transplantés en comparaison des animaux contrôles. En effet, alors que le groupe contrôle ne montre aucune préférence dans l'utilisation de ses pattes avant indiquée par un biais controlatéral au coté de la lésion de 51,7±1 %, les groupes lésé et transplantés en intrastriatal ou intranigral montrent une nette préférence pour l'utilisation de leurs pattes ipsilatérales représentée par un biais controlatéral à la lésion respectivement de 34,4±5 %, 42,4±2 % et 41,7±4 %.

Enfin, la dernière session de test du cylindre réalisée 10 semaines après transplantation montre également une différence significative du contact des pattes avant contre la paroi du cylindre entre les groupes (Figure 46.C ; $F_{3,32} = 2,961$, $p < 0,05$). Un déficit significatif des pattes avant controlatérales au coté de la lésion est observable à la fois chez les groupes lésé et transplanté dans le striatum (Figure 46.C ; $p < 0,05$) en comparaison du groupe contrôle. Enfin il est important de noter qu'aucune différence significative n'a été retrouvée entre le

groupe contrôle et les souris transplantées dans la SN. Toutefois, cette tendance observée est à confirmer par le biais de tests possédant une sensibilité plus importante.

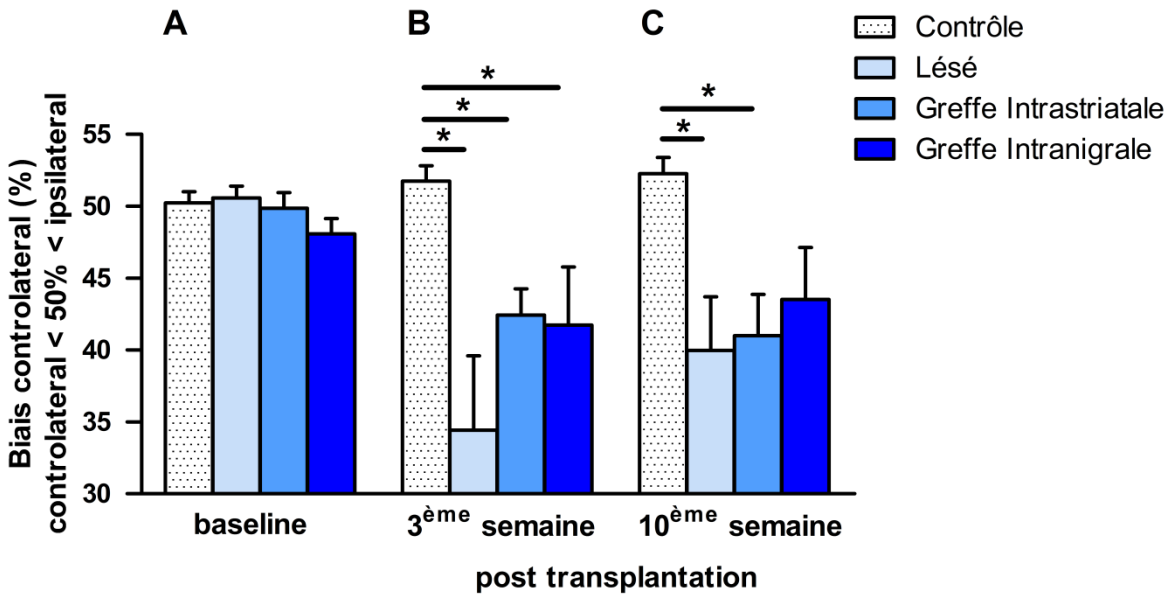


Figure 46 : Effets de la lésion et / ou de la transplantation sur les performances motrices lors du test du cylindre. 2 jours avant la lésion les valeurs de base des préférences de patte antérieures au contact du cylindre sont analysées (A). La 3ème (B) et 10ème (C) semaine post-transplantation, l'asymétrie des pattes est également analysée. Pour chaque groupe, contrôle (n = 8), lésé (n = 7), transplantés au niveau du striatum (n = 11) ou au niveau de la substance noire (n = 10), le biais controlatéral est calculé et les données sont présentées en fonction de la moyenne ± sem. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide d'une ANOVA. * : $p < 0,05$ comparé au groupe contrôle.

4. Test de la poutre modifié

Le test de la poutre modifié a été utilisé pour évaluer les déficits de marche et la coordination motrice sur l'ensemble des 4 groupes de souris. Pour ce faire, les animaux ont été entrainés à traverser une poutre d'un mètre de long dont la largeur, progressivement décroissante, complique ainsi la traversé. De plus, le jour du test une grille est ajoutée sur la plateforme pour augmenter la difficulté. 6 semaines après la transplantation, l'analyse statistique a révélé une différence significative entre les groupes dans le temps nécessaire à la

traversée de la poutre (Figure 47.A ; $F_{3,35}$ = 3,45, $p < 0,05$) de même que dans le pourcentage de dérapages des pattes avant droites par rapport au nombre d'appuis droits (Figure 47.B, $F_{3,35}$ = 4,429, $p < 0,01$). En revanche, l'analyse du pourcentage de dérapages des pattes avant gauches par rapport au nombre d'appuis gauches n'a signalé aucune différence entre les groupes (Figure 47.C ; $F_{3,35}$ = 0,21, $p = 0,88$).

L'analyse du temps nécessaire à la traversée (Figure 47.A) a révélé que les souris du groupe lésé à la 6-OHDA présentaient un temps de traversé complet de la poutre 1,6 fois plus important que les souris du groupe contrôle ($p < 0,01$) et 1,4 fois plus que les souris transplantées dans la SN ($p < 0,05$). De plus, bien que les souris greffées dans le striatum semblent traverser la poutre plus rapidement que les lésées, aucune différence significative n'a été retrouvée entre ces deux groupes ($p = 0,132$).

L'analyse du pourcentage de dérapages des pattes avant droites par rapport au nombre d'appuis droits (Figure 47.B) a révélé que le groupe lésé effectue à la fois un pourcentage d'erreurs significativement plus important (22,5±1,5%, $p < 0,05$) en comparaison du groupe contrôle (15,8±1,9%) et également du groupe transplanté dans la SN (17,5±2%, $p < 0,05$). De même, le groupe greffé en intrastriatal présente également un pourcentage d'erreurs significativement plus important (23,2±1,2%) en comparaison du groupe contrôle ($p < 0,01$) et du groupe transplanté en intranigral ($p < 0,05$). Au contraire, le pourcentage de dérapages des pattes avant gauches par rapport au nombre d'appuis gauches est identique entre les groupes (Figure 47.C).

L'ensemble de ces résultats indique que 6 semaines après la transplantation, seule la localisation intranigrale de la greffe permet de restaurer les paramètres de marche et de coordination motrice révélés par le test de la poutre. En revanche les souris transplantées en intrastriatal ne présentent pas de restauration des performances motrices et arborent, de la même manière que les souris lésées mais non transplantées, des déficits de coordination et de marche.

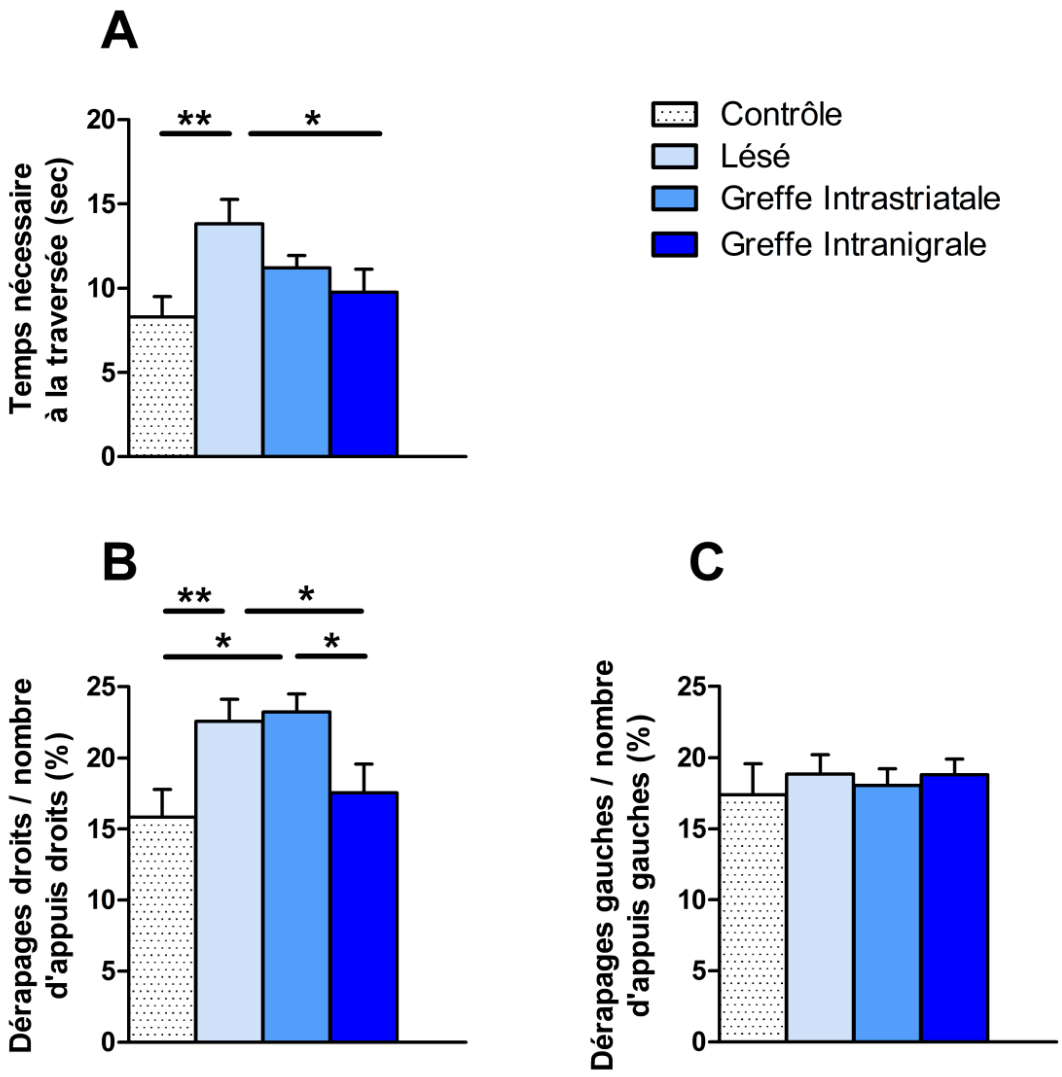


Figure 47 : Effets de la lésion et / ou de la transplantation sur les performances motrices et la coordination lors du test de la poutre 6 semaines après la transplantation. Analyse du temps nécessaire à la traversée de la poutre (A), ainsi que du pourcentage de dérapages des pattes avant par rapport au nombre d'appuis à droite (B) et à gauche (C) chez les 4 groupes de souris contrôle (n = 8), lésé (n = 9), transplantés en intrastriatal (n = 11) ou en intranigral (n = 11). Les résultats ont été analysés en utilisant une analyse de la variance suivie par un test post-hoc de Fisher. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$.

5. Test de l'escalier

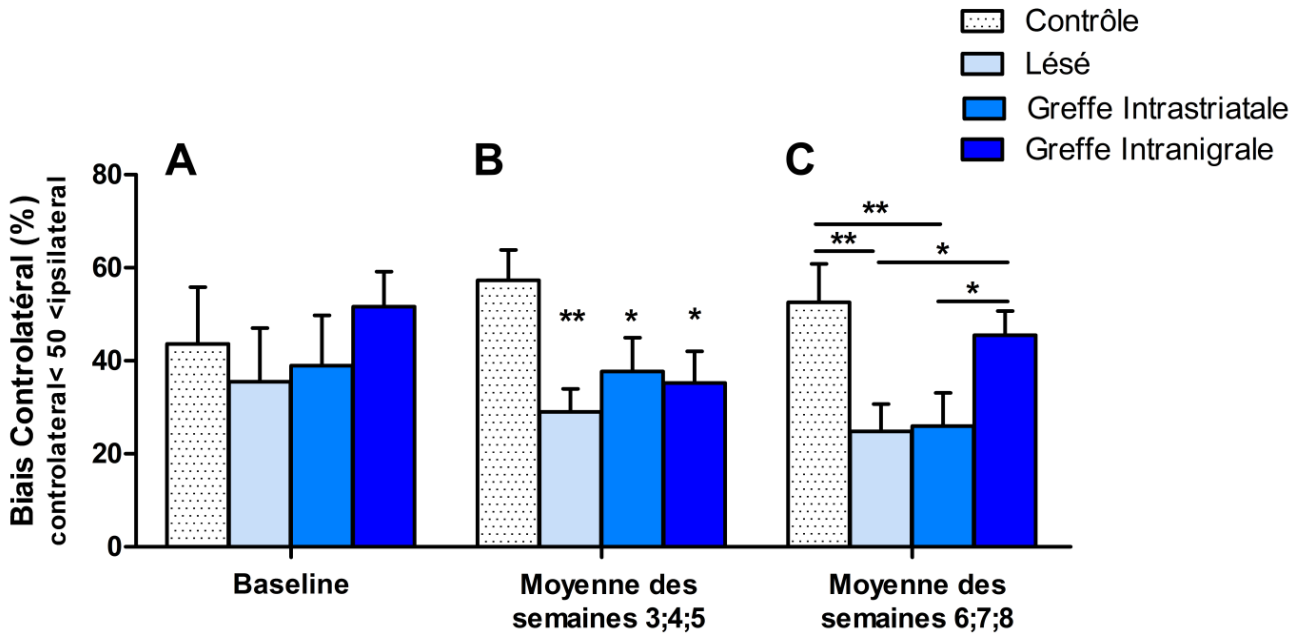
Le test de l'escalier a été utilisé pour évaluer les performances motrices relatives à des mouvements fins des membres antérieurs et en particulier lors de mouvements de préhension de nourriture. Dans notre étude, ce test a permis d'évaluer les déficits moteurs provoqués par la lésion ainsi qu'une éventuelle récupération motrice des pattes avant suite à la transplantation sur les 4 groupes d'animaux contrôle (n = 8), lésé (n = 9), transplantés dans le striatum (n = 11) et dans la SN (n = 11). Les résultats sont exprimés en fonction du biais controlatéral représentant le pourcentage du nombre de boulettes de nourriture collectées à droite par rapport au nombre de boulettes totales collectées (droite et gauche) en une session de 10 min.

Dans un premier temps, les animaux ont réalisé le test afin d'établir leurs performances de base (baseline) et aucune différence dans le nombre de boulettes de nourriture collectées n'a été mise en évidence entre les groupes (Figure 48.A ; $F_{3,35} = 0,47$; $p = 0,70$).

Par la suite, les animaux ont été testés durant 6 semaines consécutives à raison d'une session par semaine. Afin de mettre en évidence une éventuelle restauration des fonctions motrices suite à la transplantation, les 6 semaines de test ont été divisées en 2 périodes comprenant les données moyennes des semaines 3 à 5 post-transplantation d'une part et des semaines 6 à 8 post-transplantation d'autre part. En ce qui concerne la première période, l'analyse de la variance a permis de mettre en évidence une différence entre les groupes (Figure 48.B ; $F_{3,35} = 2,89$; $p < 0,05$) indiquant un effet significatif de la lésion sur l'ensemble des groupes lésé et transplantés. Plus précisément, le biais controlatéral des semaines 3 à 5 post-transplantation s'est révélé significativement plus important chez les animaux contrôles en comparaison à la fois des lésés ($p < 0,01$), transplantés en intrastriatal ($p < 0,05$) et en intranigral ($p < 0,05$).

Durant la seconde période correspondant aux semaines 6 à 8 post-transplantation (Figure 48.C), le biais controlatéral au coté de la lésion, chez les animaux lésés et transplantés en intrastriatal est toujours significativement plus faible que les contrôles ($p < 0,01$). En revanche, le biais des animaux transplantés en intranigral a fortement augmenté au cours de la seconde période et est significativement supérieur à la fois des animaux lésés ($p < 0,05$) et des animaux transplantés en intrastriatal ($p < 0,05$). De plus, il n'existe plus aucune différence entre le groupe contrôle et le groupe transplanté en intranigral ($p = 0,47$) révélant une récupération des performances motrices uniquement pour ce groupe.

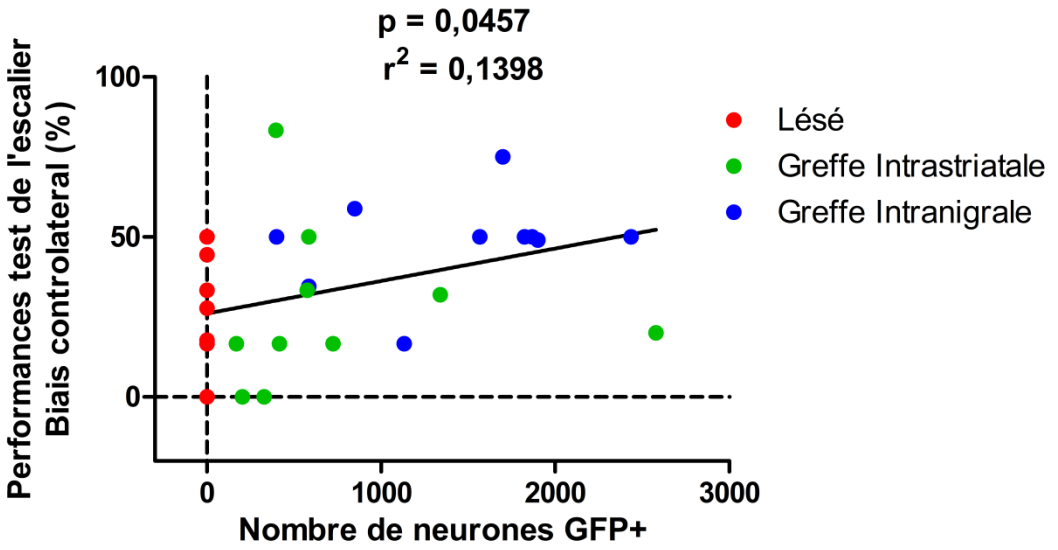
Considérant ces résultats, il est possible d'affirmer qu'à partir de 6 semaines post-transplantation, les animaux greffés en intranigrale sont les seuls présentant une récupération de leurs performances motrices fines des pattes antérieures révélée par la sensibilité du test de l'escalier. A l'inverse, les animaux lésés de même que ceux transplantés dans le striatum conservent un déficit de préhension.



<u>Figure 48 :</u> Effets de la lésion et / ou de la transplantation sur les performances motrices lors du test de l'escalier. Le biais controlatéral correspondant à la préférence de patte pour la préhension de boulettes de nourriture est calculé sur 3 périodes différentes : Avant la lésion afin d'établir des valeurs de base (A), des semaines 3 à 5 post-transplantation (B) ainsi que des semaines 6 à 8 post-transplantation. Les effets entre les groupes contrôle (n = 8), lésé (n = 9), transplanté en intrastriatal (n = 11) et transplanté en intranigral (n = 11) ont été mis en évidence par une analyse ANOVA suivie d'un test post-hoc de Fisher. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$.

Afin d'établir un éventuel lien entre les performances motrices et le nombre de neurones GFP+ quantifié au sein des greffes nous avons analysé la corrélation entre le nombre de neurones GFP+ et le biais controlatéral obtenu dans le test de l'escalier pour chaque animal correspondant du groupe lésé, transplanté en intrastriatal ou intranigral (Figure 49). L'analyse a révélé l'existence d'une corrélation positive significative entre le nombre de neurones GFP+

quantifié et le bais controlatéral (Figure 49 ; r^2 = 0,1398 ; p = 0,0457) indiquant que plus le nombre de neurones GFP+ est important, plus les performances motrices des animaux sont élevées.

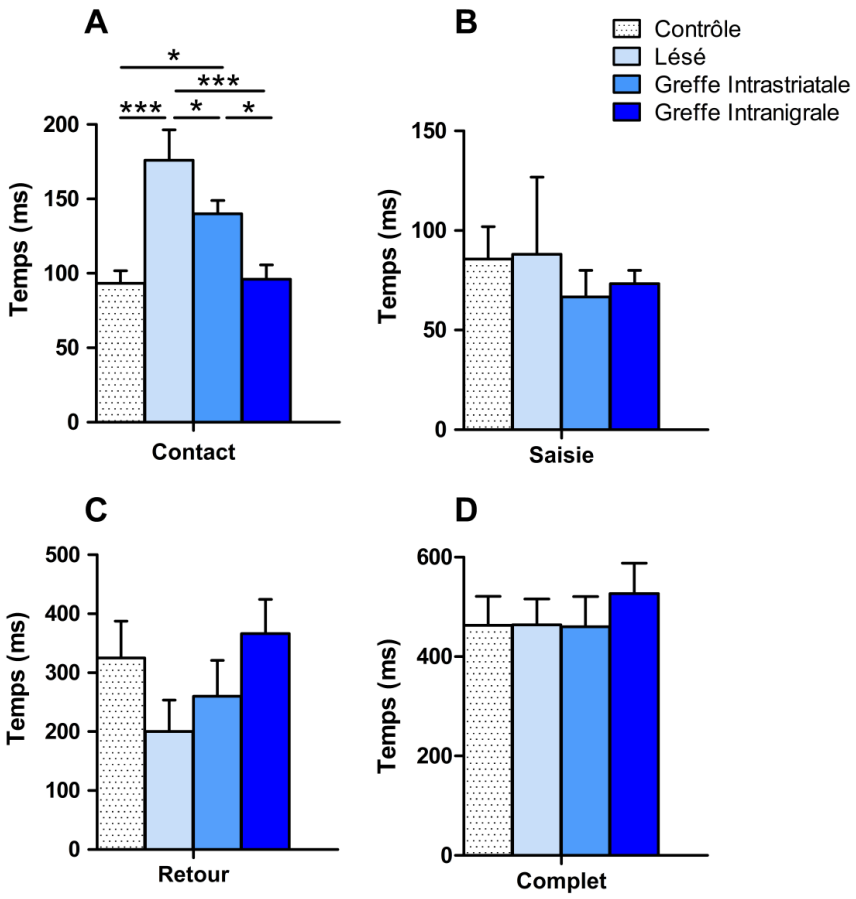


<u>Figure 49 :</u> Diagramme de dispersion représentant les corrélations entre le nombre de neurones GFP+ et les performances motrices évaluées par le test de l'escalier. La corrélation est calculée selon une régression linéaire simple r^2 = 0,1398 ; p = 0,0457.

6. Analyse du mouvement de préhension de nourriture

Un des symptômes de la MP est la lenteur des mouvements effectués par les patients. En réponse à cet état de fait, nous avons approfondi l'analyse des capacités de préhension de nourriture dans le test de l'escalier par la mesure du temps nécessaire à la réalisation de ce mouvement de préhension pour chacun des 4 groupes. L'action de prise de nourriture a été divisée en 3 mouvements distincts : le mouvement de contact (Figure 50. A) correspondant au départ de l'action jusqu'au contact entre la patte et la boulette de nourriture, le mouvement de saisie (Figure 50. B) équivalent à la fermeture des doigts de la patte sur la boulette, et enfin le mouvement de retour (Figure 50. C) correspondant au retrait de la patte jusqu'au lâché de la boulette dans la bouche de l'animal. Ces trois mouvements ont été étudiés individuellement et les temps nécessaires à la réalisation de chaque action ainsi que le temps nécessaire au mouvement complet (Figure 50. D) sont analysés ci-dessous.

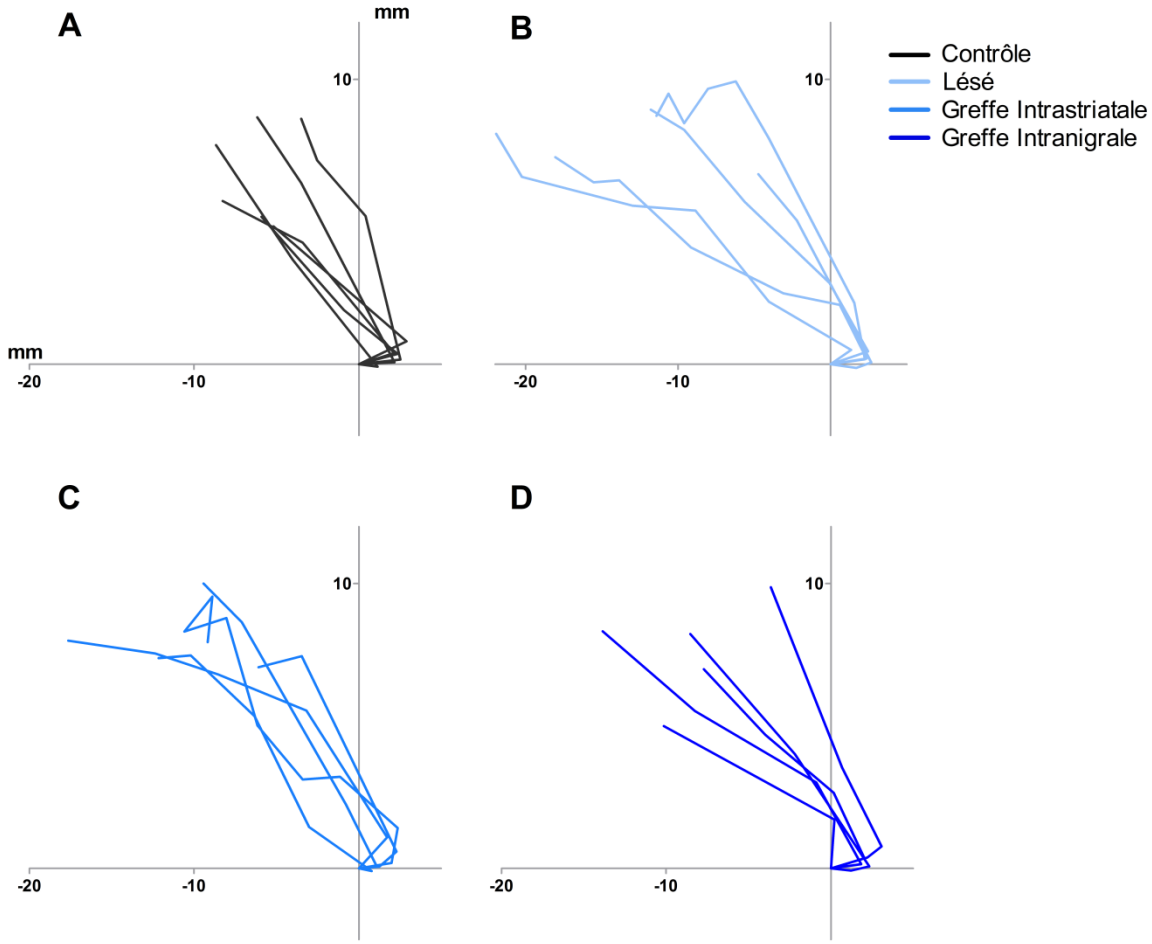
En raison des paramètres de sélection établis pour cette étude, 2 souris contrôles, 4 souris lésées, 6 souris transplantées en intrastriatal et 6 souris transplantées en intranigral ont été éliminées de l'analyse car ces animaux ne présentaient pas de mouvement de préhension complet sur la marche n°3 du staircase. De ce fait, l'analyse du mouvement de préhension de nourriture a été réalisée au final sur 6 souris contrôles, 5 souris lésées, 5 souris transplantées dans le striatum et 5 souris transplantées dans la substance noire. Les résultats sont exprimés en fonction de la moyenne ± sem des temps effectués par les différents groupes. Parmi l'ensemble des actions, l'analyse de la variance a révélé que seul le mouvement de contact présente des différences dans la réalisation de l'action entre les groupes (Figure 50.A ; $F_{3,17}$ = 4,43; $p < 0,001$). En effet, alors que ce mouvement de contact requiert en moyenne 93±8 ms chez les animaux contrôles, la durée de cette action est significativement plus importante à la fois chez les animaux lésés (176±20 ms ; $p < 0,001$) et chez les animaux transplantés au niveau du striatum (136±9 ms ; $p < 0,05$). De plus, cette analyse montre également que les souris lésées réalisent l'action dans un temps significativement plus long que les animaux transplantés en intrastriatal ($p < 0,05$) et en intranigral ($p < 0,001$). Les animaux transplantés en intranigral réalisent quant à eux, ce mouvement de contact en 96±9 ms, temps significativement plus court que les animaux transplantés en intrastriatal ($p < 0,05$). Enfin, aucune différence n'a été retrouvée entre le groupe contrôle et le groupe intranigral ($p = 0,758$).



<u>Figure 50 :</u> Effets de la lésion et / ou de la transplantation sur le temps nécessaire à la réalisation de l'action de préhension. Le mouvement de préhension est ici décomposé en mouvement de contact (A), de saisie (B) et de retour (C) formant à eux trois le mouvement complet (D). Pour chaque groupe ; contrôle (n = 6), lésé (n = 5), transplanté en intrastriatal (n = 5), transplanté en intranigral (n = 5) ; la moyenne du temps nécessaire à l'action est calculée et une analyse ANOVA effectuée révélant les différences entre les groupes (* : $p < 0,05$; *** : $p < 0,001$).

Suite à l'observation de ces variations de durée du mouvement de contact chez les différents groupes, plusieurs interprétations sont envisageables : 1) la trajectoire de ce mouvement de contact est identique entre les groupes et effectivement plus lente chez les souris lésées et transplantées au niveau du striatum, 2) la vitesse de déplacement de la patte est similaire entre les groupes mais la trajectoire de ce mouvement est affectée chez les animaux lésés et transplantés au niveau du striatum, 3) les deux facteurs (vitesse et trajectoire) sont affectés.

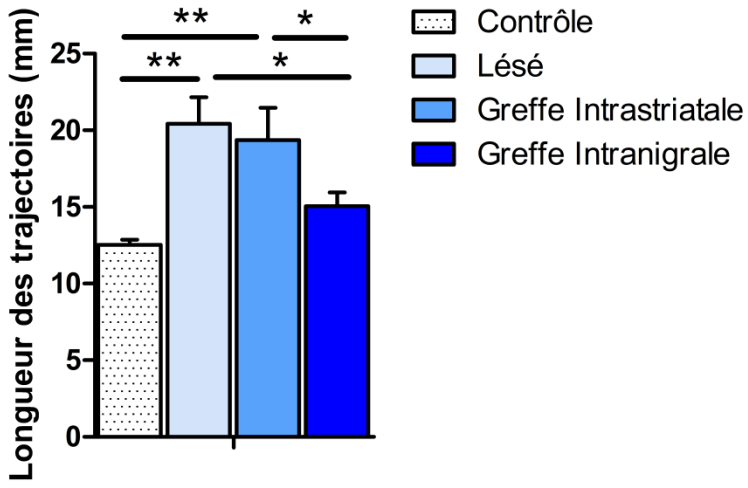
Afin de répondre à certaines de ces interrogations et dans le but d'une évaluation précise du mouvement de préhension de nourriture, les trajectoires de contact effectuées sur la 3ème marche de l'escalier ont été tracées (Figure 51). Ces trajectoires correspondent aux mouvements sélectionnés précédemment pour le calcul du temps nécessaire au mouvement de contact. Ainsi, il est possible de constater une certaine fluidité et régularité du mouvement de contact à la fois chez les souris contrôles et transplantées dans la SNpc (Figure 51.A et D). Au contraire, les souris lésées et transplantées dans le striatum présentent des trajectoires de contact très irrégulières et pourvues de nombreux angles (Figure 51.B et C).



<u>Figure 51 :</u> Effets de la lésion et / ou de la transplantation sur les trajectoires de contact lors du mouvement de préhension dans le test de l'escalier. Les trajectoires de 6 souris contrôles (A), 5 lésées (B), 5 transplantées dans le striatum (C) et 5 transplantées dans la SNpc (D) ont été tracées. Chaque tracé représente la trajectoire d'un animal au cours d'un seul mouvement de préhension de nourriture sur la troisième marche de l'escalier. L'intersection des axes (X;Y) représente la position de la boulette de nourriture.

Afin de quantifier ces irrégularités, la longueur moyenne des trajectoires de contact a pour chaque groupe été calculée. L'analyse de la variance a permis de mettre en évidence une différence significative entre les groupes (Figure 52 ; $F_{3,17} = 7,516$, $p < 0,01$). De plus, l'analyse post-hoc de Fisher permet de révéler que la longueur des trajectoires de contact du groupe lésé (20,4±1,7 mm) est significativement plus importante que celles du groupe contrôle (12,5±0,3 mm; $p < 0,001$) et du groupe transplanté en intranigral (15±0,8 mm ; $p < 0,05$). De même, la longueur des trajectoires du groupe transplanté en intrastriatal (19,3±2,1 mm) est significativement plus importante que celles du groupe contrôle ($p < 0,01$) et du groupe transplanté en intranigral ($p < 0,05$). Enfin, aucune différence significative n'a été observée entre les longueurs de trajectoires des groupes contrôle et transplanté en intranigrale ($p = 0,200$) ainsi qu'entre les groupes lésé et transplanté en intrastriatal ($p = 0,596$)

Ainsi, seule la transplantation intranigrale permet une restauration des performances motrices des pattes antérieures à partir de 6 semaines post-transplantation. En revanche, les souris transplantées dans le striatum ne montrent aucune restauration de leurs performances motrices et présentent un profil de trajectoire de préhension de nourriture proche de celui des souris lésées.



<u>Figure 52 :</u> Effets de la lésion et / ou de la transplantation sur la longueur des trajectoires lors d'un mouvement de contact controlatéral au coté la lésion dans le test de l'escalier. La moyenne des longueurs de trajectoires lors d'un mouvement de contact chez 6 souris contrôles, 5 lésées, 5 transplantées dans le striatum et 5 transplantées dans la substance noire a été comptabilisée. Les différences entre les groupes ont été révélées par une analyse de variance suivie d'un test post-hoc de Fisher. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$.

7. Effet de l'injection de L-dopa sur les performances motrices

Sur la base des résultats obtenus suite à l'analyse des performances motrices ainsi que sur la longueur des trajectoires effectuées au cours du mouvement de contact dans le test de l'escalier, nous avons évalué l'effet d'une injection unique de L-DOPA (précurseur direct de la dopamine) sur les performances motrices. Pour ce faire, 16 semaines après la transplantation, l'ensemble des groupes a effectué 2 sessions de test de l'escalier. Les performances motrices de chaque animal ont été déterminées le premier jour, sans injection de L-DOPA, puis le lendemain après injection unique de L-DOPA.

Le nombre de boulettes de nourriture collectées à droite et à gauche de l'escalier a été comptabilisé de la même manière que précédemment et les résultats sont représentés en fonction du biais controlatéral à la lésion (Figure 53). Trois souris (1 souris lésée et 2 souris transplantées en intranigral) ont été retirées de l'analyse faute d'entrée dans le compartiment contenant l'escalier amenant l'effectif final à 8 contrôles, 8 lésées, 11 transplantées en intrastriatal et 9 transplantées en intranigral. L'analyse de la variance a permis de mettre en évidence une différence significative entre les groupes dans l'aptitude à attraper les boulettes de nourriture 16 semaines après la transplantation lors de la session du test sans injection de L-DOPA (Figure 53.A ; $F_{3,32}$: 2,974 ; $p < 0,05$) mais aucune différence significative n'a été révélée dans ce test après injection de L-DOPA (Figure 53.B ; $F_{3,32}$: 0,902, $p = 0,45$). Il a été révélé qu'au cours de la session sans L-DOPA, de façon similaire à ce qui a été observé ultérieurement, les souris lésées présentent des déficits significatifs dans l'utilisation de la patte controlatérale au coté de la lésion en comparaison des contrôles ($p < 0,05$) ainsi que des souris transplantées en intranigral ($p < 0,01$). De plus, bien que le biais de préhension de nourriture controlatéral au coté de la lésion des souris transplantées en intrastriatal (34,5±12,8%) soit plus faible à la fois des souris contrôles (46,6±5,2%) et celles transplantées en intranigral (56,4±6,7%), aucune différence significative n'a été retrouvée entre ces groupes (Figure 53.A).

Enfin, après injection de L-DOPA, les performances motrices des pattes ipsilatérales et controlatérales au coté de la lésion semblent similaires avec un biais controlatéral respectivement pour les contrôles, lésées, transplantées en intrastriatal ou en intranigral de 55,4±12,3% ; 34,4±8% ; 43,1±9,5% et 48,1±1,8% (Figure 53.B) et aucune différence significative n'a été retrouvée entre ces groupes.

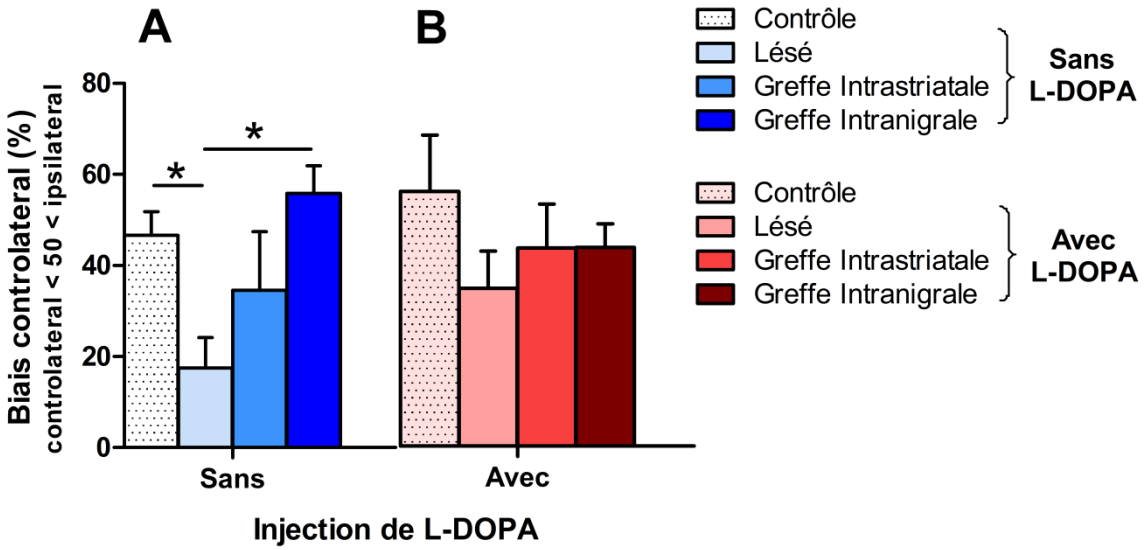
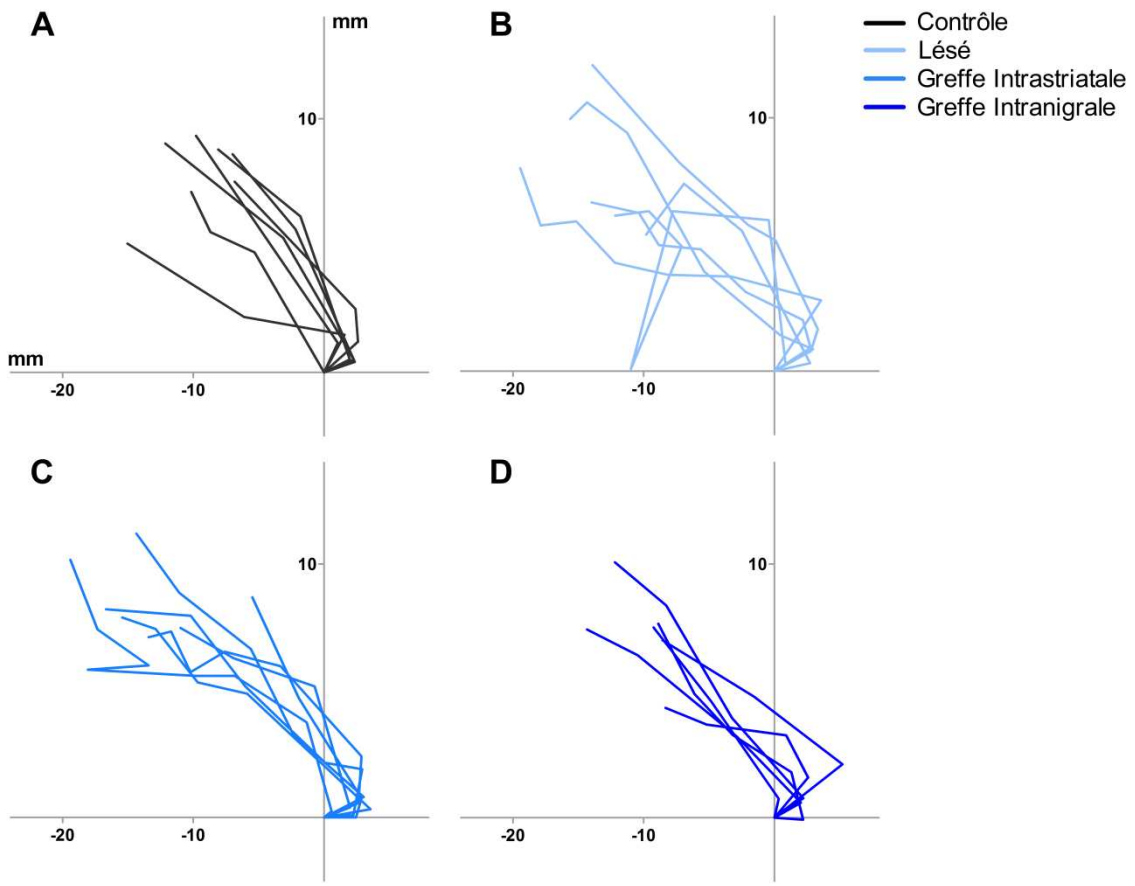


Figure 53 : Effets de la lésion et / ou de la transplantation sur les performances de préhension de nourriture sans ou avec injection de L-DOPA. Le nombre de boulettes de nourriture collectées au cours du test de l'escalier de 8 souris contrôles, 8 lésées, 11 transplantées dans le striatum et 9 transplantées dans la substance noire ont été comptabilisées sans (A) ou avec (B) injection de L-DOPA et présenté sous la forme du biais controlatéral à la lésion. Les différences entre les groupes ont été révélées par une analyse de variance suivie d'un test post-hoc de Fisher. * : $p < 0,05$.

Dans un second temps nous avons analysé les trajectoires du mouvement de contact, 16 semaines après la transplantation sans ou avec injection de L-DOPA (Figure 54 ; 55 et 56). De façon analogue à notre description précédente, sans injection de L-DOPA et 16 semaines après la transplantation, les trajectoires des groupes contrôle et transplanté en intranigral sont dans l'ensemble rectilignes tandis que celles du groupe lésé et du groupe transplanté dans le striatum paraissent très irrégulières et saccadées, formant des tracés non linéaires (Figure 54). Comme précédemment, la longueur des tracés a été quantifiée montrant une différence significative entre les groupes (Figure 57.A ; $F_{3,22} = 5,932$, $p < 0,01$) et de façon analogue aux résultats rapportés 8 semaines après la greffe, les trajectoires du mouvement de contacts des groupes lésé et transplanté dans le striatum sont toutes deux significativement plus longues que celles du groupe contrôle (Figure 57. A ; $p < 0,01$) et également significativement plus longues que celles du groupe transplanté dans la SN (Figure 57. A ; respectivement $p < 0,01$ et $p < 0,05$).

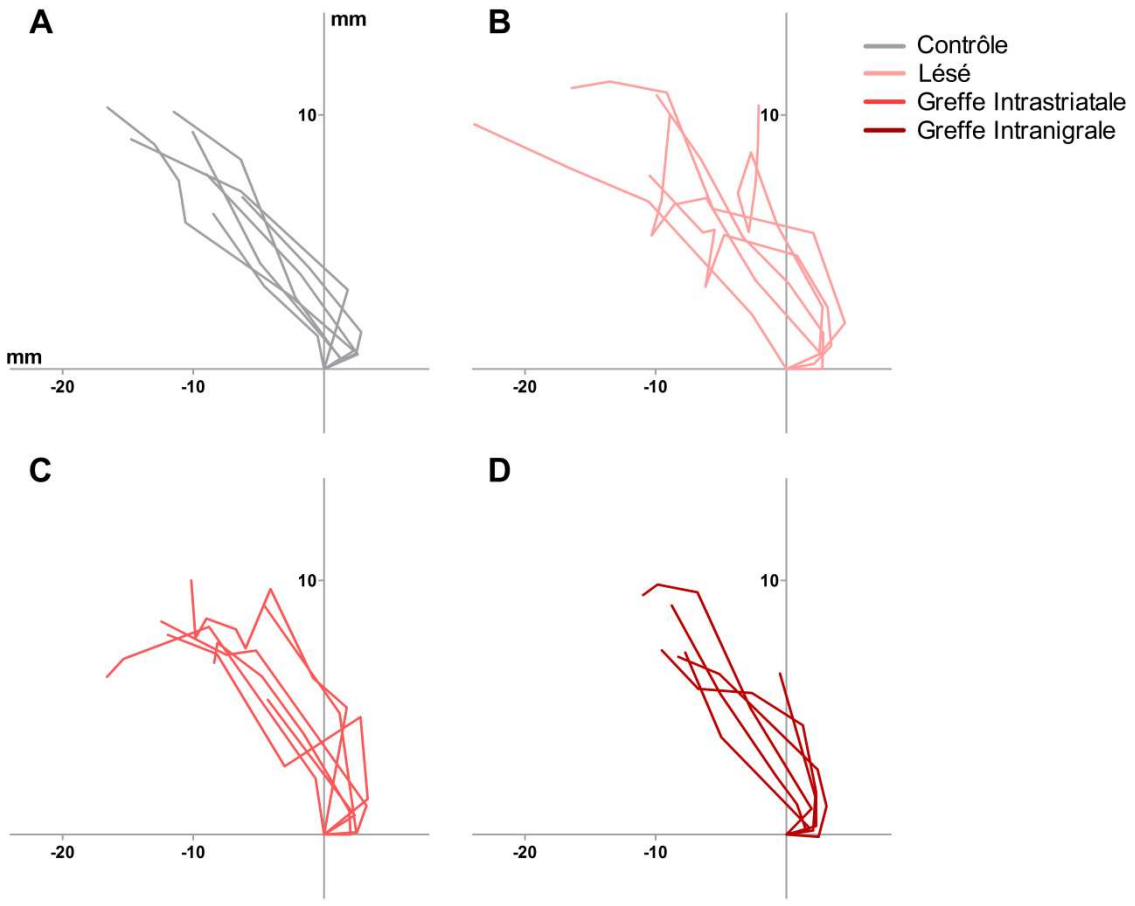


<u>Figure 54 :</u> Effets de la lésion et / ou de la transplantation sur les trajectoires de contact lors du mouvement de préhension dans le test de l'escalier 16 semaines post-transplantation. Les trajectoires de 7 souris contrôles (A), 6 lésées (B), 7 transplantées dans le striatum (C) et 6 transplantées dans la substance noire (D) ont été tracées. Chaque tracé représente la trajectoire d'un animal au cours d'un seul mouvement de préhension de nourriture sur la troisième marche de l'escalier. La session est réalisée 16 semaines après la transplantation sans injection de L-DOPA. L'intersection des axes (X;Y) représente la position de la boulette de nourriture.

Après une injection unique de L-DOPA (Figure 55), les trajectoires des groupes contrôle, lésé et transplanté dans la SN conservent des profils similaires à ceux observés sans injection soit une régularité du tracé chez les groupes contrôle et transplanté en intranigral et une irrégularité du tracé très marquée chez le groupe lésé (Figure 55.A, B et D ; Figure 56). Toutefois, les animaux transplantés en intrastriatal présentent, après une injection unique de

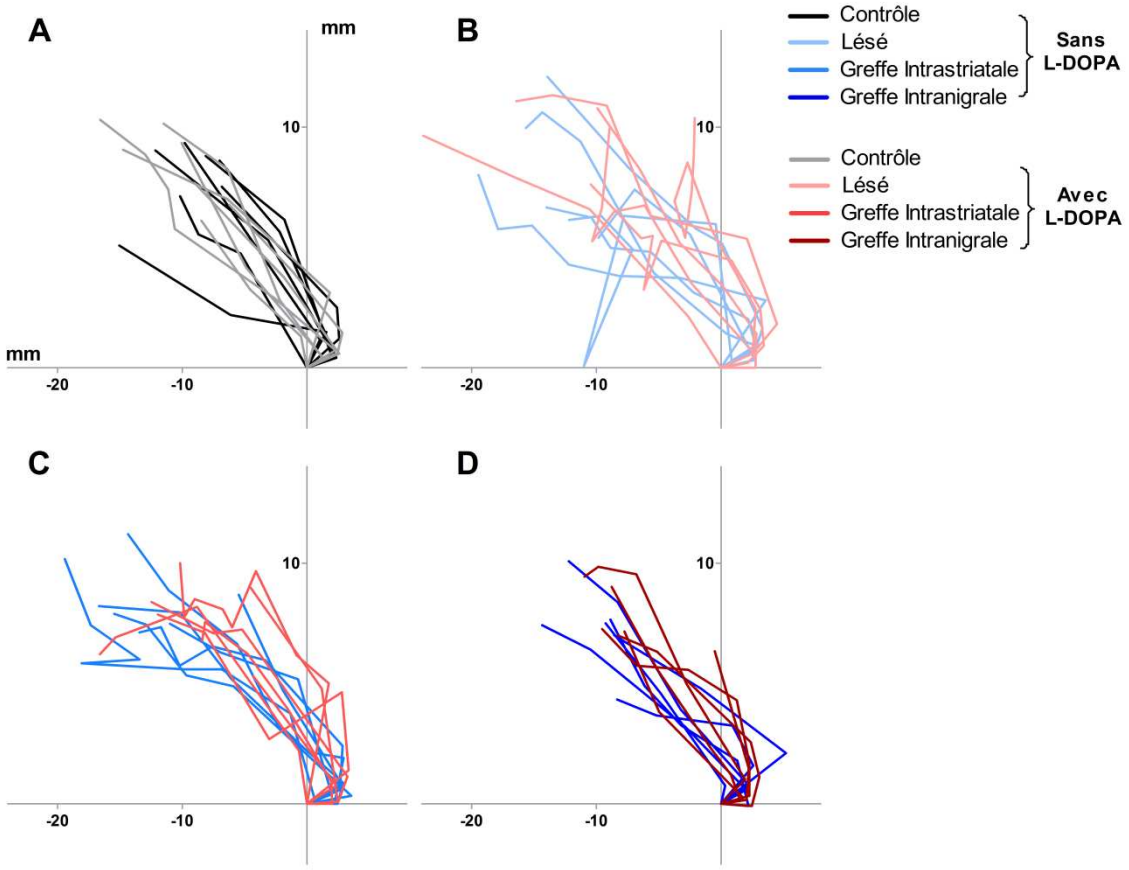
L-DOPA, des trajectoires du mouvement de contact modifiées, devenant pour la plupart plus linéaires (Figure 55.C ; Figure 56). Plus précisément, seule la longueur des trajectoires du groupe lésé est significativement plus longue en comparaison des groupes contrôle, transplantés dans le striatum ou dans la SN (respectivement, $p < 0,01$; $p < 0,05$ et $p < 0,01$). De plus, avec une longueur de 18±1,9 mm chez le groupe transplanté en intrastriatal contre 14,7±1,5 mm pour le groupe transplanté en intranigral, aucune différence significative n'a pu être retrouvée entre ces deux groupes (Figure 57.B).

Ces résultats indiquent que l'injection unique de L-DOPA à la faible dose de 10mg/kg a permis de fluidifier les trajectoires lors des mouvements de contact chez les souris transplantées dans le striatum. En revanche, malgré une amélioration observée chez le groupe lésé dans l'aptitude de préhension de nourriture après injection de L-DOPA, l'analyse des trajectoires de ce mouvement laisse supposer que cette dose ne semble pas suffire pour restaurer complètement leurs performances motrices fines.

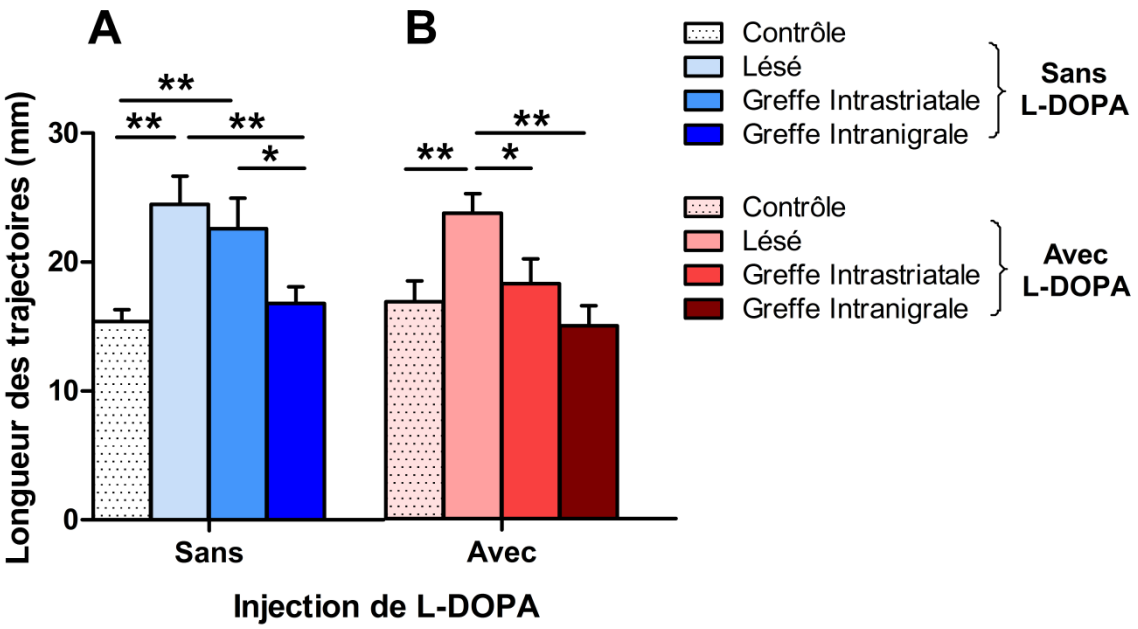


<u>Figure 55 :</u> Effets de la lésion et / ou de la transplantation sur les trajectoires des mouvements de contact 16 semaines post-transplantation après injection de L-DOPA.

Les trajectoires de 7 souris contrôles (A), 6 souris lésées (B), 7 souris transplantées dans le striatum (C) et 6 souris transplantées dans la substance noire (D) ont été tracées. Chaque tracé représente la trajectoire d'un animal au cours d'un seul mouvement de préhension de nourriture sur la troisième marche du staircase. La session est réalisée 16 semaines après la transplantation avec injection de L-DOPA. L'intersection des axes (X;Y) représente la position de la boulette de nourriture.



<u>Figure 56 :</u> Représentation fusionnée des trajectoires lors des mouvements de contact sans et avec injection de L-DOPA. Les trajectoires de 7 souris contrôles (A), 6 souris lésées (B), 7 souris transplantées dans le striatum (C) et 6 souris transplantées dans la substance noire (D) ont été tracées sans et avec injection de L-DOPA.

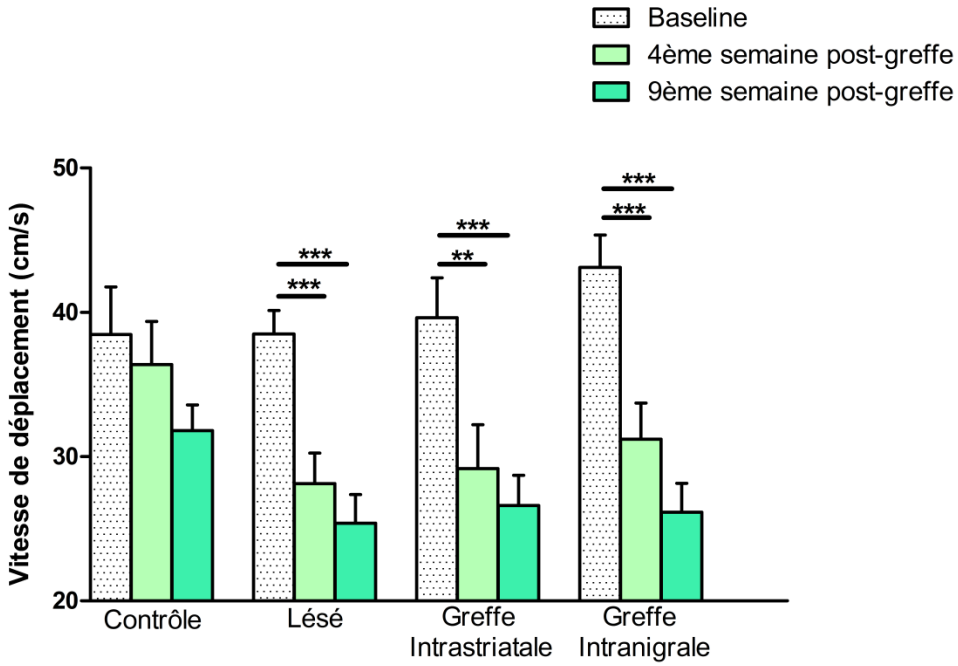


<u>Figure 57 :</u> Effets de la lésion et / ou de la transplantation sur la longueur des trajectoires lors d'un mouvement de contact controlatéral au coté la lésion sans ou avec injection de L-DOPA. La moyenne des longueurs de trajectoires lors d'un mouvement de contact chez 7 souris contrôles, 6 souris lésées, 7 souris transplantées dans le striatum et 6 souris transplantées dans la substance noire ont été comptabilisées sans (A) ou avec (B) injection de L-DOPA. Dans les deux conditions, les différences entre les groupes ont été révélées par une analyse de variance suivie d'un test post-hoc de Fisher. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$.

8. Analyse de la marche

La marche du « petit pas » est une des singularités de la locomotion chez les patients atteints de la MP. De ce fait, nous avons analysé les caractéristiques de la démarche sur l'ensemble des groupes contrôle (n = 8), lésé (n = 9), greffés au niveau du striatum (n = 11) ou de la SN (n = 11). Cette étude a été réalisée en utilisant un dispositif nommé « Gait Lab » capable de calculer un ensemble de paramètres de marche chez la souris. Ce test a été effectué au cours d'une session en amont de la lésion (noté baseline) ainsi que durant les 4ème et 9ème semaines post-transplantation.

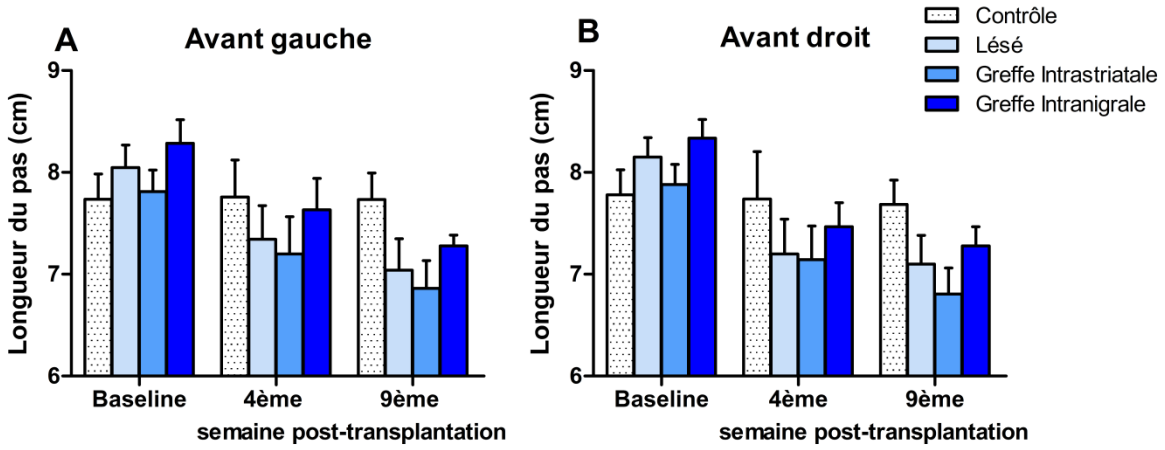
Considérée comme une caractéristique essentielle de la locomotion, la vitesse moyenne de déplacement a en premier lieu été analysée. L'analyse statistique a révélé un effet significatif du temps (Figure 58 ; $F_{2,35} = 34,13$, $p < 0,001$) mais aucun effet en fonction du groupe n'a été mis en évidence. Alors que les vitesses du groupe contrôle restent similaires au cours des semaines baseline, 4 et 9 post-greffe (respectivement, 38,4±3 cm/s ; 36,38±2,9 cm/s ; 31,7±1 cm/s) celles du groupe lésé (38,49±1,6 cm/s ; 28,12±2,1 cm/s ; 25,38±1,9 cm/s), transplanté dans le striatum (39,62±2,7 cm/s ; 29,16±3 cm/s ; 26,60±2,1 cm/s) et transplanté dans la SN (43,11±2,2 cm/s ; 31,21±2,5 cm/s 26,14±2 cm/s) diminuent significativement à la fois les 4ème et 9ème semaines post-transplantation en comparaison de leurs semaines baseline (Figure 58).



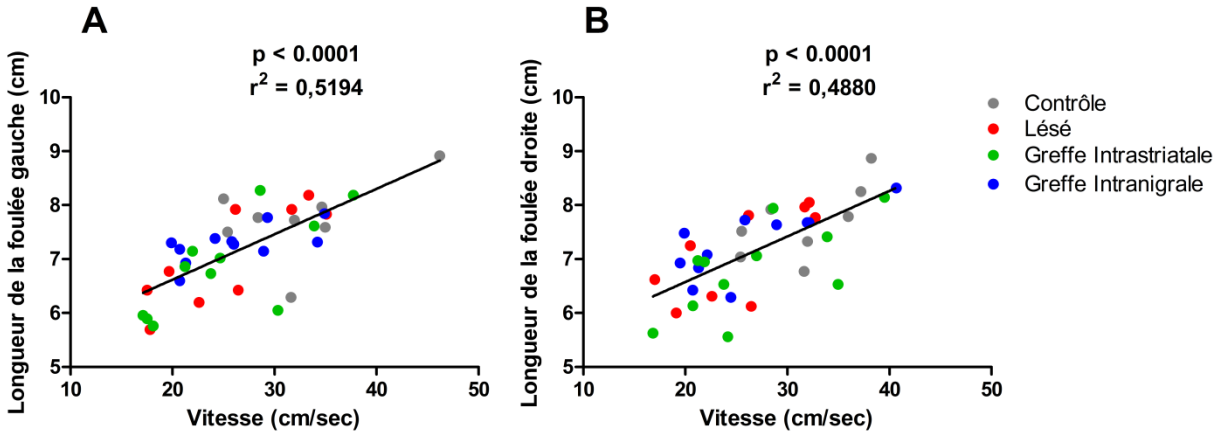
<u>Figure 58 :</u> Étude de la vitesse moyenne de déplacement en fonction du temps. La vitesse moyenne de déplacement en cm/s a été mesurée pour chaque groupe en amont de la lésion ainsi que les 4ème et 9ème semaines post-transplantation. L'analyse statistique a été réalisée sur les groupes contrôle (n = 8), lésé (n = 9), greffées au niveau du striatum (n = 11) ou de la SN (n = 11) en appliquant un test ANOVA à mesures répétées, ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

De plus, nous avons analysé pour chaque groupe, l'ensemble des caractéristiques de locomotion. Bien que le « Gait Lab » permette une mesure précise de ces paramètres, aucune différence significative lors de l'analyse ANOVA en fonction du groupe n'a pu être mise en évidence lors des différentes sessions. Ces résultats sont similaires pour l'ensemble des

paramètres des pattes avant ou arrière (aire de chaque patte, longueur et largeur de l'empreinte de patte, écart entre les pattes avant ou arrière, etc) dont nous ne détaillerons pas ici les données. Toutefois à titre informatif, la longueur de la foulée des pattes avant est présentée Figure 59. De plus, nous avons mis en évidence, par régression linéaire simple, l'existence d'une corrélation entre la vitesse moyenne de passage des animaux et la longueur de la foulée. Cette analyse a révélé que, à la fois pour la foulée des pattes avant gauches (Figure 60.A) ou droites (Figure 60.B), il existe une corrélation positive et significative entre la vitesse et la longueur de la foulée avant (respectivement : $r^2 = 0,5194$, $p < 0,000$ pour la foulée gauche ; $r^2 = 0,4880$, $p < 0,0001$ pour la foulée droite).



<u>Figure 59 :</u> Effet de la lésion et / ou de la transplantation sur la longueur de la foulée. Pour chaque période (baseline, 4ème et 9ème semaine post-transplantation), la longueur de la foulée des pattes avant gauches (A) et droites (B) a été calculée. L'analyse statistique a été réalisée sur l'ensemble des groupes contrôle (n = 8), lésé (n = 9), transplantés dans le striatum (n = 11) et dans la SN (n = 11) à l'aide d'une ANOVA.



<u>Figure 60 :</u> Diagramme de dispersion représentant les corrélations entre la vitesse de déplacement et la longueur de la foulée lors du test de la marche 9 semaines après transplantation. Les données sont indiquées indépendamment pour la foulée gauche (A) ou droite (B). Chaque corrélation est calculée selon une régression linéaire simple (foulée gauche : $r^2 = 0,5194$; $p < 0,000$; foulée droite : $r^2 = 0,4880$; $p < 0,0001$).

Au regard de ces résultats, nous avons par la suite analysé l'effet du temps sur les paramètres de locomotion (Figure 61). En dépit du grand nombre de paramètres analysés par le dispositif, seules les longueurs de foulées ainsi que les durées des phases d'appuis vont être présentées. Nous noterons tout de même que les différences observées entre les profils des paramètres de locomotion (durée de la phase d'oscillation, durée de la foulée, longueur séparant les deux pattes avant, etc.) sont similaires à celles détaillées ci-dessous.

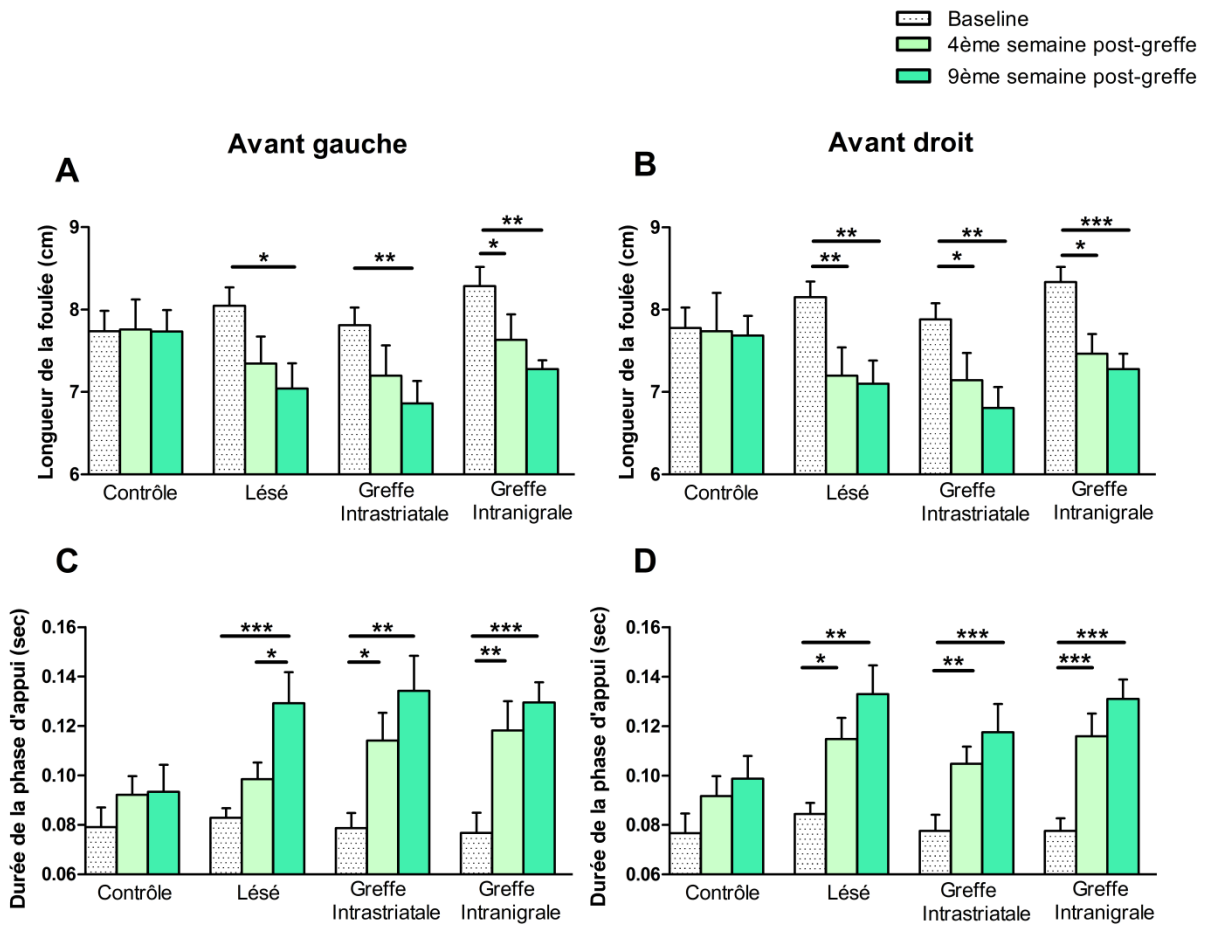
Ces deux mesures de locomotion étudiées (longueur de foulée et durée de phase d'appui), ont été analysées avant la lésion (baseline) puis au cours des 4ème et 9ème semaines post-transplantation respectivement pour les pattes avant gauches (Figure 61.A et C) et droites (Figure 61.B et D) sur l'ensemble des groupes contrôle (n = 8), lésé (n = 9), transplantés dans le striatum (n = 11) et dans la SN (n = 11).

En ce qui concerne l'étude de la longueur de la foulée de la patte avant gauche (Figure 61), l'analyse de la variance des mesures répétées montre un effet significatif du temps ($F_{2,35}$ = 11,96, $p < 0,001$). En particulier, alors que la longueur de la foulée est pour le groupe contrôle similaire en fonction des semaines, celles des groupes lésé et transplanté dans le striatum diminuent progressivement la 4ème semaine post-transplantation pour être significativement

plus courtes la 9ème semaine post-transplantation en comparaison de leur semaine baseline. De même, pour le groupe greffé dans la substance noire, la longueur de la foulée des pattes avant gauches est significativement plus courte les 4ème et 9ème semaines post-transplantation en comparaison de leur baseline. De façon analogue, la longueur de la foulée des pattes avant droites (Figure 61.B) des souris contrôles est identique en fonction des semaines. Néanmoins, cette foulée est significativement plus courte les semaines 4 et 9 post-transplantation en comparaison du baseline pour l'ensemble des groupes lésé et transplantés dans le striatum ou la substance noire.

Concernant maintenant la durée de la phase d'appui des pattes avant gauches (Figure 61.C) et avant droites (Figure 61.D), un effet du temps a été révélée par l'analyse ANOVA sur mesures répétées (respectivement $F_{2,35} = 21,34$; $p < 0,001$ avant gauche ; $F_{2,35} = 32,11$; $p < 0,001$ avant droite). Plus précisément à gauche comme à droite, aucune différence dans la durée de la phase d'appui en fonction du temps n'a été observée dans le groupe contrôle. Au contraire chez les 3 autres groupes lésé et transplantés dans les deux conditions, cette durée de la phase d'appui est significativement augmentée que ce soit pour les 4ème et 9ème semaines post-transplantation en comparaison des valeurs baseline (Figure 61.C et D).

En regroupant les informations obtenues précédemment et considérant que la plupart des paramètres de marche sont dépendants de la vitesse de déplacement de la souris, nous avons étudié la variation des paramètres de marche en ajoutant le facteur vitesse comme co-variable (éventuel facteur à l'origine de la variation) dans l'analyse ANOVA de ces différents paramètres de marche. Cette analyse n'a révélé aucune différence entre les groupes et ce, pour aucun des paramètres étudiés et nous avons de ce fait choisit de ne pas représenter ces résultats.



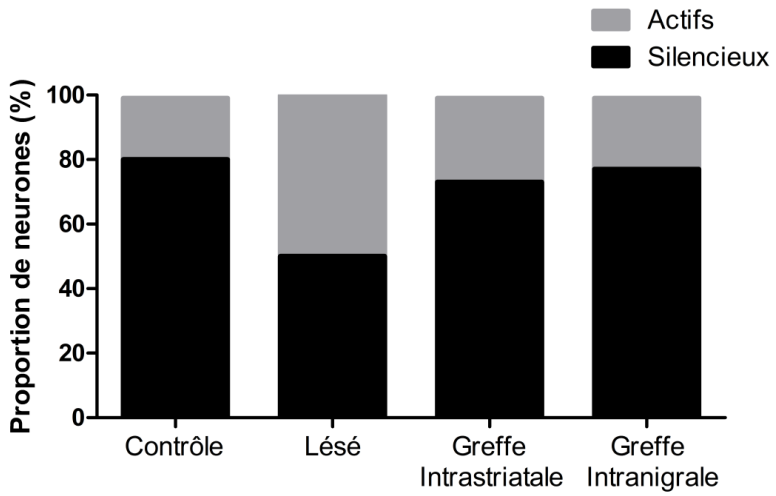
<u>Figure 61 :</u> Étude de l'évolution d'une sélection de paramètres de locomotion en fonction du temps. Pour chaque groupe, et en distinguant les valeurs obtenues du coté gauche et droit, la longueur de la foulée avant (A et B) et la durée de la phase d'appui des pattes avant (C et D) ont été déterminée au cours d'une session baseline et des semaines 4 et 9 post-transplantation. L'analyse statistique a été réalisée sur les groupes contrôle (n = 8), lésé (n = 9), greffés au niveau du striatum (n = 11) ou de la SN(n = 11) en appliquant un test ANOVA à mesures répétées, * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

B. Étude Électrophysiologique

En continuité de l'analyse comportementale, une étude électrophysiologique a été réalisée sur l'ensemble des groupes contrôle, lésé et transplantés dans le striatum ou dans la substance noire. Cette étude électrophysiologique, effectuée par Clément Vitrac, ancien étudiant en thèse, vise à caractériser par des enregistrements électrophysiologiques *in vivo* chez l'animal anesthésié, l'activité des neurones de projection du striatum, cibles des axones des neurones dopaminergiques de la SNpc.

1. Effet de la transplantation sur l'activité de décharge des neurones épineux de taille moyenne (NEM)

De nombreuses études rapportent que l'activité des NEM au niveau du striatum est fortement augmentée à la suite d'une lésion dopaminergique (Tseng *et al*., 2001). De façon analogue, 50% de ces neurones sont silencieux chez les souris lésées contre 80% chez les contrôles (Figure 62). La transplantation, à la fois dans les conditions intrastriatale ou intranigrale, permet de rétablir partiellement la proportion de NEM silencieux respectivement de 73% et 77% (Figure 62).



<u>Figure 62 :</u> Effet de la lésion et / ou de la transplantation sur l'activité de décharge des NEM. Proportion de neurones spontanément actifs (en gris) ou silencieux (en noir) pour l'ensemble des groupes. Les données sont exprimées en pourcentage du nombre de NEM enregistrés pour chaque groupe.

De plus, l'analyse de la fréquence de décharge des NEM a révélé un effet significatif entre les groupes (Figure 63 ; $F_{3,53} = 3,724$, $p < 0,05$). En effet, le test de comparaison multiple Holm-Sidak révèle une augmentation significative de la fréquence de décharge chez les souris lésées à la 6-OHDA (0,41±0,20 Hz) en comparaison des souris contrôles (0,039±0,037 Hz) ($p < 0,05$). En outre, chez les animaux transplantés à la fois dans le striatum (0,066±0,05 Hz) ou dans la substance noire (0,024±0,022 Hz), aucune différence significative dans la fréquence de décharge des NEM n'a été révélée que ce soit en comparaison du groupe lésé ou du groupe contrôle. Malgré tout, ces deux localisations de transplantation ont tendance à réduire les fréquences de décharge des NEM pour les ramener à des valeurs proches de celles du groupe contrôle.

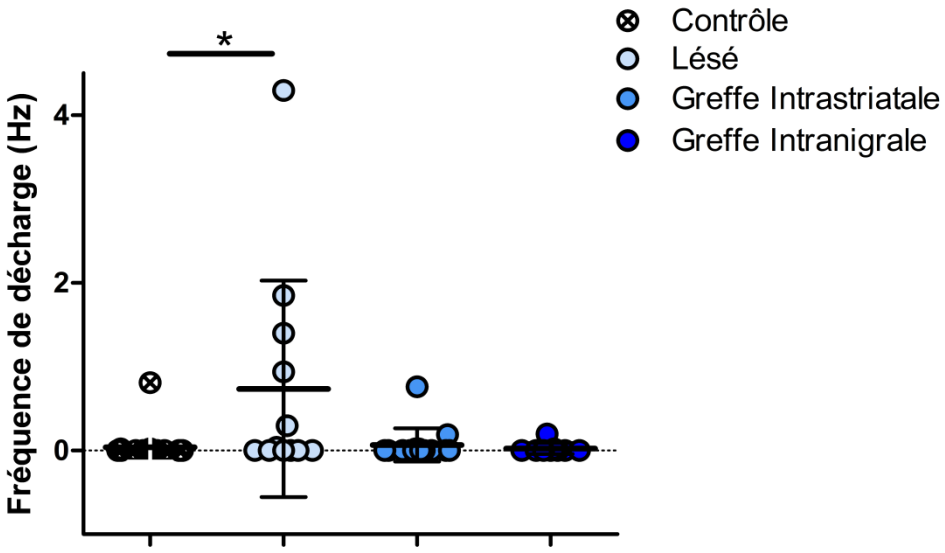
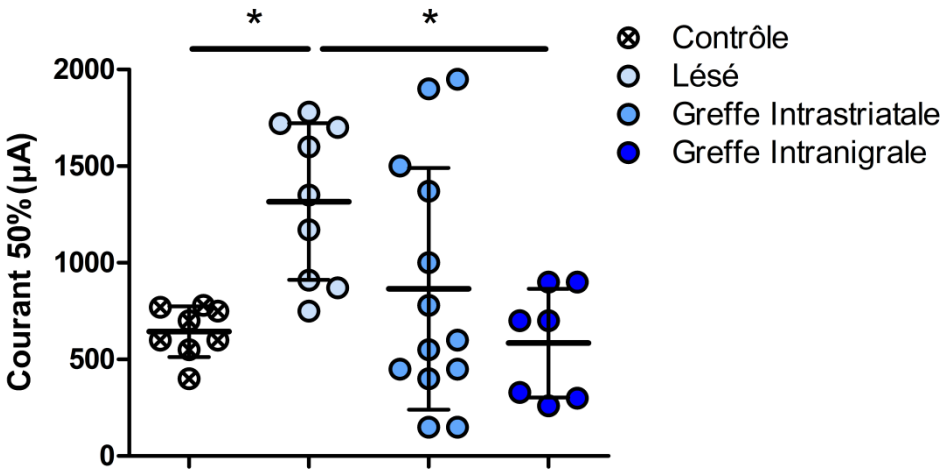


Figure 63 : Effet de la lésion et / ou transplantation sur la fréquence de décharge des NEM. Pour chaque groupe contrôle (n = 22), lésé (n = 11), transplantés en intrastriatal (n = 15) ou en intranigral (n = 9), la moyenne ± sem est représentée ainsi que chaque valeur individuelle. Une ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple Holm-Sidak a permis de mettre en évidence les différences significatives * : $p < 0,05$.

2. Effet de la lésion et ou de la transplantation sur l'efficacité de la transmission cortico-striée

L'efficacité de la transmission cortico-striatale des neurones correspond à la mesure de l'intensité de courant de stimulation nécessaire à l'obtention d'un potentiel d'action dans 50%

des cas (noté par la suite : courant 50%). Au sein de notre étude, l'analyse de la variance chez les souris contrôles (n = 8), lésées (n = 9), transplantés dans le striatum (n = 13) ou dans la substance noire (n = 7), a montré un effet significatif de cette intensité moyenne du courant 50% entre les groupes (Figure 64 ; $F_{3,33} = 4,630$, $p < 0,01$). Chez le groupe contrôle de même que le groupe transplanté en intranigral, l'intensité de ce courant 50% a été respectivement évaluée en moyenne à 643,7±46,4 µA et 584,3±106,54 µA contre 1316,6±135,0 µA chez le groupe lésé. Le test de comparaison multiple Holm-Sidak indique que ces deux groupes contrôle et transplanté dans la substance noire, ont une intensité de courant 50% significativement plus faible que le groupe lésé (Figure 64 ; $p < 0,05$). *A contrario*, en dépit d'une intensité de courant de 865,4±173,3 µA, aucune différence significative n'a été révélée entre le groupe lésé et le groupe transplanté dans le striatum.



<u>Figure 64 :</u> Effet de la lésion et / ou de la transplantation sur l'efficacité de la transmission cortico-striatale. Le courant 50% correspond à la mesure de l'intensité de courant de stimulation nécessaire à l'obtention d'un potentiel d'action dans 50% des cas. Pour chaque groupe contrôle (n = 8), lésé (n = 9), transplantés dans le striatum (n = 13) ou dans la substance noire (n = 7), la moyenne ± sem est représentée ainsi que chaque valeur individuelle. Une ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple Holm-Sidak a permis de mettre en évidence les différences significatives * : $p < 0,05$.

DISCUSSION

Les stratégies médicamenteuses utilisées dans le cadre de la maladie de Parkinson visant à pallier la perte sélectives des neurones dopaminergiques conduisent, sur le long terme, à une diminution progressive de leur efficacité et aboutissent à l'apparition d'effets secondaires néfastes pour le patient. Une des stratégies thérapeutiques basée sur le remplacement des neurones dopaminergiques dégénérés au sein de la substance noire à la suite de cette maladie est la transplantation de cellules embryonnaire au niveau du striatum, région cible de ces neurones dopaminergiques. De nombreux patients ont à ce jour bénéficié de cette approche avec cependant des résultats inconstants suivant les études. Une des hypothèses soulevée en réponse à ces constatations est la position ectopique du greffon, transplanté au niveau de la région cible et non directement dans la structure lésée, ne permettant pas le rétablissement des voies motrices lésées. De précédentes études réalisées chez des modèles rongeurs de la maladie de Parkinson ont rapporté que la transplantation de neurones dopaminergiques fœtaux directement dans la substance noire permettait entre autres, une reconstruction de la voie nigro-striée ainsi qu'une amélioration des rotations induites par les drogues (Gaillard *et al*., 2009 ; Thompson *et al*., 2009). Toutefois, de nombreux travaux rapportent également une restauration des comportements rotatoires après transplantation intrastriatale (Palmer *et al*., 2001 ; Klein *et al*., 2007 ; Heuer *et al*., 2013). En conséquence de ces résultats, et parce qu'aucune étude ne montre clairement de restaurations des fonctions motrices complexes pour ces deux types de transplantation, cette étude s'est attachée à comparer, d'un point de vue anatomique et fonctionnel la transplantation intranigrale *versus* intrastriatale.

L'objectif de nos travaux a donc été d'évaluer sur le long terme et pour les deux conditions de transplantation intranigrale ou intrastriatale, le devenir des neurones dopaminergiques fœtaux transplantés, à la fois sur le plan anatomique par l'utilisation de techniques de microscopies et sur le plan fonctionnel par l'utilisation d'une batterie de test comportementaux ainsi que par une étude électrophysiologique.

Choix du modèle animal utilisé

L'étude à la fois anatomique et fonctionnelle des caractéristiques physiopathologiques de la MP se base en grande partie sur les modèles animaux, devant être capable de mimer, le plus possible, les caractéristiques anatomiques et comportementales de cette maladie. Nous avons dans notre étude, utilisé un modèle de souris lésé unilatéralement par injection de 6-OHDA

au niveau de la SNpc gauche. En dépit de l'absence de la plupart des caractéristiques de la MP, ce modèle offre tout de même de nombreux avantages :

- Outre l'existence de nombreux travaux utilisant le modèle rat de lésion à la 6-OHDA, la nécessité d'employer des modèles transgéniques et exprimant notamment la GFP sous le contrôle du promoteur de la tyrosine hydroxylase comme source de tissus pour la transplantation dirige notre choix vers le modèle souris.
- Ce type de lésion présente, un atout de par sa simplicité technique et son faible taux de mortalité engendré.
- Le choix de la 6-OHDA permet d'obtenir, après injection d'une unique dose, une dégénérescence quasi-totale (supérieure à 90%) et ciblée des neurones dopaminergiques contrairement au modèle de lésion au MPTP nécessitant une répétition des injections (Przedborski et Vila, 2003).
- L'injection unilatérale de cette toxine assure, 3 semaines après la lésion, l'estimation de l'étendue de la lésion grâce aux comportements rotatoires induis par apomorphine et permet de sélectionner les animaux pour la transplantation (Ungerstedt, 1968 ; Hudson *et al*., 1993).
- L'injection unilatérale permet de créer un syndrome hémi-Parkinsonien et d'obtenir un déficit controlatéral important, mesurable par des tests comportementaux. Par ailleurs, ce type de lésion unilatérale permet également pour un même individu d'être son propre contrôle en laissant un hémisphère intact et nous donne ainsi la possibilité d'étudier les conséquences fonctionnelles de la lésion ainsi que d'une stratégie réparatrice.

Pour l'ensemble de ces avantages, le modèle souris de lésion unilatérale à la 6-OHDA, directement dans la SNpc a été utilisé dans le cadre de notre étude.

Comme il a été précisé précédemment, les tissus utilisés pour la transplantation proviennent de mésencéphale ventral issu d'embryons de souris exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de la tyrosine hydroxylase (Sawamoto *et al*., 2001). De ce fait, un simple immunomarquage contre la GFP nous confère la possibilité d'identifier les neurones dopaminergiques provenant du greffon et de suivre facilement leurs projections au sein de la voie nigro-striée lésée. En effet, la protéine GFP n'est pas simplement exprimée dans les corps cellulaires de ces neurones mais également dans l'intégralité de leurs projections (Sawamoto *et al*., 2001 ; Thompson *et al*., 2005).

Étude Neuroanatomique

Dans cette étude anatomique, l'analyse du nombre de neurones dopaminergiques contenu dans le greffon a été estimée par extrapolation du nombre total de cellules GFP+ détecté par immunofluorescence. Il est important de noter que certains travaux ont mentionné la présence, après double immunomarquage à la fois contre la GFP et la tyrosine hydroxylase, de quelques (< 5%) cellules GFP+/TH- (Thompson *et al*., 2005). Il a été reporté que ces cellules possédaient une morphologie typiquement immature, dépourvues de processus dendritiques. Il a donc été supposé que ces neurones dopaminergiques immatures ne possèdaient pas encore la capacité d'expression de la protéine TH à des niveaux détectables. De ce fait, et tenant compte des données de précédentes études, il est possible d'utiliser les cellules GFP+ pour identifier les neurones dopaminergiques du greffon de façon fiable.

Intégration du transplant, projections des fibres dopaminergiques et expression des marqueurs dopaminergiques

Ainsi, quatre mois après la transplantation, l'immunomarquage contre la GFP a permis de mettre en évidence l'intégration des greffons au sein des structures hôtes pour chaque condition de transplantation intranigrale ou intrastriatale. De plus, en accord avec de précédents résultats, nos travaux ont révélé que les neurones dopaminergiques fœtaux transplantés directement dans la SN sont capables, chez l'adulte, de ré-innerver le striatum en empruntant la voie nigro-striée lésée unilatéralement à la 6-OHDA chez les souris (Gaillard *et al*., 2009 ; Thompson *et al*., 2009 ; Grealish *et al*., 2014). En particulier, il a été noté que la majeure partie des projections émanant du transplant étaient polarisées, se dirigeaient rostralement vers la voie nigro-striée et innervaient de façon spécifique, l'ensemble des circuits dopaminergiques composant les ganglions de la base dont le striatum, la zone sous ventriculaire ou les couches corticales profondes. *A contrario*, les neurones transplantés en position ectopique n'étendent leur prolongement qu'au niveau du striatum, ainsi que dans les couches profondes du cortex. En revanche, comme mentionné dans de précédents travaux, ces transplantations ne permettent pas de reconstruction de la voie nigro-striée (Dunnett *et al*., 1987 ; Doucet *et al*., 1989 ; Nikkhah *et al*., 1993 ; Abrous *et al*., 1993 ; Hargus *et al*., 2010).

Dans le cas de transplantation intrastriatale de MV chez la souris, les données de la littérature recensent dans le transplant une proportion de cellules TH+ comprise entre 0,4 et

1,8% par rapport à la totalité des cellules transplantées (Triarhou *et al*., 1990 ; Witt et Triarhou, 1995 ; Bye *et al*., 2012). En parallèle, dans le cas de transplantation intranigrale, Thompson et ses collaborateurs ont indiqués que les neurones TH+ du transplant représentaient environ 1% de la totalité des cellules transplantées (Thompson *et al*., 2009). Au regard de ces résultats, la survie des neurones dopaminergiques transplantées de notre étude se place dans la fourchette de survie des précédents travaux, aussi bien dans le cas de greffe intrastriatale qu'intranigrale. De façon très intéressante, nous avons comptabilisé un nombre neurones GFP+ près de deux fois plus important au sein des greffons intranigraux (1426±207 ; soit 0,95±0,14% de la totalité des cellules transplantées) en comparaison des greffons intrastriataux (732±231 ; soit 0,49±0,15% de la totalité des cellules transplantés). Cette différence du nombre de neurones dopaminergiques dans les transplants intranigraux peut être liée à la position homotypique du transplant, proche de ces afférences et des facteurs neurotrophiques spécifiques augmentant la survie des neurones dopaminergiques au sein du transplant.

En revanche, les neurones greffés en position ectopique reçoivent une innervation corticale glutamatergique non spécifique. De plus, la présence de facteurs trophiques non spécifiques pouvant être néfastes à la survie et au développement des neurones DA permet d'expliquer le plus faible nombre de neurones DA retrouvés dans les transplants intrastriataux.

Le tissu utilisé pour la transplantation provient du MV prélevé au 12ème jour embryonnaire. A ce stade du développement, il est impossible de distinguer les neurones DA de la VTA de ceux de la SNpc expliquant la présence de ces deux populations de neurones DA au sein du transplant. En effet, nous avons montré, la présence de neurones DA de type VTA et substance noire dans les transplants aussi bien en position intranigrale qu'intrastriatale. Cependant, le pourcentage de neurones TH co-exprimant la protéine Girk2 (marqueur des neurones DA de la SNpc) était plus important que celui des neurones TH+ co-exprimant la calbindine (marqueur de neurones DA de la VTA). De façon très intéressante et en accord avec les travaux présents dans la littérature, les sous-types de neurones DA au sein des greffes possèdent une organisation cytoarchitecturale et morphologique. En effet, alors que les neurones TH+/Girk2+ à corps cellulaire large et angulaire ont été retrouvés principalement à la périphérie du greffon, les neurones TH+/calbindine+, rond et plus petit sont majoritairement retrouvés au centre (Thompson *et al*., 2005 ; Grealish *et al*., 2010 ; Bye *et al*., 2012). Nous pouvons suggérer que la distribution des neurones dopaminergiques transplantés en neurones de type substance noire ou de la VTA, serait régie par un gradient de

concentration de facteurs trophiques émis par l'hôte. Plus précisément, la proximité des neurones greffés avec le tissu hôte favoriserait une différenciation en neurones dopaminergiques de type substance noire. Au contraire, les neurones dopaminergiques au centre du transplant, distant de ces facteurs trophiques, se différencieraient en neurones dopaminergiques de la VTA. En parallèle, il est également possible d'imaginer l'existence d'un gradient de concentration de facteurs issus du greffon induisant au centre, une différenciation des neurones dopaminergiques en neurones de la VTA et à distance de ces facteurs une différenciation en neurones dopaminergiques de type substance noire.

Étude comportementale

En complément de l'étude neuroanatomique, nous avons par le biais d'une évaluation comportementale approfondie, fournis une comparaison détaillée de l'influence de la localisation du transplant, soit en intranigrale soit en intrastriatale, sur l'altération des fonctions motrices suite à la lésion ainsi que sur la récupération de ces fonctions après transplantation. Pour cette étude comportementale, nous avons utilisé un grand nombre de tests comportementaux qui, de par leurs spécificités permettent une caractérisation à la fois globale et fine des déficits moteurs.

Nous allons aborder la discussion de cette étude comportementale en différents points. Dans un premier temps, nous nous attacherons brièvement à discuter l'effet de la lésion sur les performances motrices des animaux, puis nous détaillerons dans différentes sous-partie l'impact de la transplantation intranigrale et/ou intrastriatale sur la restauration de la motricité. Enfin dans une dernière partie, nous discuterons des résultats ne mentionnant aucune récupération motrice malgré la transplantation.

Effets de la lésion sur les performances motrices, puissance et spécificité des tests comportementaux

La présence de déficits moteurs engendrés par la lésion unilatérale à la 6-OHDA a été vérifiée tout au long de l'étude comportementale au travers des performances motrices mesurées chez le groupe lésé en comparaison du groupe contrôle, ainsi que par les mesures établies avant la chirurgie. Au regard de nos résultats et en s'appuyant sur les données de la

littérature, il a été indispensable de valider la puissance et la spécificité de chacun des tests comportementaux. Nous avons de ce fait pu mettre en évidence un effet de la lésion 6-OHDA, pour une majeure partie des tests comportementaux (test de rotations induites par apomorphine, test du cylindre, test de la poutre, test de l'escalier et analyse du mouvement de préhension de nourriture), et ceci tout au long de l'étude. Bien qu'un déficit moteur ait été observé chez les souris lésées dans le test de la descente de tige 3 semaines après transplantation à la fois pour la mesure du temps de retournement (T-Turn) comme pour celui de la descente totale de la tige (T-Total), aucune différence significative n'a été retrouvée pour le T-Turn 7 semaines post-transplantation. De même, le test de l'analyse de la marche n'a pas montré sa validité dans notre étude. Enfin, nous allons développer dans cette partie les résultats obtenus par le biais du test du cylindre qui ne nous semblent pas conformes à ceux obtenus dans la littérature.

Test de la descente de tige

Le test de la descente de tige permettant d'évaluer l'équilibre et la coordination motrice a révélé, 3 semaines après la transplantation, un déficit moteur chez le groupe lésé à la fois pour le temps de retournement (T-Turn) et le temps de descente de la tige (T-Total). En dépit de l'observation de ces déficits chez les souris lésées, 7 semaines après la transplantation dans l'analyse du T-Total, aucune différence significative dans le T-Turn n'a été retrouvée entre les différents groupes. Il nous semble possible de penser que la phase d'habituation effectuée pour ce test a sans doute été trop intensive au départ menant ce surentrainement à une augmentation de la capacité de récupération motrice des animaux. Comme il a été reporté dans plusieurs études, un entrainement trop important des animaux pendant la phase d'habituation peut induire une récupération des performances motrices sur le test entrainé (Johansson et Ohlsson, 1996 ; Döbrössy et Dunnett, 2003). Nous pouvons également supposer que la répétition de ce test ait pu réduire le temps nécessaire au retournement de l'animal témoignant d'une restauration partielle observée chez ce groupe lésé. Toutefois, bien qu'aucune différence significative n'ait été retrouvée dans le T-Turn, 7 semaines après la transplantation, cette réduction du temps nécessaire au retournement chez les souris lésées reste limitée avec des valeurs en moyenne 2 fois supérieures à celles établies en amont de la lésion.

Analyse de la marche

En raison des difficultés de locomotion fortement marquée chez les patients Parkinsonien, nous nous sommes attachés à analyser la marche spontanée de l'animal sur l'ensemble des groupes.

Durant l'analyse de ce test, nous nous sommes heurtés à la variabilité de la vitesse de passage des différents animaux. En effet, à l'inverse des études réalisées sur tapis roulant, les animaux doivent ici avancer de façon volontaire et spontanée, faisant de la vitesse de déplacement un paramètre non contrôlable par l'expérimentateur. De plus, ces animaux doivent marcher de façon régulière (sans arrêt, sans demi-tours), sur une distance suffisante pour permettre l'analyse. Ainsi, l'obtention d'une série de trois passages requiert en réalité une multitude d'essais et les valeurs de vitesse d'un même animal peuvent aller du simple au double. Ces modifications de vitesse de déplacement engendrent alors des variations dans les paramètres de locomotion (Clarke *et al.*, 1991) et augmentent les variabilités entre les individus, limitant ainsi les potentiels effets détectables. De plus, chez le groupe contrôle, nous constatons une diminution non significative mais toutefois notable des vitesses de déplacements aux cours des trois sessions (baseline, $4^{ème}$ et $9^{ème}$ semaines post-transplantation). A la vue de ces informations, il est difficile de conclure quant aux effets des transplantations intrastriatales ou intranigrales fournis par ce test.

Malgré la correction effectuée lors de l'analyse statistique en plaçant la vitesse en covariance pour nous affranchir de son effet, aucune différence entre les groupes ni amélioration des performances motrices au cours du temps n'ont été révélée. Bien que non représentée dans ce manuscrit, nous avons également effectué l'analyse de chaque paramètre de locomotion en i) comparant les paramètres droits et gauches afin de nous affranchir de la vitesse ii) discriminant les animaux lents et rapides iii) ne sélectionnant que le premier passage afin de diminuer la variabilité de chaque individu. Aucune des comparaisons effectuées n'a révélé de différences entre les groupes.

Les conclusions révélées par ce test ne peuvent être prises en compte dans notre analyse principalement dues aux fortes variabilités de vitesse de déplacement de l'ensemble des animaux lors des différents passages. Ces variations de vitesse, notamment la course rapide observée en début d'expérience, pouvant être le reflet du stress des animaux, pourraient être corrigées par une habituation plus importante des souris en amont de la lésion.

Test du cylindre

Lors de la mesure de l'asymétrie des pattes avant évaluée par le test du cylindre, un déficit controlatéral présent 3 semaines après la transplantation s'est révélé également très marqué pour l'ensemble des groupes lésé et transplantés 10 semaines après la transplantation. Bien qu'aucune différence significative ne soit retrouvée entre le groupe contrôle et le groupe transplanté en intranigral, suggérant une amélioration de l'asymétrie des pattes avant pour ce groupe, nous gardons à l'esprit que cette augmentation n'est que de faible amplitude.

Il peut être envisagé que la transplantation intranigrale de même que intrastriatale ne permettent pas une restauration complète de l'asymétrie des pattes avant. Nous noterons que peu de travaux utilisent ce test dans le cas de transplantation intranigrale ou intrastriatale chez le rongeur avec dans la majorité des cas, une récupération seulement partielle des performances motrices (Kirik *et al*., 2001 ; Cordeiro *et al*., 2010 ; Grealish *et al*., 2010 ; Rumpel *et al*., 2015). Les résultats de notre étude, en contradiction avec ceux de la littérature, peuvent être expliqués par plusieurs facteurs : nous comptabilisons un score minimal de contacts à effectuer pour valider la session (20 contacts minimum), certaines études ne comptabilisent que les 20 premiers contacts (Kirik *et al*., 2001 ; Grealish *et al*., 2010), ne le mentionne pas (Iancu *et al*., 2005 ; Cordeiro *et al*., 2010) ou ne le prennent pas en considération (Lundblad *et al*., 2005 ; Francardo *et al*., 2011). Il apparait qu'un trop faible nombre de contacts pourrait ne pas être représentatif d'un échantillon plus large. Nous pouvons à ce moment nous questionner sur le choix des 20 contacts minimums (Smith et Heuer, 2011) de notre étude, potentiellement trop faible et pouvant limiter l'observation des déficits moteurs. De plus, la durée de la session (3 min) choisie pour ce test (Fleming *et al*., 2004 ; Iancu *et al*., 2005 ; Francardo *et al*., 2011) peut ne pas être suffisante dans notre modèle et réduit la mesure possible du nombre de contacts. Il aurait été préférable d'utiliser un temps de session plus long (4 ou 5 min), permettant un plus grand nombre de contacts pour obtenir une meilleur représentativité de l'asymétrie des pattes avant (Cordeiro *et al*., 2010 ; Garcia *et al*., 2011). De ce fait, nous devons rester prudents face aux résultats de ce test dans notre étude et nous ne pouvons pas, sur la base de ces données, conclure quant aux effets des transplantations intranigrale ou intrastriatale sur la restauration des performances motrices.

Les transplantations intranigrale et intrastriatale permettent toutes deux une récupération motrice de mouvements non complexes

Dans cette étude comportementale, nous avons mis en évidence que les deux conditions de transplantations, intranigrale et intrastriatale permettent d'obtenir une restauration des performances motrices révélées par les tests nécessitant les mouvements les moins complexes (rotations induites par apomorphine, test de la descente de tige).

L'apomorphine est un agoniste des récepteurs dopaminergiques agissant à la fois sur les récepteurs D1 et D2 principalement localisé sur les NEM du striatum. A la suite d'une lésion dopaminergique, les récepteurs présents dans le striatum lésé sont « hypersensibilisés » afin de compenser la diminution des taux de dopamine au niveau du striatum (Ungerstedt et Arbuthnott, 1970 ; Ungerstedt, 1971). En conséquence, lors de l'ajout d'un agoniste dopaminergique, c'est le coté lésé (ipsilatéral) qui est préférentiellement activé. L'activation des récepteurs DA du striatum lésé entraine une rotation des animaux dans le sens controlatéral au coté de la lésion. Ainsi, 3 semaines après la lésion ces comportements de rotations ont été observés chez tous les animaux lésés. 13 semaines après la transplantation il a été révélé que chez les animaux transplantés en intranigral comme en intrastriatal, les comportements rotatoires ont été réduits de plus de 55% alors qu'aucune amélioration n'a été observée chez les souris lésées uniquement. Ces résultats sont parfaitement en accord avec ceux observés dans de précédentes études chez le rongeur à la fois dans le cas de la transplantation intrastriatale (Dunnett *et al*., 1981 ; Goren *et al*., 2005 ; Torres *et al*., 2008 ; Cordeiro *et al*., 2010) ou de la transplantation intranigrale (Nikkhah *et al*., 1994 ; Goren *et al*., 2005 ; Gaillard *et al*., 2009).

L'étude corrélative n'a pas permis de mettre en avant de lien entre le nombre de rotations controlatérales induites par l'apomorphine et le nombre de neurones DA retrouvés dans les transplants intranigraux et intrastriataux. A notre connaissance, il n'existe aucune étude montrant chez la souris, une corrélation entre le nombre de rotations induites par apomorphine et le nombre de neurones dopaminergiques présent au niveau des transplants. De plus, les résultats des travaux présents dans la littérature à ce sujet sont assez controversés. A titre d'exemple, alors que certaines études évoquent l'existence d'une corrélation entre le nombre de rotations induites par l'amphétamine et le nombre de neurones TH présents dans les transplants intranigraux (Nikkhah *et al*., 1994 ; Brecknell *et al*., 1996), d'autres travaux ne font état d'aucune corrélation (Fricker *et al*., 2012). Il semblerait que l'analyse d'une

corrélation entre le nombre de neurones TH+ dans le transplant et le nombre rotations nécessite la prise en compte de plusieurs facteurs dont : i) le site de lésion et de ce fait, le nombre de neurones DA lésés chez l'hôte ii) le site de transplantation iii) la drogue utilisée induisant la rotation ainsi que la dose utilisée iv) la composition du greffon en neurones dopaminergiques et plus spécifiquement ceux du type A9 (Dunnett *et al*., 1988 ; Brecknell *et al*., 1996 ; Annett *et al*., 1997 ; Anaya-Martinez *et al*., 2000 ; O'Keeffe *et al*., 2008 ; Grealish *et al*., 2010 ; Bagga *et al*., 2015). Dans notre étude, sur l'ensemble des animaux présentant une réduction de rotations, le plus faible nombre de neurones retrouvé dans le transplant est estimé à environ 170. En admettant que dans notre étude, le seuil minimal du nombre de neurones DA permettant la restauration des rotations soit atteint, il est alors compréhensible de ne retrouver aucune corrélation. Cette hypothèse est soutenue par une étude réalisée chez le rat, montrant une diminution des rotations chez des animaux présentant un minimum de 120 neurones TH+ au sein du transplant intrastriatal (Brundin *et al*., 1985).

Par la suite, nous avons évalué les déficits moteurs et d'équilibre sur l'ensemble des quatre groupes par le biais du test de la descente de tige. Nous avons montré que 3 semaines après la transplantation, les souris transplantées en intrastriatal comme en intranigral présentaient une amélioration de leurs fonctions motrices (T-Turn). De même, en ce qui concerne le temps total de descente de la tige (T-Total), nous avons constaté une amélioration des performances motrices pour les souris transplantées dans la SN et une tendance de cette récupération pour les souris transplantées dans le striatum. Ces résultats suggèrent que les transplantations intranigrale et intrastriatale permettent, dès la 3ème semaine post-transplantation, une restauration des performances motrices. Gaillard et ses collaborateurs ont mis en évidence au niveau du striatum, la présence des axones issus de neurones DA greffés dans la SN, 9 jours après la transplantation (Gaillard *et al*., 2009). Malgré tout, il n'existe à notre connaissance aucune étude comparable mentionnant chez la souris, l'analyse d'une récupération motrice dans le test de la descente de tige, 3 semaines après transplantation intranigrale ou intrastriatale. De ce fait, la discussion de nos résultats ne peut être qu'uniquement basée sur la mesure de performances effectuées par d'autres tests comportementaux. En outre, la potentielle induction d'une récupération motrice 3 semaines après transplantation reste très controversée. Alors que certaines études mentionnent chez le rat, une réduction du nombre de rotations suite à l'injection d'amphétamine 2 ou 4 semaines après transplantation intrastriatale (Nikkhah *et al*., 1993 ; Mukhida *et al*., 2001 ; Cordeiro *et al*., 2010), la plupart des travaux ne montrent aucune récupération fonctionnelle en amont de 3 semaines (Dunnett *et al*.,

1988 ; Winkler *et al*., 1999 ; Döbrössy et Dunnett, 2003). Enfin, l'existence d'une relation entre le nombre de neurones dopaminergiques dans le transplant et le délai de restauration des performances motrices est envisageable (Castilho *et al*., 2000). Dans cette étude, l'auteur mentionne que les animaux présentant un large greffon restauraient leurs performances motrices dès 2 semaines après transplantation contre 5 à 6 semaines pour ceux dévoilant un greffon plus petit. Il est possible de penser que le nombre de neurones dopaminergiques présent dans les greffons intranigraux et intrastriataux dans le cas de notre étude soit suffisant pour induire une restauration des performances motrices sur un test peu complexe comme celui de la descente de tige.

Enfin nous avons montré que les deux types de transplantation intranigrale et intrastriatale étaient capables de restaurer les temps nécessaires à la réalisation du mouvement de contact à partir de 6 semaines post-transplantation. Cette analyse fine de la réalisation du mouvement a montré que les souris transplantées dans le striatum ou dans la SN nécessitaient un temps moins important pour effectuer un mouvement de préhension de nourriture que les lésées. Nous pouvons face à ces résultats envisager que les deux types de transplantations sont capables, de par l'émergence des projections des neurones dopaminergiques émanant des transplants, de rétablir des niveaux de dopamine suffisants pour la restauration des performances motrices sur ce test (Freund *et al*., 1985 ; Doucet *et al*., 1990 ; Björklund *et al*., 1992 ; Wictorin *et al*., 1992 ; Herman et Abrous, 1994 ; Winkler *et al*., 2000). Cependant, nous avons également noté que la restauration des performances motrices du groupe transplanté en intrastriatal n'était que partielle en comparaison de celle du groupe transplanté en intranigral. Bien que la transplantation intrastriatale, de par sa position ectopique directement située dans la région cible, permette une restauration des performances motrices (Bjorklund et Stenevi, 1979 ; Dunnett *et al*., 1987 ; Abrous *et al*., 1993 ; Nikkhah *et al*., 1993), elle ne semble pas suffisante pour une restauration complète du temps nécessaire au mouvement de contact. D'autres travaux sont en accord avec ces résultats en suggérant que la transplantation intrastriatale était capable de restaurer les comportements de rotations mais ne permettait pas une restauration des performances lors des tests plus complexes (Hargus *et al.,* 2010 ; Dunnett *et al*., 1987 ; Abrous *et al*., 1993). En outre, il a également été mentionné la nécessité d'une importante ré-innervation striatale pour induire une récupération motrice plus complexe (Nikkhah *et al*., 1993 ; Olsson *et al*., 1995 ; Lindvall *et al*., 1997 ; Winkler *et al*., 1999). Enfin, la position ectopique du transplant ne permet pas, à l'inverse de la transplantation intranigrale, une reconstruction de la voie nigro-striée et par conséquent une

normalisation de l'activité des ganglions de la base (Dunnett *et al*., 1989 ; Gaillard *et al*., 2009 ; Thompson *et al*., 2009 ; Grealish *et al*., 2014). Elle exclu également le greffon des afférences et facteurs appropriées disponibles pour les neurones dopaminergiques localisés au niveau de la SNpc (Bjorklund et Lindvall, 2000).

Seule la transplantation intranigrale permet une récupération motrice des mouvements complexes

Au cours de cette étude comportementale nous avons également mesuré les performances motrices des animaux à l'aide de tests plus complexes (test de la poutre modifié, test de l'escalier, analyse du mouvement de préhension de nourriture). De façon très intéressante nous avons montré que sur l'ensemble de ces tests, les animaux transplantés en intranigral et non ceux transplantés en intrastriatal présentaient une restauration de leurs performances motrices à partir de 6 semaines post-transplantation. Les conclusions des travaux retrouvés dans la littérature mentionnant l'étude de la récupération fonctionnelle suite à la transplantation intranigrale et/ou intrastriatale sont assez variables. Tandis que certains travaux font état de restaurations partielles des comportements de rotations chez le rongeur, après transplantation intranigrale (Nikkhah *et al*., 1994 ; Yurek *et al*., 1997 ; Gaillard *et al*., 2009 ; Thompson *et al*., 2009), d'autres ne montrent que de faibles (Olsson *et al*., 1995 ; Nikkhah *et al*., 1995 ; Winkler *et al*., 1999 ; Mukhida *et al*., 2001), voir aucune (Mendez *et al.,* 1996 ; Baker *et al*., 2000) améliorations sur des tests plus complexes. En parallèle, dans le cas de transplantations intrastriatales, il apparait que de nombreux travaux se rejoignent à l'idée que ce type de transplantation permet une amélioration notable des performances motrices sur l'ensemble des tests simples (Bjorklund *et al.,* 1979 ; Doucet *et al*., 1989 ; Nikkhah *et al*., 1993 ; Mendez *et al*., 1996 ; Mukhida *et al.,* 2001) mais peu ou pas pour des tests plus complexes (Dunnett *et al*., 1987 ; Mandel *et al*., 1990 ; Abrous *et al*., 1993 ; Winkler *et al.,* 1999 ; Johnston et Becker, 1999 ; Mukhida *et al*., 2001 ; Hargus *et al*., 2010).

Il apparait donc, à la fois par les différents travaux retrouvés dans la littérature, comme par les résultats de notre études que la transplantation intrastriatale, ne parvient pas à restaurer complètement les performances motrices évaluées par des tests complexes. Il est envisageable de penser que ce manque d'efficacité serait le reflet d'une innervation incomplète des circuits dopaminergiques des ganglions de la base dans le cas de greffe intrastriatale (Doucet *et al*.,

1990 ; Nikkhah *et al*., 1993 ; Mehta *et al*., 1997 ; Johnston et Becker, 1999 ; Baker *et al*., 2000). Plus particulièrement, ces hypothèses ont suggéré que les greffons placés en position ectopique ne permettent pas de moduler l'activité des cytochromes oxydases au niveau du GP et du NST, ni de normaliser l'activation de c-Fos dans le NST (Nakao *et al*., 1998). De plus, la SNpr ne peut pas réguler l'activité des neurones dopaminergiques dans le cas de greffes intrastriatales (Winkler *et al*., 2000). Enfin, nous mentionnerons le microenvironnement défavorable privant le greffon des facteurs trophiques nécessaires appropriés (GDNF) pour une bonne intégration des neurones dopaminergiques greffés (Mendez *et al*., 2008 ; Li *et al*., 2008 ; Brundin *et al*., 2008). En conditions physiologiques, la SN, au même titre que la VTA, reçoivent les entrées d'afférences provenant de multiples origines dont le striatum ventral et dorsal, le cortex préfrontal, le NAc, l'hypothalamus, la partie dorsale du noyau du raphé ou le NST. Parmi ces structures, le striatum, le NAc et le noyau du raphé établissent des contacts synaptiques directement avec les neurones dopaminergiques. De ce fait, de par la position ectopique du greffon, les neurones dopaminergiques transplantés sont inaccessibles à certaines des afférences précédemment décrites, résultant en une libération de dopamine non contrôlée au cours du mouvement (Freund *et al*., 1985 ; Doucet *et al*., 1989).

En revanche, la transplantation intranigrale, de par sa position homotypique au niveau de la SN, permet l'établissement de contacts appropriés. Plus précisément, en condition physiologique, la DA peut-être libérée par les projections des neurones dopaminergiques au niveau du striatum mais également par les dendrites de ces neurones, au niveau de la SNpr (Robertson *et al*., 1991). La DA libérée au niveau du striatum peut alors se fixer i) au niveau des récepteurs D1 et D2 localisés sur les neurones de projections GABAergic. De plus, les greffes intranigrales pourraient permettre d'établir un motif de libération de dopamine plus physiologique, contrôlée par leurs entrées afférentes adéquates (striatum, NAc et noyau du raphé) à l'inverse des greffes intrastriatales (Bjorklund *et al*., 2003 ; Isacson *et al*., 2003). Cette ré-innervation spécifique et plus complète des ganglions de la base, semble être nécessaire pour observer une récupération fonctionnelle complète sur des tests plus complexes (Björklund *et al*., 1994 ; Lindvall *et al*., 1997).

L'injection unique de L-DOPA permet une restauration des performances motrices

La L-DOPA, précurseur direct de la DA, est l'un des traitements de référence réduisant considérablement les symptômes des patients Parkinsoniens. Nous avons évalué l'effet d'une injection unique de L-DOPA sur les performances motrices des animaux 16 semaines après transplantation. Le choix d'une injection unique a été nécessaire principalement en raison de l'induction, engendrée par une administration chronique de L-DOPA, d'une plasticité synaptique de la voie cortico-striatale, en particulier d'une potentialisation à long terme, et modifiant de ce fait les conditions de l'étude électrophysiologique ultérieure (Winkler *et al*., 2002 ; Picconi *et al.*, 2003 ; Cenci et Lundblad, 2006). La dose sélectionnée (10mg/kg) a été quant a elle choisie pour assurer une réponse et potentiellement rétablir les performances motrices (Picconi *et al*., 2003 ; Lundblad *et al*., 2004 ; Picconi *et al*., 2008). La mesure des performances de prise de boulette de nourriture sans injection de L-DOPA 16 semaines après transplantation, a révélé de façon très intéressante, un profil de résultats similaires à celui obtenu lors des semaines 6 à 8 post-transplantation. Ces résultats montrent i) que chez les souris lésées, le déficit de préhension de nourriture est toujours présent sur le long terme ii) que l'amélioration fonctionnelle observée chez les souris transplantées en intranigrale entre les semaines 6 à 8 post-transplantation se maintient dans le temps. Cependant, des différences entre le groupe contrôle *versus* intrastriatal de même qu'entre le groupe intranigral *versus* intrastriatal se sont révélées non significatives. Nous devons rappeler que sur ce test, les mesures d'une seule session sont représentées, expliquant que les différences observées ne soient pas significatives. L'injection de L-DOPA chez le groupe transplanté en intranigral, n'a pas modifié les performances de préhension de nourriture. De plus, après injection unique de L-DOPA, les performances motrices entre les différents groupes ne sont plus significativement différentes. Ces résultats sont en accord avec les nombreux travaux mentionnant un renversement des déficits moteurs après traitement à la L-DOPA (Winkler *et al*., 2002 ; Lundblad *et al*., 2004). La dose administrée semble suffisante pour augmenter la préhension de nourriture chez les souris lésées et transplantées dans le striatum. En approfondissant l'étude de la préhension de nourriture par la mesure de la longueur des trajectoires, il a été noté que 16 semaines après la transplantation, l'injection de L-DOPA n'a permis de restaurer le déficit moteur que chez les souris transplantées en intrastriatal mais n'a pas modifié les capacités motrices des souris lésées. Il apparait alors chez les souris lésées, que la dose de L-DOPA administrée serait

suffisante pour une préhension correcte des boulettes de nourriture mais pas assez pour le contrôle et la régulation de ce mouvement. En revanche, chez les souris transplantées dans le striatum, il est possible de penser que la dose de L-DOPA, combinée aux effets de la greffe, permettrait dans ce cas une restauration et un contrôle des performances motrices.

Conclusion de l'étude comportementale

La caractérisation par le bais de tests comportementaux, des bénéfices fonctionnels de la transplantation intranigrale ou intrastriatale de MV fœtal chez le rongeur lésé unilatéralement à la 6-OHDA a fait l'objet de plusieurs travaux. Toutefois, ces études se sont pour la plupart, limitées à l'analyse de comportements induits par les drogues ou de mouvements non complexes.

Malgré un intérêt croissant de la communauté scientifique pour la transplantation de neurones immatures comme stratégie thérapeutique de la MP, aucune étude n'a à l'heure actuelle, réalisée de comparaison précise de ces deux types de transplantation en vue de déterminer un éventuel bénéfice de la greffe intrastriatale et/ou intranigrale sur les performances motrices et en particulier, sur l'évaluation des mouvements fins.

Cette étude a permis de mettre en évidence par un ensemble de tests comportementaux que les transplantations intranigrale et intrastriatale permettaient la restauration des performances motrices sur des tests ayant recours à des mouvements simples. Toutefois, l'analyse approfondie et la décomposition des mouvements plus complexes ont révélé que seule les souris transplantées dans la substance noire retrouvaient leurs performances motrices basales. Il est évident que la position ectopique du transplant, isolant les neurones dopaminergiques du greffon de l'ensemble des afférences régulant de façon spécifique la libération de dopamine, soit l'explication la plus plausible au regard de ces résultats. Une proposition des principaux mécanismes d'action des greffes intranigrale ou intrastriatale chez la souris lésée à la 6-OHDA est représentée Figure 65.

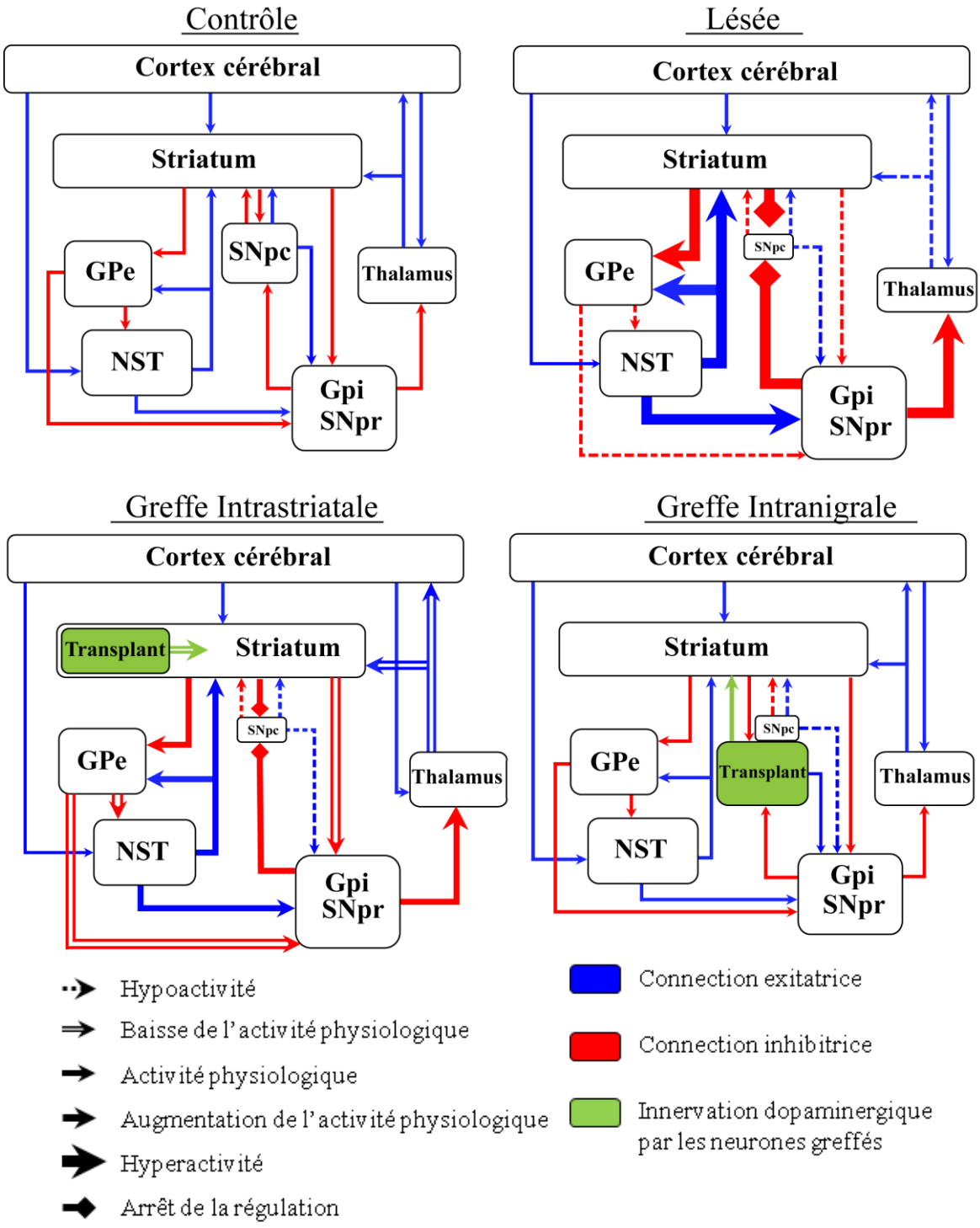


Figure 65 : Mécanismes d'action proposés suite à la greffe intrastriatale *versus* intranigrale de MV fœtal chez la souris hémi-Parkinsonienne. Représentation des principales structures composant les ganglions de la base. Les connexions excitatrices sont en bleu, inhibitrices en rouge. Les cadres jaunes représentent les structures d'entrées des ganglions de la base, le cadre vert la structure de sortie, le cadre gris le transplant. Les variations d'activité neuronale induites par la lésion à la 6-OHDA sont représentées sous la

forme de traits pointillés (en cas d'hypoactivité) ou d'épaississement du trait (en cas d'hyperactivité). Après transplantation intrastriatale, la position ectopique du transplant ne permet de restaurer que partiellement l'activité neuronale des ganglions de la base. En revanche, dans le cas de transplantation intranigrale, la position homotypique du greffon permet aux neurones dopaminergiques transplantés d'être régulés de façon spécifique (notamment par les afférences de la SNpr, ou du striatum) entrainant une activité neuronale proche des niveaux physiologiques. GPe / GPi : Globus pallidum externe/interne ; NST : Noyau sous-thalamique ; SNpc : Substance noire *pars compacta* ; SNpr : Substance noire *pars reticulata*.

De plus, nous avons révélé que l'injection de L-DOPA rétablissait les performances motrices des animaux présentant un déficit 16 semaines après la transplantation sur le test de préhension de nourriture. Toutefois, bien que cette dose de L-DOPA ait été suffisante pour induire une restauration de l'établissement et le contrôle de mouvements fins chez les animaux transplantés en intrastriatal, elle n'a montré aucune amélioration du mouvement chez les lésées. Ces données renforcent notre hypothèse de départ indiquant que la transplantation intrastriatale permet d'élever les niveaux de dopamine aboutissant à une restauration partielle des performances motrices simples ou induites par les drogues. Néanmoins, la libération de DA ne semble pas assez bien régulée pour induire une restauration des mouvements complexes et un contrôle du mouvement de préhension.

Étude électrophysiologique

L'étude électrophysiologique a été réalisée à la suite de l'étude comportementale dans le but de comparer les bénéfices apportés par la greffe intrastriatale en comparaison de ceux apportés par la greffe intranigrale. Dans cette étude, nous nous sommes attachés à caractériser l'activité des neurones épineux de tailles moyennes du striatum portant les récepteurs dopaminergiques sur l'ensemble de nos groupes. En outre nous avons étudié l'activité spontanée de ces neurones, leur fréquence de décharge ainsi que l'efficacité de la transmission cortico-striatale.

Malgré la présence, chez les neurones striataux, de nombreuses caractéristiques anatomiques et électrophysiologiques (présence d'épines dendritiques, durée du potentiel d'action, ou réponse à la stimulation corticale) permettant la sélection des neurones épineux de taille moyenne, bon nombre de ces caractéristiques sont altérées suite à une dénervation dopaminergiques (Wilson *et al*., 1990 ; Mallet *et al*., 2006 ; Sharott *et al*., 2012). De ce fait, la durée du potentiel d'action, caractéristique invariable dans nos conditions expérimentales, a été utilisée comme critère de sélection des NEM. De plus, bien que la dégénérescence de la voie nigro-striée affecte de façon spécifique les NEM de la voie directe exprimant le récepteur D1 en comparaison des NEM de la voie indirecte exprimant le récepteur D2, la distinction entre ces deux types de neurones n'a pas pu être réalisée dans cette étude. Les résultats présentés sont donc la mesure globale de l'activité des NEM. Il est d'ores et déjà possible de discuter de la nécessité de cette classification des NEM par des techniques d'identification anatomique (marquage à la neurobiotine) ou électrophysiologique (par stimulation antidromique de la SNpr) en vue d'affiner les résultats présentés.

Cette étude montre dans un premier temps, une augmentation de la proportion de neurones épineux de taille moyenne spontanément actifs chez les souris lésées en comparaison des souris contrôles. Ces résultats sont en accord avec des travaux antérieurs, réalisés chez le chat (Hull *et al*., 1974) ou le rat (Di Loreto *et al*., 1996 ; Tseng *et al*., 2001). De plus, la fréquence de décharge des NEM est significativement augmentée par la dénervation dopaminergique. Malgré l'impossibilité de classifier les NEM entre les différentes voies, il a été suggéré dans quelques études réalisées chez le rat que la fréquence de décharge des neurones striato-nigraux était abaissée après dénervation dopaminergique du striatum tandis qu'au contraire, la fréquence de décharge des neurones striato-pallidaux était augmentée dans ces mêmes conditions (Mallet *et al*., 2006). En revanche, à la fois dans les conditions de transplantations intranigrale et intrastriatale, l'analyse des propriétés électrophysiologiques des NEM a révélé une réduction du nombre de neurones spontanément actifs. De même, les transplants dans les deux localisations semblent restaurer la fréquence de décharge des neurones du striatum. Bien qu'aucune étude n'ait analysé les propriétés électrophysiologiques des NEM après greffes intranigrales chez la souris permettant la comparaison de nos résultats, quelques travaux ont constaté un rétablissement du pourcentage de neurones actifs à des valeurs basales ainsi qu'une diminution de la fréquence de décharge des NEM après transplantation intrastriatale (Hudson *et al*., 1994 ; Stromberg *et al*., 1985 ; Fisher *et al*., 1991 ; Di Loreto *et al*., 1996). De plus, il a été mis en évidence que la

restauration de l'activité des NEM suite à la transplantation intrastriatale était seulement partielle et restreinte à l'aire ré-innervée par le greffon (Di Loreto *et al*., 1996). Nos résultats indiquent tout de même qu'une greffe placée en position homotypique semble en mesure, au même titre que la greffe intrastriatale de restaurer l'activité des NEM. Toutefois, aucune différence n'a pu être détectée entre le groupe lésé et respectivement les groupes transplantés en intranigral ou intrastriatal. Comme mentionné précédemment la distinction des deux types de NEM (striato-nigraux ; striato-pallidaux) et l'augmentation de l'effectif de cette étude permettrait d'affiner ces résultats.

Enfin, la mesure de l'efficacité de la transmission cortico-striatale a révélé chez les souris lésées, une augmentation significative du courant de stimulation nécessaire à l'obtention d'un potentiel d'action dans 50% des cas en comparaison des souris contrôles. En accord avec nos résultats, Mallet et ses collaborateurs ont indiqué que l'efficacité de la transmission cortico-striatale des neurones striato-nigraux diminuait à la suite d'une dénervation dopaminergique (Mallet *et al*., 2006). En complément de ces résultats, nos travaux ont également permis de mettre en évidence une augmentation significative de l'efficacité de la transmission cortico-striatale après transplantation intranigrale en comparaison des animaux lésés. De façon intéressante, nous n'avons noté aucune restauration de l'efficacité de transmission cortico-striatale chez les souris transplantés dans le striatum en comparaison des souris lésées. Ces résultats suggèrent que la greffe intranigrale permet une récupération fonctionnelle plus importante des NEM. Par ailleurs, nous noterons parmi ce groupe intrastriatal une grande variabilité entre les individus. Nous pouvons, à la suite de cette observation, mettre en avant l'étude de Di Loreto et ses collaborateurs montrant qu'après la greffe intrastriatale de neurones dopaminergiques, la restauration des paramètres électrophysiologiques mesurés, et en particulier l'activité de décharge des NEM, n'était effective que dans un rayon confiné, proche du transplant (Di Loreto *et al*., 1996). De plus, la position ectopique du greffon, prive les neurones dopaminergiques transplantés d'une régulation optimale réalisée par les afférences de l'hôte. L'incapacité de restauration de l'efficacité de transmission cortico-striatale chez les souris transplantées en intrastriatal serait le reflet de l'absence de la gamme complète d'afférences ne pouvant s'établir avec le greffon en position ectopique.

Toutefois, il est nécessaire d'augmenter l'effectif de chaque groupe afin de confirmer ou d'infirmer le rétablissement suggéré dans cette étude.

Conclusion de l'étude électrophysiologique

L'ensemble des résultats présentés dans cette étude avait pour objectif de caractériser les bénéfices ou non de la greffe de MV fœtal transplanté soit au niveau de la SN, soit au niveau du striatum dans un model animal de la MP. Dans cette étude électrophysiologique, trois paramètres ont présenté des variations entre les groupes: la proportion du nombre de NEM spontanément actifs, la fréquence de décharge de ces NEM ainsi que l'efficacité de la transmission cortico-striatale. Il a d'abord été confirmé que l'altération de l'ensemble de ces paramètres, en accord avec la littérature, était observée chez le groupe lésé. Plus précisément, la proportion de neurones spontanément actifs et la fréquence de décharge se voient augmentées suite à la dégénérescence dopaminergique. De plus dans ces conditions, nous avons constaté une altération de la transmission cortico-striatale.

La caractérisation des différences entre les greffes intranigrales *versus* intrastriatales de neurones dopaminergiques embryonnaires n'a jamais été réalisée jusqu'à présent. Nous avons démontré que les deux positionnements de transplant permettent de rétablir l'activité des NEM de façon égale. Cependant, l'efficacité de la transmission cortico-striatale n'est rétablie que dans le cas de transplantation homotypique.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La maladie de Parkinson est une pathologie neurodégénérative caractérisée principalement par une perte des neurones dopaminergiques de la substance noire entrainant une chute des niveaux de dopamine dans le striatum. L'un des traitements pharmacologiques actuel limitant des symptômes et améliorant la vie des patients est la L-DOPA. Même si ce traitement apporte une efficacité thérapeutique, ce traitement n'entraine de réels bénéfices qu'à court terme et provoque rapidement l'apparition de dyskinésies (Rascol *et al*., 2000 ; Porras *et al*., 2014). Diverses stratégies thérapeutiques se sont alors développées incluant les transplantations de neurones dopaminergiques fœtaux permettant le remplacement des neurones dopaminergiques de la SNpc perdus. De nombreux travaux se sont attachés à transplanter des neurones dopaminergiques fœtaux issus de mésencéphale ventral directement au niveau du striatum, région cible des neurones dopaminergiques de la SNpc. Chez l'animal comme chez le patient Parkinsonien, les résultats de ces études se sont avérés très contrastés allant d'une faible voir aucune restauration de la motricité (Lindvall *et al*., 1988; Piccini *et al*., 1999 ; Freed *et al*., 2001; Olanow *et al*., 2003 ; Kefalopoulou *et al*., 2014). La raison de cette transplantation ectopique provient d'un dogme longtemps maintenu selon lequel la régénération ou la croissance de neurones transplantés était impossible chez l'adulte. Or les travaux réalisés dans notre laboratoire ont révélé la possibilité chez la souris adulte d'une repousse axonale sur de longues distances après transplantation de tissu embryonnaire cortical (Gaillard *et al*., 2007). Ces résultats ont été transposés au cadre de la maladie de Parkinson via la transplantation de mésencéphale ventrale fœtal dans la SN de souris adultes (Gaillard *et al*., 2009). Une multitude d'études ont par la suite exploré une potentielle restauration des performances motrices à la suite de transplantation intranigrale ou intrastriatale avec des effets variables (Nikkhah *et al*., 1994 ; Thomspon *et al*., 2009 ; Palmer *et al*., 2001 ; Klein *et al.,* 2007 ; Heuer *et al*., 2013 ; Grealish *et al*., 2014). Pourtant, en dépit de ces nombreux travaux, aucune étude n'a comparé spécifiquement les bénéfices des greffes intranigrales *versus* intrastriatales suite à la lésion de la SNpc.

Ce travail de thèse a permis de mettre en avant d'un point de vue anatomique l'intégration et l'extension des prolongements dopaminergiques émanant des transplants. Cependant, seule la transplantation intranigrale a révélé une capacité de reconstruction des voies dopaminergiques lésées. De plus, ces deux types de transplantation ont dévoilé une capacité de restauration à la fois de leurs performances motrices sur certains tests comportementaux (rotations induites par l'apomorphine ou test de descente de tige) ainsi que de l'activité des NEM. Toutefois, dans l'analyse des performances faisant appel à la motricité fine, seule la transplantation

intranigrale a exposé sa supériorité. Pour compléter cette étude, l'analyse de l'activité électrophysiologique a suggéré que ces deux types de transplantation permettaient la restauration de l'activité des NEM, mais que seule la transplantation intranigrale permet de restaurer l'efficacité de la transmission cortico-striatale. Enfin, dans le cadre du traitement de la maladie de Parkinson, l'objectif sous-jacent de ces travaux de thèse, est la validation de la transplantation intranigrale en vue de tester par la suite l'efficacité de nouvelles approches thérapeutiques basée sur l'utilisation de neurones dopaminergiques dérivés de cellules souches ainsi que de cellules souches pluripotentes induites. Les résultats de cette étude montrant la fonctionnalité de la voie nigro-striée restaurée par greffe intranigral du MV sont encourageant, toutefois, chez l'homme, la distance séparant la SN de sa région cible est beaucoup plus importante que chez le rongeur et ces transplantations peuvent nécessiter la combinaison d'autres approches comme les injections de facteurs attractifs au niveau du striatum, ou de molécules de guidages le long de la voie nigro-striée. La surexpression de ces molécules de guidages après la lésion et/ou la lésion suivi de la transplantation permettront d'orienter les projections émanant des transplants vers leur cible finale, le striatum, et d'augmenter la proportion d'axones dopaminergiques cheminant vers le striatum pour ainsi reconstruire la voie nigro-striée.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abercrombie, M. (1946). "Estimation of nuclear population from microtome sections." Anat Rec **94**: 239-47.

Abrous, D. N., M. Manier, *et al*. (1993). "Intrastriatal transplants of embryonic dopaminergic neurons counteract the increase of striatal enkephalin immunostaining but not serotoninergic sprouting elicited by a neonatal lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway." Eur J Neurosci **5**(2): 128-36.

Abrous, D. N., E. M. Torres, *et al*. (1993). "Dopaminergic grafts implanted into the neonatal or adult striatum: comparative effects on rotation and paw reaching deficits induced by subsequent unilateral nigrostriatal lesions in adulthood." Neuroscience **54**(3): 657-68.

Abrous, N., J. Guy, *et al*. (1988). "Development of intracerebral dopaminergic grafts: a combined immunohistochemical and autoradiographic study of its time course and environmental influences." J Comp Neurol **273**(1): 26-41.

AFECT (2011). Médicaments actifs sur le système nerveux central. Paris, Technique Et Documentation.

Aguayo, A. J., A. Bjorklund, *et al*. (1984). "Fetal mesencephalic neurons survive and extend long axons across peripheral nervous system grafts inserted into the adult rat striatum." Neurosci Lett **45**(1): 53-8.

Aime, S., B. Bergamasco, *et al*. (2000). "Isolation and 13C-NMR characterization of an insoluble proteinaceous fraction from substantia nigra of patients with Parkinson's disease." Mov Disord **15**(5): 977-81.

Aizman, O., H. Brismar, *et al*. (2000). "Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons." Nat Neurosci **3**(3): 226-30.

Albin, R. L., A. B. Young, *et al*. (1989). "The functional anatomy of basal ganglia disorders." Trends Neurosci **12**(10): 366-75.

Alexander, G. E. and M. D. Crutcher (1990). "Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing." Trends Neurosci **13**(7): 266-71.

Alexander, G. E., M. R. DeLong, *et al*. (1986). "Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex." Annu Rev Neurosci **9**: 357-81.

Allen, M. T. and L. S. Levy (2013). "Parkinson's disease and pesticide exposure--a new assessment." Crit Rev Toxicol **43**(6): 515-34.

Altman, J. and S. A. Bayer (1981). "Development of the brain stem in the rat. V. Thymidine-radiographic study of the time of origin of neurons in the midbrain tegmentum." J Comp Neurol **198**(4): 677-716.

Alves, G., E. B. Forsaa, *et al*. (2008). "Epidemiology of Parkinson's disease." J Neurol **255 Suppl 5**: 18-32.

Anaya-Martinez, V., E. Montiel-Flores, *et al*. (2000). "Effects of graft placement site on the survival of adrenal medulla transplants into the brain and its relation with the recovery of motor function." Arch Med Res **31**(6): 551-7.

Anden, N. E., A. Carlsson, *et al*. (1964). "Demonstration and Mapping out of Nigro-Neostriatal Dopamine Neurons." Life Sci **3**: 523-30.

Anden, N. E., A. Dahlstrom, *et al*. (1965). "Mapping out of catecholamine and 5-hydroxytryptamine neurons innervating the telencephalon and diencephalon." Life Sci **4**(13): 1275-9.

Anden, N. E., K. Hfuxe, *et al*. (1966). "A quantitative study on the nigro-neostriatal dopamine neuron system in the rat." Acta Physiol Scand **67**(3): 306-12.

Andersen, P. H. and E. B. Nielsen (1986). "The dopamine D1 receptor: biochemical and behavioral aspects." Adv Exp Med Biol **204**: 73-91.

Annett, L. E., F. L. Martel, *et al*. (1994). "Behavioral assessment of the effects of embryonic nigral grafts in marmosets with unilateral 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway." Exp Neurol **125**(2): 228-46.
Annett, L. E., E. M. Torres, *et al*. (1997). "Survival of nigral grafts within the striatum of marmosets with 6-OHDA lesions depends critically on donor embryo age." Cell Transplant **6**(6): 557-69.
Appel, S. H. (2009). "CD4+ T cells mediate cytotoxicity in neurodegenerative diseases." J Clin Invest **119**(1): 13-5.
Ardouin, C., B. Pillon, *et al*. (1999). "Bilateral subthalamic or pallidal stimulation for Parkinson's disease affects neither memory nor executive functions: a consecutive series of 62 patients." Ann Neurol **46**(2): 217-23.
Azim, E., J. Jiang, *et al*. (2014). "Skilled reaching relies on a V2a propriospinal internal copy circuit." Nature **508**(7496): 357-63.
Aziz, T. Z., D. Peggs, *et al*. (1992). "Subthalamic nucleotomy alleviates parkinsonism in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-exposed primate." Br J Neurosurg **6**(6): 575-82.

B

Baba, M., S. Nakajo, *et al*. (1998). "Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies." Am J Pathol **152**(4): 879-84.
Bagga, V., S. B. Dunnett, *et al*. (2015). "The 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease - Terminal striatal lesions provide a superior measure of neuronal loss and replacement than median forebrain bundle lesions." Behav Brain Res **288**: 107-17.
Baird, A. L., A. Meldrum, *et al*. (2001). "The staircase test of skilled reaching in mice." Brain Res Bull **54**(2): 243-50.
Baker, K. A. and I. Mendez (2005). "Long distance selective fiber outgrowth of transplanted hNT neurons in white matter tracts of the adult rat brain." J Comp Neurol **486**(4): 318-30.
Baker, K. A., D. Sadi, *et al*. (2000). "Simultaneous intrastriatal and intranigral dopaminergic grafts in the parkinsonian rat model: role of the intranigral graft." J Comp Neurol **426**(1): 106-16.
Ballanger, B., M. Jahanshahi, *et al*. (2009). "PET functional imaging of deep brain stimulation in movement disorders and psychiatry." J Cereb Blood Flow Metab **29**(11): 1743-54.
Baltazar, M. T., R. J. Dinis-Oliveira, *et al*. (2014). "Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases--a mechanistic approach." Toxicol Lett **230**(2): 85-103.
Barbeau, A., L. Dallaire, *et al*. (1985). "Comparative behavioral, biochemical and pigmentary effects of MPTP, MPP+ and paraquat in Rana pipiens." Life Sci **37**(16): 1529-38.
Barbeau, A., M. Roy, *et al*. (1987). "Ecogenetics of Parkinson's disease: prevalence and environmental aspects in rural areas." Can J Neurol Sci **14**(1): 36-41.
Barbeau, A., M. Roy, *et al*. (1987). "Environmental and genetic factors in the etiology of Parkinson's disease." Adv Neurol **45**: 299-306.
Barbeau, A., M. Roy, *et al*. (1985). "Neurological consequence of industrial exposure to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine." Lancet **1**(8431): 747.

Bartus, R. T., J. H. Kordower, *et al*. (2015). "Post-mortem assessment of the short and long-term effects of the trophic factor neurturin in patients with alpha-synucleinopathies." Neurobiol Dis **78**: 162-71.
Bazelon, M., G. M. Fenichel, *et al*. (1967). "Studies on neuromelanin. I. A melanin system in the human adult brainstem." Neurology **17**(5): 512-9.
Beaulieu, J. M. and R. R. Gainetdinov (2011). "The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors." Pharmacol Rev **63**(1): 182-217.
Beck, K. D., J. Valverde, *et al*. (1995). "Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain." Nature **373**(6512): 339-41.
Behari, M. and K. K. Singhal (2011). "Cell based therapies in Parkinson's Disease." Ann Neurosci **18**(2): 76-83.
Benabid, A. L. (2003). "Deep brain stimulation for Parkinson's disease." Curr Opin Neurobiol **13**(6): 696-706.
Bentlage, C., G. Nikkhah, *et al*. (1999). "Reformation of the nigrostriatal pathway by fetal dopaminergic micrografts into the substantia nigra is critically dependent on the age of the host." Exp Neurol **159**(1): 177-90.
Bergman, H., T. Wichmann, *et al*. (1990). "Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus." Science **249**(4975): 1436-8.
Betarbet, R., T. B. Sherer, *et al*. (2000). "Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease." Nat Neurosci **3**(12): 1301-6.
Bethlem, J. and W. A. Den Hartog Jager (1960). "The incidence and characteristics of Lewy bodies in idiopathic paralysis agitans (Parkinson's disease)." J Neurol Neurosurg Psychiatry **23**: 74-80.
Beyer, K. and A. Ariza (2007). "Protein aggregation mechanisms in synucleinopathies: commonalities and differences." J Neuropathol Exp Neurol **66**(11): 965-74.
Bilang-Bleuel, A., F. Revah, *et al*. (1997). "Intrastriatal injection of an adenoviral vector expressing glial-cell-line-derived neurotrophic factor prevents dopaminergic neuron degeneration and behavioral impairment in a rat model of Parkinson disease." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(16): 8818-23.
Birkmayer, W. and O. Hornykiewicz (1961). "[The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia]." Wien Klin Wochenschr **73**: 787-8.
Bjorklund, A. (1992). "Dopaminergic transplants in experimental parkinsonism: cellular mechanisms of graft-induced functional recovery." Curr Opin Neurobiol **2**(5): 683-9.
Bjorklund, A. (1994). "Long distance axonal growth in the adult central nervous system." J Neurol **242**(1 Suppl 1): S33-5.
Bjorklund, A. and S. B. Dunnett (2007). "Dopamine neuron systems in the brain: an update." Trends Neurosci **30**(5): 194-202.
Bjorklund, A., S. B. Dunnett, *et al*. (2003). "Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease." Lancet Neurol **2**(7): 437-45.
Bjorklund, A. and F. H. Gage (1986). "Transplantation of basal forebrain cholinergic neurons in the aged rat brain." Prog Brain Res **70**: 499-512.
Bjorklund, A. and O. Lindvall, Eds. (1984). Dopamine-containing systmes in the CNS. . Amsterdam, Bjorklund A, Hokfelt T.
Bjorklund, A. and O. Lindvall (2000). "Cell replacement therapies for central nervous system disorders." Nat Neurosci **3**(6): 537-44.
Bjorklund, A., R. H. Schmidt, *et al*. (1980). "Functional reinnervation of the neostriatum in the adult rat by use of intraparenchymal grafting of dissociated cell suspensions from the substantia nigra." Cell Tissue Res **212**(1): 39-45.

Bjorklund, A. and U. Stenevi (1979). "Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants." Brain Res **177**(3): 555-60.
Bjorklund, A., U. Stenevi, *et al*. (1983b). "Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. II. Survival and growth of nigral cell suspensions implanted in different brain sites." Acta Physiol Scand Suppl **522**: 9-18.
Bjorklund, L. M. and O. Isacson (2002). "Regulation of dopamine cell type and transmitter function in fetal and stem cell transplantation for Parkinson's disease." Prog Brain Res **138**: 411-20.
Bjorklund, L. M., R. Sanchez-Pernaute, *et al*. (2002). "Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(4): 2344-9.
Brecknell, J. E., N. S. Haque, *et al*. (1996). "Functional and anatomical reconstruction of the 6-hydroxydopamine lesioned nigrostriatal system of the adult rat." Neuroscience **71**(4): 913-25.
Brundin, P., G. Barbin, *et al*. (1985). "Survival of intracerebrally grafted rat dopamine neurons previously cultured in vitro." Neurosci Lett **61**(1-2): 79-84.
Brundin, P., J. Y. Li, *et al*. (2008). "Research in motion: the enigma of Parkinson's disease pathology spread." Nat Rev Neurosci **9**(10): 741-5.
Bucy, P. a. C., TJ. (1939). "Tremor: physiologic mechanism and abolition by surgical means." Arch Neurol Psychiatry **41**(2): 721-46.
Burns, R. S., P. A. LeWitt, *et al*. (1985). "The clinical syndrome of striatal dopamine deficiency. Parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)." N Engl J Med **312**(22): 1418-21.
Bye, C. R., L. H. Thompson, *et al*. (2012). "Birth dating of midbrain dopamine neurons identifies A9 enriched tissue for transplantation into parkinsonian mice." Exp Neurol **236**(1): 58-68.

C

Carlsson, A., M. Lindqvist, *et al*. (1957). 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. Nature. **180:** 1200.
Carlsson, A., M. Lindqvist, *et al*. (1958). "On the presence of 3-hydroxytyramine in brain." Science **127**(3296): 471.
Carta, M., T. Carlsson, *et al*. (2008). "Involvement of the serotonin system in L-dopa-induced dyskinesias." Parkinsonism Relat Disord **14 Suppl 2**: S154-8.
Carter, R. J., L. A. Lione, *et al*. (1999). "Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation." J Neurosci **19**(8): 3248-57.
Carvey, P. M., D. H. Lin, *et al*. (1996). "Loss of striatal DA innervation increases striatal trophic activity directed at DA neurons in culture." Exp Neurol **140**(2): 184-97.
Castilho, R. F., O. Hansson, *et al*. (2000). "Improving the survival of grafted embryonic dopamine neurons in rodent models of Parkinson's disease." Prog Brain Res **127**: 203-31.
Cenci, M. A. and M. Lundblad (2006). "Post- versus presynaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia." J Neurochem **99**(2): 381-92.

Cenci, M. A. and M. Lundblad (2007). "Ratings of L-DOPA-induced dyskinesia in the unilateral 6-OHDA lesion model of Parkinson's disease in rats and mice." Curr Protoc Neurosci **Chapter 9**: Unit 9 25.
Ciliax, B. J., C. Heilman, *et al*. (1995). "The dopamine transporter: immunochemical characterization and localization in brain." J Neurosci **15**(3 Pt 1): 1714-23.
Clarke, K. A. (1991). "Swing time changes contribute to stride time adjustment in the walking rat." Physiol Behav **50**(6): 1261-2.
Clarke, K. A. and J. Still (1999). "Gait analysis in the mouse." Physiol Behav **66**(5): 723-9.
Cooper, O., A. Astradsson, *et al*. (2009). "Lack of functional relevance of isolated cell damage in transplants of Parkinson's disease patients." J Neurol **256 Suppl 3**: 310-6.
Cordeiro, K. K., W. Jiang, *et al*. (2010). "Graft-mediated functional recovery on a skilled forelimb use paradigm in a rodent model of Parkinson's disease is dependent on reward contingency." Behav Brain Res **212**(2): 187-95.
Cotzias, G. C., P. S. Papavasiliou, *et al*. (1969). "L-dopa in parkinson's syndrome." N Engl J Med **281**(5): 272.

D

d'Anglemont de Tassigny, X., A. Pascual, *et al*. (2015). "GDNF-based therapies, GDNF-producing interneurons, and trophic support of the dopaminergic nigrostriatal pathway. Implications for Parkinson's disease." Front Neuroanat **9**: 10.
Dahlstrom, A. and K. Fuxe (1964). "Localization of monoamines in the lower brain stem." Experientia **20**(7): 398-9.
Dai, M. and J. M. Tepper (1998). "Do silent dopaminergic neurons exist in rat substantia nigra in vivo?" Neuroscience **85**(4): 1089-99.
Dauer, W. and S. Przedborski (2003). "Parkinson's disease: mechanisms and models." Neuron **39**(6): 889-909.
Davis, G. C., A. C. Williams, *et al*. (1979). "Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues." Psychiatry Res **1**(3): 249-54.
de Rijk, M. C., L. J. Launer, *et al*. (2000). "Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group." Neurology **54**(11 Suppl 5): S21-3.
de Silva, H. R., N. L. Khan, *et al*. (2000). "The genetics of Parkinson's disease." Curr Opin Genet Dev **10**(3): 292-8.
Deglon, N., J. L. Tseng, *et al*. (2000). "Self-inactivating lentiviral vectors with enhanced transgene expression as potential gene transfer system in Parkinson's disease." Hum Gene Ther **11**(1): 179-90.
Deuschl, G., J. Herzog, *et al*. (2006). "Deep brain stimulation: postoperative issues." Mov Disord **21 Suppl 14**: S219-37.
Di Loreto, S., T. Florio, *et al*. (1996). "Transplantation of mesencephalic cell suspension in dopamine-denervated striatum of the rat.I. Effects on spontaneous activity of striatal neurons." Exp Neurol **138**(2): 318-26.
DiFiglia, M., P. Pasik, *et al*. (1976). "A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys." Brain Res **114**(2): 245-56.
Dobrossy, M. D. and S. B. Dunnett (2003). "Motor training effects on recovery of function after striatal lesions and striatal grafts." Exp Neurol **184**(1): 274-84.

Double, K. L., D. Ben-Shachar, *et al*. (2002). "Influence of neuromelanin on oxidative pathways within the human substantia nigra." Neurotoxicol Teratol **24**(5): 621-8.
Doucet, G., P. Brundin, *et al*. (1990). "Effect of Prior Dopamine Denervation on Survival and Fiber Outgrowth from Intrastriatal Fetal Mesencephalic Grafts." Eur J Neurosci **2**(4): 279-290.
Doucet, G., Y. Murata, *et al*. (1989). "Host afferents into intrastriatal transplants of fetal ventral mesencephalon." Exp Neurol **106**(1): 1-19.
Drucker-Colin, R. and F. Garcia-Hernandez (1991). "A new motor test sensitive to aging and dopaminergic function." J Neurosci Methods **39**(2): 153-61.
Dube, L., A. D. Smith, *et al*. (1988). "Identification of synaptic terminals of thalamic or cortical origin in contact with distinct medium-size spiny neurons in the rat neostriatum." J Comp Neurol **267**(4): 455-71.
Duffy, P. E. a. T., V. M. (1965). "Phase and electron microscopic observations of lewy bodies and melanin granules in the substantia nigra and locus caeruleus in parkinson's disease." Journal of Neuropathology & Experimental Neurology **24**(3): 398-414.
Dunnett, S. a. T., E (2011). Rotation in the 6-OHDA-Lesioned Rat. Animal Models of Movement Disorders: Volume I. Neuromethods. Cardiff University. **61:** 299-315.
Dunnett, S. B. (1987). "Anatomical and behavioral consequences of cholinergic-rich grafts to the neocortex of rats with lesions of the nucleus basalis magnocellularis." Ann N Y Acad Sci **495**: 415-30.
Dunnett, S. B. and A. Bjorklund (1987). "Mechanisms of function of neural grafts in the adult mammalian brain." J Exp Biol **132**: 265-89.
Dunnett, S. B., A. Bjorklund, *et al*. (1983). "Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. IV. Behavioural recovery in rats with unilateral 6-OHDA lesions following implantation of nigral cell suspensions in different forebrain sites." Acta Physiol Scand Suppl **522**: 29-37.
Dunnett, S. B., A. Bjorklund, *et al*. (1981a). "Behavioural recovery following transplantation of substantia nigra in rats subjected to 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. I. Unilateral lesions." Brain Res **215**(1-2): 147-61.
Dunnett, S. B., A. Bjorklund, *et al*. (1981b). "Behavioural recovery following transplantation of substantia nigra in rats subjected to 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. II. Bilateral lesions." Brain Res **229**(2): 457-70.
Dunnett, S. B., S. T. Bunch, *et al*. (1984). "Dopamine-rich transplants in rats with 6-OHDA lesions of the ventral tegmental area. I. Effects on spontaneous and drug-induced locomotor activity." Behav Brain Res **13**(1): 71-82.
Dunnett, S. B., T. D. Hernandez, *et al*. (1988). "Graft-derived recovery from 6-OHDA lesions: specificity of ventral mesencephalic graft tissues." Exp Brain Res **71**(2): 411-24.
Dunnett, S. B., D. C. Rogers, *et al*. (1989). "Nigrostriatal reconstruction after 6-OHDA lesions in rats: combination of dopamine-rich nigral grafts and nigrostriatal "bridge" grafts." Exp Brain Res **75**(3): 523-35.
Dunnett, S. B., I. Q. Whishaw, *et al*. (1987). "Dopamine-rich grafts ameliorate whole body motor asymmetry and sensory neglect but not independent limb use in rats with 6-hydroxydopamine lesions." Brain Res **415**(1): 63-78.
Dunning, C. J., J. F. Reyes, *et al*. (2012). "Can Parkinson's disease pathology be propagated from one neuron to another?" Prog Neurobiol **97**(2): 205-19.
Duvoisin, R. C. (1986). "On heredity, twins, and Parkinson's disease." Ann Neurol **19**(4): 409-11.

E

Elbaz, A., C. Levecque, *et al*. (2004). "CYP2D6 polymorphism, pesticide exposure, and Parkinson's disease." Ann Neurol **55**(3): 430-4.

Esposito, M. S., P. Capelli, *et al*. (2014). "Brainstem nucleus MdV mediates skilled forelimb motor tasks." Nature **508**(7496): 351-6.

Ezrin-Waters, C. and L. Resch (1986). "The nucleus basalis of Meynert." Can J Neurol Sci **13**(1): 8-14.

F

Fahn, S. (2003). "Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome." Ann N Y Acad Sci **991**: 1-14.

Fearnley, J. M. and A. J. Lees (1990). "Striatonigral degeneration. A clinicopathological study." Brain **113 (Pt 6)**: 1823-42.

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

Fernagut, P. O., E. Diguet, *et al*. (2002). "A simple method to measure stride length as an index of nigrostriatal dysfunction in mice." J Neurosci Methods **113**(2): 123-30.

Filion, M. (1979). "Effects of interruption of the nigrostriatal pathway and of dopaminergic agents on the spontaneous activity of globus pallidus neurons in the awake monkey." Brain Res **178**(2-3): 425-41.

Fisher, L. J., S. J. Young, *et al*. (1991). "Electrophysiological characteristics of cells within mesencephalon suspension grafts." Neuroscience **40**(1): 109-22.

Fleming, S. M., J. Salcedo, *et al*. (2004). "Early and progressive sensorimotor anomalies in mice overexpressing wild-type human alpha-synuclein." J Neurosci **24**(42): 9434-40.

Francardo, V., A. Recchia, *et al*. (2011). "Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease." Neurobiol Dis **42**(3): 327-40.

Franco, R., S. Li, *et al*. (2010). "Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease." Chem Biol Interact **188**(2): 289-300.

Francois, C., J. Yelnik, *et al*. (1987). "Golgi study of the primate substantia nigra. II. Spatial organization of dendritic arborizations in relation to the cytoarchitectonic boundaries and to the striatonigral bundle." J Comp Neurol **265**(4): 473-93.

Freed, C. R., P. E. Greene, *et al*. (2001). "Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease." N Engl J Med **344**(10): 710-9.

Freed, W. J. (1983). "Functional brain tissue transplantation: reversal of lesion-induced rotation by intraventricular substantia nigra and adrenal medulla grafts, with a note on intracranial retinal grafts." Biol Psychiatry **18**(11): 1205-67.

Freeman, A. S., L. T. Meltzer, *et al*. (1985). "Firing properties of substantia nigra dopaminergic neurons in freely moving rats." Life Sci **36**(20): 1983-94.

Freund, T. F., J. P. Bolam, *et al*. (1985). "Efferent synaptic connections of grafted dopaminergic neurons reinnervating the host neostriatum: a tyrosine hydroxylase immunocytochemical study." J Neurosci **5**(3): 603-16.

Fricker, R. A., J. H. Kuiper, *et al*. (2012). "Transplanting intact donor tissue enhances dopamine cell survival and the predictability of motor improvements in a rat model of Parkinson's disease." PLoS One **7**(10): e47169.

Fricker, R. A., E. M. Torres, *et al*. (1997a). "The effects of donor stage on the survival and function of embryonic striatal grafts in the adult rat brain. I. Morphological characteristics." Neuroscience **79**(3): 695-710.

Fricker, R. A., E. M. Torres, *et al*. (1997b). "The effects of donor stage on the survival and function of embryonic striatal grafts in the adult rat brain. II. Correlation between positron emission tomography and reaching behaviour." Neuroscience **79**(3): 711-21.

Frodl, E. M., W. M. Duan, *et al*. (1994). "Human embryonic dopamine neurons xenografted to the rat: effects of cryopreservation and varying regional source of donor cells on transplant survival, morphology and function." Brain Res **647**(2): 286-98.

G

Gage, F. H., S. B. Dunnett, *et al*. (1983). "Intracerebral grafting of embryonic neural cells into the adult host brain: an overview of the cell suspension method and its application." Dev Neurosci **6**(3): 137-51.

Gage, F. H., U. Stenevi, *et al*. (1985). "Anatomical and functional consequences of grafting mesencephalic neurons into a peripheral nerve "bridge" connected to the denervated striatum." Exp Brain Res **60**(3): 584-9.

Gaillard, A., M. Decressac, *et al*. (2009). "Anatomical and functional reconstruction of the nigrostriatal pathway by intranigral transplants." Neurobiol Dis **35**(3): 477-88.

Gaillard, A. and M. Jaber (2011). "Rewiring the brain with cell transplantation in Parkinson's disease." Trends Neurosci **34**(3): 124-33.

Gaillard, A., L. Prestoz, *et al*. (2007). "Reestablishment of damaged adult motor pathways by grafted embryonic cortical neurons." Nat Neurosci **10**(10): 1294-9.

Gaillard, F., L. Domballe, *et al*. (2004). "Fetal cortical allografts project massively through the adult cortex." Neuroscience **126**(3): 631-7.

Gandhi, S. and N. W. Wood (2005). "Molecular pathogenesis of Parkinson's disease." Hum Mol Genet **14 Spec No. 2**: 2749-2755.

Garcia, J., T. Carlsson, *et al*. (2011). "Impact of dopamine to serotonin cell ratio in transplants on behavioral recovery and L-DOPA-induced dyskinesia." Neurobiol Dis **43**(3): 576-87.

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

Gates, M. A., E. M. Torres, *et al*. (2006). "Re-examining the ontogeny of substantia nigra dopamine neurons." Eur J Neurosci **23**(5): 1384-90.

Geffen, L. B., T. M. Jessell, *et al*. (1976). "Release of dopamine from dendrites in rat substantia nigra." Nature **260**(5548): 258-60.

George, S., N. L. Rey, *et al*. (2013). "alpha-Synuclein: the long distance runner." Brain Pathol **23**(3): 350-7.

Gerfen, C. R. (1992). "The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia." Annu Rev Neurosci **15**: 285-320.

Gibb, W. R., J. M. Fearnley, *et al*. (1990). "The anatomy and pigmentation of the human substantia nigra in relation to selective neuronal vulnerability." Adv Neurol **53**: 31-4.

Gill, S. S., N. K. Patel, *et al*. (2003). "Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease." Nat Med **9**(5): 589-95.
Golbe, L. I. (1990). "The genetics of Parkinson's disease: a reconsideration." Neurology **40**(10 Suppl 3): suppl 7-14; discussion 14-6.
Gonon, F. G. (1988). "Nonlinear relationship between impulse flow and dopamine released by rat midbrain dopaminergic neurons as studied by in vivo electrochemistry." Neuroscience **24**(1): 19-28.
Goren, B., N. Kahveci, *et al*. (2005). "Effects of intranigral vs intrastriatal fetal mesencephalic neural grafts on motor behavior disorders in a rat Parkinson model." Surg Neurol **64 Suppl 2**: S33-41.
Grace, A. A. and B. S. Bunney (1984). "The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing." J Neurosci **4**(11): 2877-90.
Graef, I. A., P. G. Mermelstein, *et al*. (1999). "L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons." Nature **401**(6754): 703-8.
Graybiel, A. M., T. Aosaki, *et al*. (1994). "The basal ganglia and adaptive motor control." Science **265**(5180): 1826-31.
Grealish, S., E. Diguet, *et al*. (2014). "Human ESC-derived dopamine neurons show similar preclinical efficacy and potency to fetal neurons when grafted in a rat model of Parkinson's disease." Cell Stem Cell **15**(5): 653-65.
Grealish, S., B. Mattsson, *et al*. (2010). "Characterisation of behavioural and neurodegenerative changes induced by intranigral 6-hydroxydopamine lesions in a mouse model of Parkinson's disease." Eur J Neurosci **31**(12): 2266-78.
Greenfield, J. G. and F. D. Bosanquet (1953). "The brain-stem lesions in Parkinsonism." J Neurol Neurosurg Psychiatry **16**(4): 213-26.
Greengard, P., P. B. Allen, *et al*. (1999). "Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade." Neuron **23**(3): 435-47.
Gurevich, E. V. and J. N. Joyce (1999). "Distribution of dopamine D3 receptor expressing neurons in the human forebrain: comparison with D2 receptor expressing neurons." Neuropsychopharmacology **20**(1): 60-80.

H

Hallas, B. H., G. D. Das, *et al*. (1980). "Transplantation of brain tissue in the brain of rat. II. Growth characteristics of neocortical transplants in hosts of different ages." Am J Anat **158**(2): 147-59.
Hamani, C. and A. M. Lozano (2003). "Physiology and pathophysiology of Parkinson's disease." Ann N Y Acad Sci **991**: 15-21.
Hamers, F. P., A. J. Lankhorst, *et al*. (2001). "Automated quantitative gait analysis during overground locomotion in the rat: its application to spinal cord contusion and transection injuries." J Neurotrauma **18**(2): 187-201.
Hansen, C., E. Angot, *et al*. (2011). "alpha-Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells." J Clin Invest **121**(2): 715-25.
Haque, N. S., C. J. LeBlanc, *et al*. (1997). "Differential dissection of the rat E16 ventral mesencephalon and survival and reinnervation of the 6-OHDA-lesioned striatum by a subset of aldehyde dehydrogenase-positive TH neurons." Cell Transplant **6**(3): 239-48.

Hargus, G., O. Cooper, *et al*. (2010). "Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(36): 15921-6.

Hassani, O. K. and J. Feger (1999). "Effects of intrasubthalamic injection of dopamine receptor agonists on subthalamic neurons in normal and 6-hydroxydopamine-lesioned rats: an electrophysiological and c-Fos study." Neuroscience **92**(2): 533-43.

Herman, J. P., D. N. Abrous, *et al*. (1991). "Anatomical and behavioral comparison of unilateral dopamine-rich grafts implanted into the striatum of neonatal and adult rats." Neuroscience **40**(2): 465-75.

Herman, J. P. and N. D. Abrous (1994). "Dopaminergic neural grafts after fifteen years: results and perspectives." Prog Neurobiol **44**(1): 1-35.

Hernandez-Lopez, S., T. Tkatch, *et al*. (2000). "D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca2+ currents and excitability via a novel PLC[beta]1-IP3-calcineurin-signaling cascade." J Neurosci **20**(24): 8987-95.

Heuer, A., N. N. Vinh, *et al*. (2013). "Behavioural recovery on simple and complex tasks by means of cell replacement therapy in unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned mice." Eur J Neurosci **37**(10): 1691-704.

Hirsh, L. F. and B. Dalton (1988). "Neurosurgery in patients over age 65." Pa Med **91**(12): 38, 40, 42.

Hoffer, B. J., A. Hoffman, *et al*. (1994). "Glial cell line-derived neurotrophic factor reverses toxin-induced injury to midbrain dopaminergic neurons in vivo." Neurosci Lett **182**(1): 107-11.

Hornykiewicz, O. (1966). "Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function." Pharmacol Rev **18**(2): 925-64.

Houeto, J. L., M. L. Welter, *et al*. (2003). "Subthalamic stimulation in Parkinson disease: intraoperative predictive factors." Arch Neurol **60**(5): 690-4.

Hudson, J. L., P. Bickford, *et al*. (1994). "Target and neurotransmitter specificity of fetal central nervous system transplants: importance for functional reinnervation." J Neurosci **14**(1): 283-90.

Hudson, J. L., C. G. van Horne, *et al*. (1993). "Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats." Brain Res **626**(1-2): 167-74.

Hughes, A. J., C. Colosimo, *et al*. (1992). "The dopaminergic response in multiple system atrophy." J Neurol Neurosurg Psychiatry **55**(11): 1009-13.

Hughes, A. J., S. E. Daniel, *et al*. (1993). "A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease." Arch Neurol **50**(2): 140-8.

Hull, C. D., M. S. Levine, *et al*. (1974). "The spontaneous firing pattern of forebrain neurons. I. The effects of dopamine and non-dopamine depleting lesions on caudate unit firing patterns." Brain Res **73**(2): 241-62.

Hutchison, W. D., J. O. Dostrovsky, *et al*. (2004). "Neuronal oscillations in the basal ganglia and movement disorders: evidence from whole animal and human recordings." J Neurosci **24**(42): 9240-3.

I

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

Inanobe, A., Y. Yoshimoto, *et al*. (1999). "Characterization of G-protein-gated K+ channels composed of Kir3.2 subunits in dopaminergic neurons of the substantia nigra." J Neurosci **19**(3): 1006-17.

Isacson, O., L. M. Bjorklund, *et al*. (2003). "Toward full restoration of synaptic and terminal function of the dopaminergic system in Parkinson's disease by stem cells." Ann Neurol **53 Suppl 3**: S135-46; discussion S146-8.

Isacson, O. and T. W. Deacon (1996). "Specific axon guidance factors persist in the adult brain as demonstrated by pig neuroblasts transplanted to the rat." Neuroscience **75**(3): 827-37.

Isacson, O., T. W. Deacon, *et al*. (1995). "Transplanted xenogeneic neural cells in neurodegenerative disease models exhibit remarkable axonal target specificity and distinct growth patterns of glial and axonal fibres." Nat Med **1**(11): 1189-94.

Iwamoto, T., S. Okumura, *et al*. (2003). "Motor dysfunction in type 5 adenylyl cyclase-null mice." J Biol Chem **278**(19): 16936-40.

J

Jaber, M., S. W. Robinson, *et al*. (1996). "Dopamine receptors and brain function." Neuropharmacology **35**(11): 1503-19.

Jensen, A. A., U. B. Pedersen, *et al*. (1996). "The dopamine D1 receptor family: structural and functional aspects." Biochem Soc Trans **24**(1): 163-9.

Johansson, B. B. and A. L. Ohlsson (1996). "Environment, social interaction, and physical activity as determinants of functional outcome after cerebral infarction in the rat." Exp Neurol **139**(2): 322-7.

Johnston, R. E. and J. B. Becker (1999). "Behavioral changes associated with grafts of embryonic ventral mesencephalon tissue into the striatum and/or substantia nigra in a rat model of Parkinson's Disease." Behav Brain Res **104**(1-2): 179-87.

K

Kawaguchi, Y., C. J. Wilson, *et al*. (1989). "Intracellular recording of identified neostriatal patch and matrix spiny cells in a slice preparation preserving cortical inputs." J Neurophysiol **62**(5): 1052-68.

Kebabian, J. W., G. L. Petzold, *et al*. (1972). "Dopamine-sensitive adenylate cyclase in caudate nucleus of rat brain, and its similarity to the "dopamine receptor"." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(8): 2145-9.

Kefalopoulou, Z., M. Politis, *et al*. (2014). "Long-term clinical outcome of fetal cell transplantation for Parkinson disease: two case reports." JAMA Neurol **71**(1): 83-7.

Kelly, R. B. (1993). "Storage and release of neurotransmitters." Cell **72 Suppl**: 43-53.

Khan, Z. U., A. Gutierrez, *et al*. (2000). "Dopamine D5 receptors of rat and human brain." Neuroscience **100**(4): 689-99.
Kirik, D., B. Georgievska, *et al*. (2004). "Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease." Nat Neurosci **7**(2): 105-10.
Kirik, D., C. Rosenblad, *et al*. (2000). "Long-term rAAV-mediated gene transfer of GDNF in the rat Parkinson's model: intrastriatal but not intranigral transduction promotes functional regeneration in the lesioned nigrostriatal system." J Neurosci **20**(12): 4686-700.
Kirik, D., C. Winkler, *et al*. (2001). "Growth and functional efficacy of intrastriatal nigral transplants depend on the extent of nigrostriatal degeneration." J Neurosci **21**(8): 2889-96.
Kish, S. J., K. Shannak, *et al*. (1988). "Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications." N Engl J Med **318**(14): 876-80.
Kitada, T., S. Asakawa, *et al*. (1998). "Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism." Nature **392**(6676): 605-8.
Kitai, S. T. and J. M. Deniau (1981). "Cortical inputs to the subthalamus: intracellular analysis." Brain Res **214**(2): 411-5.
Klein, A. and S. B. Dunnett (2012). "Analysis of skilled forelimb movement in rats: the single pellet reaching test and staircase test." Curr Protoc Neurosci **Chapter 8**: Unit8 28.
Klein, C. and K. Lohmann-Hedrich (2007). "Impact of recent genetic findings in Parkinson's disease." Curr Opin Neurol **20**(4): 453-64.
Klein, C. and M. G. Schlossmacher (2007). "Parkinson disease, 10 years after its genetic revolution: multiple clues to a complex disorder." Neurology **69**(22): 2093-104.
Kordower, J. H. (2014). "The prion hypothesis of Parkinson's disease: this hot topic just got hotter." Mov Disord **29**(8): 988.
Kordower, J. H., J. Bloch, *et al*. (1999). "Lentiviral gene transfer to the nonhuman primate brain." Exp Neurol **160**(1): 1-16.
Kordower, J. H., Y. Chu, *et al*. (2008). "Transplanted dopaminergic neurons develop PD pathologic changes: a second case report." Mov Disord **23**(16): 2303-6.
Kordower, J. H., M. E. Emborg, *et al*. (2000). "Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease." Science **290**(5492): 767-73.
Korpi, E. R., P. Koikkalainen, *et al*. (1999). "Cerebellar granule-cell-specific GABAA receptors attenuate benzodiazepine-induced ataxia: evidence from alpha 6-subunit-deficient mice." Eur J Neurosci **11**(1): 233-40.
Kreiss, D. S., C. W. Mastropietro, *et al*. (1997). "The response of subthalamic nucleus neurons to dopamine receptor stimulation in a rodent model of Parkinson's disease." J Neurosci **17**(17): 6807-19.
Krieglstein, K. and K. Unsicker (1994). "Transforming growth factor-beta promotes survival of midbrain dopaminergic neurons and protects them against N-methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity." Neuroscience **63**(4): 1189-96.
Kruger, R., W. Kuhn, *et al*. (1998). "Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease." Nat Genet **18**(2): 106-8.

L

Landwehrmeyer, B., G. Mengod, *et al*. (1993a). "Differential visualization of dopamine D2 and D3 receptor sites in rat brain. A comparative study using in situ hybridization histochemistry and ligand binding autoradiography." Eur J Neurosci **5**(2): 145-53.

Landwehrmeyer, B., G. Mengod, *et al*. (1993b). "Dopamine D3 receptor mRNA and binding sites in human brain." Brain Res Mol Brain Res **18**(1-2): 187-92.

Lang, A. E., S. Gill, *et al*. (2006). "Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease." Ann Neurol **59**(3): 459-66.

Lang, A. E. and A. M. Lozano (1998a). "Parkinson's disease. First of two parts." N Engl J Med **339**(15): 1044-53.

Langston, J. W., P. Ballard, *et al*. (1983). "Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis." Science **219**(4587): 979-80.

Langston, J. W. and P. A. Ballard, Jr. (1983). "Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine." N Engl J Med **309**(5): 310.

Lapper, S. R. and J. P. Bolam (1992). "Input from the frontal cortex and the parafascicular nucleus to cholinergic interneurons in the dorsal striatum of the rat." Neuroscience **51**(3): 533-45.

Le Moine, C. and B. Bloch (1995). "D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum." J Comp Neurol **355**(3): 418-26.

Lebel, M. and M. Cyr (2011). "Molecular and cellular events of dopamine D1 receptor-mediated tau phosphorylation in SK-N-MC cells." Synapse **65**(1): 69-76.

Lee, C. H., H. J. Kim, *et al*. (2006). "Dequalinium-induced protofibril formation of alpha-synuclein." J Biol Chem **281**(6): 3463-72.

Lee, H. J., E. J. Bae, *et al*. (2014). "Extracellular alpha--synuclein-a novel and crucial factor in Lewy body diseases." Nat Rev Neurol **10**(2): 92-8.

Leroy, E., R. Boyer, *et al*. (1998). "The ubiquitin pathway in Parkinson's disease." Nature **395**(6701): 451-2.

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

Li, J. Y., N. S. Christophersen, *et al*. (2008). "Critical issues of clinical human embryonic stem cell therapy for brain repair." Trends Neurosci **31**(3): 146-53.

Liang, C. L., C. M. Sinton, *et al*. (1996). "Midbrain dopaminergic neurons in the mouse: co-localization with Calbindin-D28K and calretinin." Neuroscience **75**(2): 523-33.

Lin, L. F., D. H. Doherty, *et al*. (1993). "GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons." Science **260**(5111): 1130-2.

Lindvall, O. (1997). "Neural transplantation: a hope for patients with Parkinson's disease." Neuroreport **8**(14): iii-x.

Lindvall, O. and P. Hagell (2000). "Clinical observations after neural transplantation in Parkinson's disease." Prog Brain Res **127**: 299-320.

Lindvall, O., S. Rehncrona, *et al*. (1988). "Fetal dopamine-rich mesencephalic grafts in Parkinson's disease." Lancet **2**(8626-8627): 1483-4.

Lubbe, S. and H. R. Morris (2014). "Recent advances in Parkinson's disease genetics." J Neurol **261**(2): 259-66.

Lund, R. D. and A. R. Harvey (1981). "Transplantation of tectal tissue in rats. I. Organization of transplants and pattern of distribution of host afferents within them." J Comp Neurol **201**(2): 191-209.

Lundblad, M., B. Picconi, *et al*. (2004). "A model of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned mice: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function." Neurobiol Dis **16**(1): 110-23.

Lundblad, M., A. Usiello, *et al*. (2005). "Pharmacological validation of a mouse model of l-DOPA-induced dyskinesia." Exp Neurol **194**(1): 66-75.

M

Mahan, L. C., R. M. Burch, *et al*. (1990). "Expression of striatal D1 dopamine receptors coupled to inositol phosphate production and Ca2+ mobilization in Xenopus oocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(6): 2196-200.

Mallet, N., B. Ballion, *et al*. (2006). "Cortical inputs and GABA interneurons imbalance projection neurons in the striatum of parkinsonian rats." J Neurosci **26**(14): 3875-84.

Mandel, R. J., P. Brundin, *et al*. (1990). "The Importance of Graft Placement and Task Complexity for Transplant-Induced Recovery of Simple and Complex Sensorimotor Deficits in Dopamine Denervated Rats." Eur J Neurosci **2**(10): 888-894.

Maries, E., B. Dass, *et al*. (2003). "The role of alpha-synuclein in Parkinson's disease: insights from animal models." Nat Rev Neurosci **4**(9): 727-38.

Marks, W. J., Jr., R. T. Bartus, *et al*. (2010). "Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial." Lancet Neurol **9**(12): 1164-72.

Marks, W. J., Jr., J. L. Ostrem, *et al*. (2008). "Safety and tolerability of intraputaminal delivery of CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial." Lancet Neurol **7**(5): 400-8.

Marsden, C. D. (1983). "Neuromelanin and Parkinson's disease." J Neural Transm Suppl **19**: 121-41.

Marsden, C. D. (1989). "Slowness of movement in Parkinson's disease." Mov Disord **4 Suppl 1**: S26-37.

Marsden, C. D., J. C. Meadows, *et al*. (1969). "The relation between physiological tremor of the two hands in healthy subjects." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **27**(2): 179-85.

Marti, J., K. V. Wills, *et al*. (2002). "A combined immunohistochemical and autoradiographic method to detect midbrain dopaminergic neurons and determine their time of origin." Brain Res Brain Res Protoc **9**(3): 197-205.

Matsuo, A., S. Nakamura, *et al*. (2000). "Immunohistochemical localization of glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor alpha-1 in the rat brain: confirmation of expression in various neuronal systems." Brain Res **859**(1): 57-71.

Matsushita, N., H. Okada, *et al*. (2002). "Dynamics of tyrosine hydroxylase promoter activity during midbrain dopaminergic neuron development." J Neurochem **82**(2): 295-304.

Matsuura, K., H. Kabuto, *et al*. (1997). "Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion." J Neurosci Methods **73**(1): 45-8.

McGrath, J., E. Lintz, *et al*. (2002). "Adeno-associated viral delivery of GDNF promotes recovery of dopaminergic phenotype following a unilateral 6-hydroxydopamine lesion." Cell Transplant **11**(3): 215-27.
Mehta, V., J. Spears, *et al*. (1997). "Neural transplantation in Parkinson's disease." Can J Neurol Sci **24**(4): 292-301.
Meiser, J., D. Weindl, *et al*. (2013). "Complexity of dopamine metabolism." Cell Commun Signal **11**(1): 34.
Mendez, I., D. Sadi, *et al*. (1996). "Reconstruction of the nigrostriatal pathway by simultaneous intrastriatal and intranigral dopaminergic transplants." J Neurosci **16**(22): 7216-27.
Mendez, I., R. Sanchez-Pernaute, *et al*. (2005). "Cell type analysis of functional fetal dopamine cell suspension transplants in the striatum and substantia nigra of patients with Parkinson's disease." Brain **128**(Pt 7): 1498-510.
Mendez, I., A. Vinuela, *et al*. (2008). "Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years." Nat Med **14**(5): 507-9.
Meyers, R. (1951). "Surgical experiments in the therapy of certain 'extrapyramidal' diseases: a current evaluation." Acta Psychiatr Neurol Suppl **67**: 1-42.
Mitchell, I. J., M. A. Sambrook, *et al*. (1985). "Subcortical changes in the regional uptake of [3H]-2-deoxyglucose in the brain of the monkey during experimental choreiform dyskinesia elicited by injection of a gamma-aminobutyric acid antagonist into the subthalamic nucleus." Brain **108 (Pt 2)**: 405-22.
Montoya, C. P., L. J. Campbell-Hope, *et al*. (1991). "The "staircase test": a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats." J Neurosci Methods **36**(2-3): 219-28.
Mora, F., G. Segovia, *et al*. (2008). "Glutamate-dopamine-GABA interactions in the aging basal ganglia." Brain Res Rev **58**(2): 340-53.
Mouradian, M. M. (2002). "Recent advances in the genetics and pathogenesis of Parkinson disease." Neurology **58**(2): 179-85.
Mukhida, K., K. A. Baker, *et al*. (2001). "Enhancement of sensorimotor behavioral recovery in hemiparkinsonian rats with intrastriatal, intranigral, and intrasubthalamic nucleus dopaminergic transplants." J Neurosci **21**(10): 3521-30.
Muller, W. and K. Bittner (2002). "Differential oxidative modulation of voltage-dependent K+ currents in rat hippocampal neurons." J Neurophysiol **87**(6): 2990-5.

N

Nagatsu, T., M. Levitt, *et al*. (1964). "Tyrosine Hydroxylase. the Initial Step in Norepinephrine Biosynthesis." J Biol Chem **239**: 2910-7.
Nakamura, K. (2013). "alpha-Synuclein and mitochondria: partners in crime?" Neurotherapeutics **10**(3): 391-9.
Nakao, N., M. Ogura, *et al*. (1998). "Intrastriatal mesencephalic grafts affect neuronal activity in basal ganglia nuclei and their target structures in a rat model of Parkinson's disease." J Neurosci **18**(5): 1806-17.
Naldini, L., U. Blomer, *et al*. (1996). "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector." Science **272**(5259): 263-7.

Navailles, S., B. Bioulac, *et al*. (2010). "Serotonergic neurons mediate ectopic release of dopamine induced by L-DOPA in a rat model of Parkinson's disease." Neurobiol Dis **38**(1): 136-43.
Neve, K. A., J. K. Seamans, *et al*. (2004). "Dopamine receptor signaling." J Recept Signal Transduct Res **24**(3): 165-205.
Nicklas, W. J., S. K. Youngster, *et al*. (1987). "MPTP, MPP+ and mitochondrial function." Life Sci **40**(8): 721-9.
Nikkhah, G., M. G. Cunningham, *et al*. (1995a). "Dopaminergic microtransplants into the substantia nigra of neonatal rats with bilateral 6-OHDA lesions. I. Evidence for anatomical reconstruction of the nigrostriatal pathway." J Neurosci **15**(5 Pt 1): 3548-61.
Nikkhah, G., M. G. Cunningham, *et al*. (1994). "Improved graft survival and striatal reinnervation by microtransplantation of fetal nigral cell suspensions in the rat Parkinson model." Brain Res **633**(1-2): 133-43.
Nikkhah, G., M. G. Cunningham, *et al*. (1995b). "Dopaminergic microtransplants into the substantia nigra of neonatal rats with bilateral 6-OHDA lesions. II. Transplant-induced behavioral recovery." J Neurosci **15**(5 Pt 1): 3562-70.
Nikkhah, G., W. M. Duan, *et al*. (1993). "Restoration of complex sensorimotor behavior and skilled forelimb use by a modified nigral cell suspension transplantation approach in the rat Parkinson model." Neuroscience **56**(1): 33-43.
Nikkhah, G., M. Olsson, *et al*. (1994). "A microtransplantation approach for cell suspension grafting in the rat Parkinson model: a detailed account of the methodology." Neuroscience **63**(1): 57-72.
Nikkhah, G., C. Rosenthal, *et al*. (2009). "Microtransplantation of dopaminergic cell suspensions: further characterization and optimization of grafting parameters." Cell Transplant **18**(2): 119-33.
Nutt, J. G., K. J. Burchiel, *et al*. (2003). "Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD." Neurology **60**(1): 69-73.

O

O'Keeffe, F. E., S. A. Scott, *et al*. (2008). "Induction of A9 dopaminergic neurons from neural stem cells improves motor function in an animal model of Parkinson's disease." Brain **131**(Pt 3): 630-41.
Ogawa, N., Y. Hirose, *et al*. (1985). "A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice." Res Commun Chem Pathol Pharmacol **50**(3): 435-41.
Okazaki, H., L. E. Lipkin, *et al*. (1961). "Diffuse intracytoplasmic ganglionic inclusions (Lewy type) associated with progressive dementia and quadriparesis in flexion." J Neuropathol Exp Neurol **20**: 237-44.
Olanow, C. W. (2007). "The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease--2007." Mov Disord **22 Suppl 17**: S335-42.
Olanow, C. W. (2014). "Do prions cause Parkinson disease?: the evidence accumulates." Ann Neurol **75**(3): 331-3.
Olanow, C. W. and P. Brundin (2013). "Parkinson's disease and alpha synuclein: is Parkinson's disease a prion-like disorder?" Mov Disord **28**(1): 31-40.
Olanow, C. W., C. G. Goetz, *et al*. (2003). "A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease." Ann Neurol **54**(3): 403-14.

Olanow, C. W., J. H. Kordower, *et al*. (1996). "Fetal nigral transplantation as a therapy for Parkinson's disease." Trends Neurosci **19**(3): 102-9.
Olsson, M., G. Nikkhah, *et al*. (1995). "Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test." J Neurosci **15**(5 Pt 2): 3863-75.

P

Palmer, M. R., A. C. Granholm, *et al*. (2001). "Intranigral transplantation of solid tissue ventral mesencephalon or striatal grafts induces behavioral recovery in 6-OHDA-lesioned rats." Brain Res **890**(1): 86-99.
Papadimitriou, A., V. Veletza, *et al*. (1999). "Mutated alpha-synuclein gene in two Greek kindreds with familial PD: incomplete penetrance?" Neurology **52**(3): 651-4.
Patel, N. K., M. Bunnage, *et al*. (2005). "Intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in PD: a two-year outcome study." Ann Neurol **57**(2): 298-302.
Paxinos, G., and Franklin, K.B.J. (2001). The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego, Academic Press.
Peelaerts, W., L. Bousset, *et al*. (2015). "alpha-Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration." Nature **522**(7556): 340-4.
Penny, G. R., S. Afsharpour, *et al*. (1986). "The glutamate decarboxylase-, leucine enkephalin-, methionine enkephalin- and substance P-immunoreactive neurons in the neostriatum of the rat and cat: evidence for partial population overlap." Neuroscience **17**(4): 1011-45.
Perese, D. A., J. Ulman, *et al*. (1989). "A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model." Brain Res **494**(2): 285-93.
Perlow, M. J., W. J. Freed, *et al*. (1979). "Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system." Science **204**(4393): 643-7.
Piccini, P., D. J. Brooks, *et al*. (1999). "Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient." Nat Neurosci **2**(12): 1137-40.
Picconi, B., D. Centonze, *et al*. (2003). "Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia." Nat Neurosci **6**(5): 501-6.
Picconi, B., V. Paille, *et al*. (2008). "l-DOPA dosage is critically involved in dyskinesia via loss of synaptic depotentiation." Neurobiol Dis **29**(2): 327-35.
Plumet, J., A. Ebrahimi, *et al*. (1993). "Partial recovery of skilled forelimb reaching after transplantation of fetal cortical tissue in adult rats with motor cortex lesion - anatomical and functional aspects." Restor Neurol Neurosci **6**(1): 9-27.
Pollak, P., A. L. Benabid, *et al*. (1993). "[Effects of the stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson disease]." Rev Neurol (Paris) **149**(3): 175-6.
Polymeropoulos, M. H., C. Lavedan, *et al*. (1997). "Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease." Science **276**(5321): 2045-7.
Porras, G., P. De Deurwaerdere, *et al*. (2014). "L-dopa-induced dyskinesia: beyond an excessive dopamine tone in the striatum." Sci Rep **4**: 3730.
Primus, R. J., A. Thurkauf, *et al*. (1997). "II. Localization and characterization of dopamine D4 binding sites in rat and human brain by use of the novel, D4 receptor-selective ligand [3H]NGD 94-1." J Pharmacol Exp Ther **282**(2): 1020-7.
Przedborski, S. and M. Vila (2003). "The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease." Ann N Y Acad Sci **991**: 189-98.

R

Rajput, A. H., B. Rozdilsky, *et al*. (1991). "Occurrence of resting tremor in Parkinson's disease." Neurology **41**(8): 1298-9.

Rascol, O. (2000). "Medical treatment of levodopa-induced dyskinesias." Ann Neurol **47**(4 Suppl 1): S179-88.

Recasens, A., B. Dehay, *et al*. (2014). "Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger alpha-synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys." Ann Neurol **75**(3): 351-62.

Rice, M. E. and J. C. Patel (2015). "Somatodendritic dopamine release: recent mechanistic insights." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **370**(1672).

Robertson, G. S., G. Damsma, *et al*. (1991). "Characterization of dopamine release in the substantia nigra by in vivo microdialysis in freely moving rats." J Neurosci **11**(7): 2209-16.

Robertson, H. A. (1992). "Dopamine receptor interactions: some implications for the treatment of Parkinson's disease." Trends Neurosci **15**(6): 201-6.

Rogers, J. H. (1992). "Immunohistochemical markers in rat brain: colocalization of calretinin and calbindin-D28k with tyrosine hydroxylase." Brain Res **587**(2): 203-10.

Rogers, J. H. and A. Resibois (1992). "Calretinin and calbindin-D28k in rat brain: patterns of partial co-localization." Neuroscience **51**(4): 843-65.

Rosales, M. G., D. Martinez-Fong, *et al*. (1997). "Reciprocal interaction between glutamate and dopamine in the pars reticulata of the rat substantia nigra: a microdialysis study." Neuroscience **80**(3): 803-10.

Rosenblad, C., D. Kirik, *et al*. (1999). "Protection and regeneration of nigral dopaminergic neurons by neurturin or GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease after administration into the striatum or the lateral ventricle." Eur J Neurosci **11**(5): 1554-66.

Rumpel, R., M. Hohmann, *et al*. (2015). "Transplantation of fetal ventral mesencephalic progenitor cells overexpressing high molecular weight fibroblast growth factor 2 isoforms in 6-hydroxydopamine lesioned rats." Neuroscience **286**: 293-307.

Rylander, D., V. Bagetta, *et al*. (2013). "Region-specific restoration of striatal synaptic plasticity by dopamine grafts in experimental parkinsonism." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(46): E4375-84.

S

Salin, P., I. P. Lopez, *et al*. (2009). "Changes to interneuron-driven striatal microcircuits in a rat model of Parkinson's disease." Neurobiol Dis **34**(3): 545-52.

Sauer, H., C. Rosenblad, *et al*. (1995). "Glial cell line-derived neurotrophic factor but not transforming growth factor beta 3 prevents delayed degeneration of nigral dopaminergic neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesion." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(19): 8935-9.

Sawamoto, K., N. Nakao, *et al*. (2001). "Visualization, direct isolation, and transplantation of midbrain dopaminergic neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(11): 6423-8.

Schallert, T. T., J.L. (2000). Intervention strategies for degeneration of dopamine neurons in Parkinsonism: optimizing behavioral assessment of outcome. Totowa, NJ, Humana Press.
Schapira, A. H. (2008). "Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease." Lancet Neurol **7**(1): 97-109.
Schapira, A. H., J. M. Cooper, *et al*. (1989). "Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease." Lancet **1**(8649): 1269.
Schein, J. C., D. D. Hunter, *et al*. (1998). "Girk2 expression in the ventral midbrain, cerebellum, and olfactory bulb and its relationship to the murine mutation weaver." Dev Biol **204**(2): 432-50.
Scherer, H. J. (1939). "Melanin pigmentation of the substantia nigra in primates." Journal of Comparative Neurology **71**(1): 91-98.
Scherman, D., C. Desnos, *et al*. (1989). "Striatal dopamine deficiency in Parkinson's disease: role of aging." Ann Neurol **26**(4): 551-7.
Schmidt, R. H., A. Bjorklund, *et al*. (1981). "Intracerebral grafting of dissociated CNS tissue suspensions: a new approach for neuronal transplantation to deep brain sites." Brain Res **218**(1-2): 347-56.
Schuepbach, W. M., J. Rau, *et al*. (2013). "Neurostimulation for Parkinson's disease with early motor complications." N Engl J Med **368**(7): 610-22.
Schultzberg, M., S. B. Dunnett, *et al*. (1984). "Dopamine and cholecystokinin immunoreactive neurons in mesencephalic grafts reinnervating the neostriatum: evidence for selective growth regulation." Neuroscience **12**(1): 17-32.
Schwab, M. E. (1990). "Myelin-associated inhibitors of neurite growth and regeneration in the CNS." Trends Neurosci **13**(11): 452-6.
Schwarting, R. K. and J. P. Huston (1996). "The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments." Prog Neurobiol **50**(2-3): 275-331.
Seeman, P., H. C. Guan, *et al*. (1993). "Low density of dopamine D4 receptors in Parkinson's, schizophrenia, and control brain striata." Synapse **14**(4): 247-53.
Senoh, S. a. W., B. (1959). "Non-enzymatic conversions of dopamine to norepinephrine and trihydroxyphenethylamines." J. Am. Chem. Soc **81**(23): 6222-6231.
Sharott, A., N. M. Doig, *et al*. (2012). "Relationships between the firing of identified striatal interneurons and spontaneous and driven cortical activities in vivo." J Neurosci **32**(38): 13221-36.
Siegfried, J. and B. Lippitz (1994). "Chronic electrical stimulation of the VL-VPL complex and of the pallidum in the treatment of movement disorders: personal experience since 1982." Stereotact Funct Neurosurg **62**(1-4): 71-5.
Sinclair, S. R., J. W. Fawcett, *et al*. (1999). "Delayed implantation of nigral grafts improves survival of dopamine neurones and rate of functional recovery." Neuroreport **10**(6): 1263-7.
Singh, N., V. Pillay, *et al*. (2007). "Advances in the treatment of Parkinson's disease." Prog Neurobiol **81**(1): 29-44.
Smith, A., Heuer, A (2011). 6-OHDA Toxin Model in Mouse, Humana Press.
Somogyi, P. and A. D. Smith (1979). "Projection of neostriatal spiny neurons to the substantia nigra. Application of a combined Golgi-staining and horseradish peroxidase transport procedure at both light and electron microscopic levels." Brain Res **178**(1): 3-15.
Starkey, M. L., A. W. Barritt, *et al*. (2005). "Assessing behavioural function following a pyramidotomy lesion of the corticospinal tract in adult mice." Exp Neurol **195**(2): 524-39.

Stenevi, U., A. Bjorklund, *et al*. (1976). "Transplantation of central and peripheral monoamine neurons to the adult rat brain: techniques and conditions for survival." Brain Res **114**(1): 1-20.

Stromberg, I., M. Bygdeman, *et al*. (1992). "Target-specific outgrowth from human mesencephalic tissue grafted to cortex or ventricle of immunosuppressed rats." J Comp Neurol **315**(4): 445-56.

Stromberg, I., S. Johnson, *et al*. (1985). "Reinnervation of dopamine-denervated striatum by substantia nigra transplants: immunohistochemical and electrophysiological correlates." Neuroscience **14**(4): 981-90.

Sulzer, D., J. Bogulavsky, *et al*. (2000). "Neuromelanin biosynthesis is driven by excess cytosolic catecholamines not accumulated by synaptic vesicles." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(22): 11869-74.

T-V

Thompson, L., P. Barraud, *et al*. (2005). "Identification of dopaminergic neurons of nigral and ventral tegmental area subtypes in grafts of fetal ventral mesencephalon based on cell morphology, protein expression, and efferent projections." J Neurosci **25**(27): 6467-77.

Thompson, L. and A. Bjorklund (2012). "Survival, differentiation, and connectivity of ventral mesencephalic dopamine neurons following transplantation." Prog Brain Res **200**: 61-95.

Thompson, L. H., S. Grealish, *et al*. (2009). "Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway in the adult mouse brain." Eur J Neurosci **30**(4): 625-38.

Thompson, L. H. and C. L. Parish (2013). "Transplantation of fetal midbrain dopamine progenitors into a rodent model of Parkinson's disease." Methods Mol Biol **1059**: 169-80.

Tir, M., D. Devos, *et al*. (2007). "Exhaustive, one-year follow-up of subthalamic nucleus deep brain stimulation in a large, single-center cohort of parkinsonian patients." Neurosurgery **61**(2): 297-304; discussion 304-5.

Torres, E. M., E. Dowd, *et al*. (2008). "Recovery of functional deficits following early donor age ventral mesencephalic grafts in a rat model of Parkinson's disease." Neuroscience **154**(2): 631-40.

Torres, E. M. and S. B. Dunnett (2007). "Amphetamine induced rotation in the assessment of lesions and grafts in the unilateral rat model of Parkinson's disease." Eur Neuropsychopharmacol **17**(3): 206-14.

Triarhou, L. C., P. Brundin, *et al*. (1990). "Intrastriatal implants of mesencephalic cell suspensions in weaver mutant mice: ultrastructural relationships of dopaminergic dendrites and axons issued from the graft." Exp Brain Res **79**(1): 3-17.

Tseng, K. Y., F. Kasanetz, *et al*. (2001). "Cortical slow oscillatory activity is reflected in the membrane potential and spike trains of striatal neurons in rats with chronic nigrostriatal lesions." J Neurosci **21**(16): 6430-9.

Ungerstedt, U. (1968). "6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons." Eur J Pharmacol **5**(1): 107-10.

Ungerstedt, U. (1971). "Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain." Acta Physiol Scand Suppl **367**: 1-48.

Ungerstedt, U. and G. W. Arbuthnott (1970). "Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system." Brain Res **24**(3): 485-93.
Valadas, J. S., M. Vos, *et al*. (2015). "Therapeutic strategies in Parkinson's disease: what we have learned from animal models." Ann N Y Acad Sci **1338**: 16-37.
Vergo, S., J. L. Johansen, *et al*. (2007). "Vesicular monoamine transporter 2 regulates the sensitivity of rat dopaminergic neurons to disturbed cytosolic dopamine levels." Brain Res **1185**: 18-32.
Vila, M., R. Levy, *et al*. (1996). "Metabolic activity of the basal ganglia in parkinsonian syndromes in human and non-human primates: a cytochrome oxidase histochemistry study." Neuroscience **71**(4): 903-12.
Villoslada, P., B. Moreno, *et al*. (2008). "Immunotherapy for neurological diseases." Clin Immunol **128**(3): 294-305.

W

Wakabayashi, K., K. Tanji, *et al*. (2007). "The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates." Neuropathology **27**(5): 494-506.
Wang, C. M., C. H. Parker, Jr., *et al*. (1981). "Electrophysiological effects of antidepressants on mammalian hearts and crayfish giant axon." J Cardiovasc Pharmacol **3**(1): 101-12.
Whishaw, I. Q. (1996). "An endpoint, descriptive, and kinematic comparison of skilled reaching in mice (Mus musculus) with rats (Rattus norvegicus)." Behav Brain Res **78**(2): 101-11.
Whishaw, I. Q. and S. M. Pellis (1990). "The structure of skilled forelimb reaching in the rat: a proximally driven movement with a single distal rotatory component." Behav Brain Res **41**(1): 49-59.
Wickens, J. R. and C. J. Wilson (1998). "Regulation of action-potential firing in spiny neurons of the rat neostriatum in vivo." J Neurophysiol **79**(5): 2358-64.
Wictorin, K., P. Brundin, *et al*. (1990). "Reformation of long axon pathways in adult rat central nervous system by human forebrain neuroblasts." Nature **347**(6293): 556-8.
Wictorin, K., P. Brundin, *et al*. (1992). "Long distance directed axonal growth from human dopaminergic mesencephalic neuroblasts implanted along the nigrostriatal pathway in 6-hydroxydopamine lesioned adult rats." J Comp Neurol **323**(4): 475-94.
Wilby, M. J., S. R. Sinclair, *et al*. (1999). "A glial cell line-derived neurotrophic factor-secreting clone of the Schwann cell line SCTM41 enhances survival and fiber outgrowth from embryonic nigral neurons grafted to the striatum and to the lesioned substantia nigra." J Neurosci **19**(6): 2301-12.
Wilson, C. J. (1993). "The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons." Prog Brain Res **99**: 277-97.
Wilson, C. J., H. T. Chang, *et al*. (1990). "Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum." J Neurosci **10**(2): 508-19.
Wilson, C. J. and Y. Kawaguchi (1996). "The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons." J Neurosci **16**(7): 2397-410.
Winkler, C., C. Bentlage, *et al*. (1999). "Intranigral transplants of GABA-rich striatal tissue induce behavioral recovery in the rat Parkinson model and promote the effects obtained by intrastriatal dopaminergic transplants." Exp Neurol **155**(2): 165-86.

Winkler, C., D. Kirik, *et al*. (2002). "L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function." Neurobiol Dis **10**(2): 165-86.

Winkler, C., D. Kirik, *et al*. (2000). "Transplantation in the rat model of Parkinson's disease: ectopic versus homotopic graft placement." Prog Brain Res **127**: 233-65.

Witt, T. C. and L. C. Triarhou (1995). "Transplantation of mesencephalic cell suspensions from wild-type and heterozygous Weaver mice into the denervated striatum: assessing the role of graft-derived dopaminergic dendrites in the recovery of function." Cell Transplant **4**(3): 323-33.

X-Z

Xu, G., Z. Xiong, *et al*. (2010). "Catalpol attenuates MPTP induced neuronal degeneration of nigral-striatal dopaminergic pathway in mice through elevating glial cell derived neurotrophic factor in striatum." Neuroscience **167**(1): 174-84.

Yan, Q., C. Matheson, *et al*. (1995). "In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons." Nature **373**(6512): 341-4.

Yetnikoff, L., H. N. Lavezzi, *et al*. (2014). "An update on the connections of the ventral mesencephalic dopaminergic complex." Neuroscience **282C**: 23-48.

Youdim, M. B., D. Edmondson, *et al*. (2006). "The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors." Nat Rev Neurosci **7**(4): 295-309.

Yurek, D. M. (1997). "Intranigral transplants of fetal ventral mesencephalic tissue attenuate D1-agonist-induced rotational behavior." Exp Neurol **143**(1): 1-9.

Yurek, D. M. and A. Fletcher-Turner (2001). "Differential expression of GDNF, BDNF, and NT-3 in the aging nigrostriatal system following a neurotoxic lesion." Brain Res **891**(1-2): 228-35.

Zhou, J., B. Pliego-Rivero, *et al*. (1996). "The BDNF content of postnatal and adult rat brain: the effects of 6-hydroxydopamine lesions in adult brain." Brain Res Dev Brain Res **97**(2): 297-303.

Zuddas, A., G. U. Corsini, *et al*. (1991). "Specific Reinnervation of Lesioned Mouse Striatum by Grafted Mesencephalic Dopaminergic Neurons." Eur J Neurosci **3**(1): 72-85.

Zuo, L. and M. S. Motherwell (2013). "The impact of reactive oxygen species and genetic mitochondrial mutations in Parkinson's disease." Gene **532**(1): 18-23.