

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

Inserm UMR 930, ÉQUIPE n°3

THÈSE présentée par :

Serge MAIA

soutenue le : **16 novembre 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**

Discipline/ Spécialité : **Sciences de la Vie**

**IMAGERIE MOLÉCULAIRE DE LA
NEUROINFLAMMATION
DANS LA MALADIE DE PARKINSON :
Étude préclinique dans un modèle animal de rat**

THÈSE dirigée par :
CHALON Sylvie

Directeur de Recherche Inserm, Tours

RAPPORTEURS :
BOTTLAENDER Michel
ZIMMER Luc

Chercheur HDR, Commissariat à l'Énergie Atomique, Gif-sur-Yvette
Professeur des Universités, Université de Lyon 1

JURY :

BOTTLAENDER Michel
CHALON Sylvie
GUILLOTEAU Denis
HOUETO Jean-Luc
SANTIAGO RIBEIRO Maria-Joao
ZIMMER Luc

Chercheur, Commissariat à l'Énergie Atomique, Gif-sur-Yvette
DR Inserm, Tours
Professeur des Universités, Université de Tours
Professeur des Universités, Université de Poitiers
Professeur des Universités, Université de Poitiers
Professeur des Universités, Université

Remerciements

RESUME

Bien que les mécanismes moléculaires précis à l'origine de la neurodégénérescence dopaminergique ne soient pas encore totalement connus, un ensemble de preuves épidémiologiques, cliniques et expérimentales indiquent que la neuroinflammation peut avoir un rôle important dans la pathogenèse de la MP. L'étude des liens spatio-temporels entre la neuroinflammation et la neurodégénérescence au cours de la MP pourrait améliorer la compréhension du mécanisme physiopathologique et aussi l'accessibilité à un diagnostic précoce et/ou à de nouvelles approches thérapeutiques anti-inflammatoires. Le développement actuel des méthodes non invasives d'imagerie moléculaire permettant la surveillance directe du processus de neuroinflammation devrait être utile à cet effet. La cible moléculaire de choix dans ce domaine est la protéine de 18 kDa translocateur (TSPO), biomarqueur sensible associée à la neuroinflammation, qui est surexprimé dans les microglies activées.

Dans le travail présenté ici nous avons réalisé l'évaluation longitudinale des deux mécanismes physiopathologiques en parallèle avec les modifications de la fonction dopaminergique à plusieurs points au cours du temps après lésion à la 6-OHDA chez le rat, modèle qui imite un stade précoce de la MP. Après l'administration unilatérale, intra-striatale de la 6-OHDA, nous avons quantifié l'évolution temporelle de la TSPO, de l'immunoréactivité TH et du DAT dans le striatum et la SNC de 3 à 56 jours post-lésion (jpl). L'augmentation de la liaison des ligands de la TSPO utilisés, c-à-d [3H]-PK11195 et [125I]-CLINDE, a été observée dans le striatum lésé à 3, 7 et 14 jpl, suivie d'un retour progressif à un niveau basal à 56 jpl. Le profil de liaison dans la SNC a montré une augmentation progressive de la fixation qui débute à 3 jpl, avec un pic à 14 jpl, et diminue progressivement jusqu'à ce que 56 jpl.

Dans ce modèle de rongeur de la MP, les processus neuroinflammatoire et neurodégénératif surviennent de façon concomitante. La présence transitoire de l'activation microgliale pourrait être impliquée dans l'apparition et l'installation durable de la perte neuronale dopaminergique. Cette étude confirme donc le lien entre la neuroinflammation et de la neurodégénérescence et met aussi l'accent sur l'intérêt du CLINDE comme traceur potentiel de la neuroinflammation in-vivo en fournissant des informations précieuses pour le diagnostic précoce et le suivi longitudinal de la progression de la maladie, avec des applications potentielles chez l'homme. En effet, la détection précoce de la neuroinflammation, de façon antérieure à une perte neuronale cliniquement significative, pourrait devenir un enjeu majeur dans la prise en charge pré-symptomatique de la MP. Dans ce sens, nous mettons en évidence l'existence d'une fenêtre thérapeutique, survenant juste après la lésion, qui peut être proposé pour l'introduction de traitements anti-inflammatoires qui viseraient à ralentir le processus neurodégénératif. La poursuite de l'exploration des relations entre la neuroinflammation et la neurodégénérescence in-vivo dans le même modèle animal avec la méthode d'imagerie micro-TEP, transposable à l'homme, en utilisant en parallèle le [18F]-DPA714 pour le TSPO et le [18F]-LBT999 pour le DAT est en cours.

Mots clés : Microglie, TSPO (18 kDa), 6-OHDA, Maladie de Parkinson, TEMP, TEP

RESUME EN ANGLAIS

Although the precise molecular mechanisms causing the dopaminergic neurodegeneration are still not totally understood, a body of epidemiological, clinical and experimental evidence indicates that neuroinflammation may have an important role in the pathogenesis of PD. Study of spatio-temporal links between neuroinflammation and neurodegeneration during the course of PD would improve understanding of the physiopathological mechanism and also accessibility to early diagnosis and/or new anti-inflammatory therapeutic approaches. The current development of non-invasive molecular imaging methods allowing direct monitoring of the neuroinflammation process should be valuable for this purpose. The molecular target of choice in this field is the 18 kDa translocator protein (TSPO), a sensitive biomarker associated with neuroinflammation, which is over-expressed in activated microglia.

In the study presented here we achieved the longitudinal evaluation of both physiopathological mechanisms in parallel with the modifications of dopaminergic function at several time-points after 6-OHDA lesion in the rat that mimics an early stage of PD. After unilateral intra-striatal 6-OHDA administration, we quantified the temporal evolution of the TSPO, TH immunoreactivity and DAT in the striatum and the SNc from 3 to 56 days post-lesion (dpl). Increased binding of TSPO ligands used, i.e. [3H]PK11195 and [125I]CLINDE, was observed in the lesioned striatum at 3, 7 and 14 dpl, followed by a progressive return to the basal level at 56 dpl. The binding profile in the SNc showed progressive binding beginning at 3 dpl, peaking at 14 dpl, and progressively decreasing until 56 dpl.

In this rodent model of PD, the neuroinflammatory and neurodegenerative processes occurred concomitantly. The transitory occurrence of microglial activation could be involved in the advent and the lasting installation of dopaminergic neuron loss. This study supports the link between neuroinflammation and neurodegeneration and emphasizes the interest of CLINDE as potent *in vivo* tracer of neuroinflammation by providing valuable information for early diagnosis and longitudinal follow-up of disease progression, with potential applications to human patients. Indeed, early detection of neuroinflammation, prior to a clinically significant loss of neurons, could become a major issue in the management of pre-symptomatic PD. To support this idea, we demonstrate the existence of a therapeutic window, occurring just after the lesion, which may be proposed for the introduction of anti-inflammatory treatments that aimed to slow the neurodegenerative process. Further exploration of the relationship between neuroinflammation and neurodegeneration *in vivo* in the same animal model with the method of micro-PET imaging, transposable to humans, using in parallel the [18F]-DPA714 for TSPO and [18F]-LBT999 for DAT is pending.

Key words : Microglia, TSPO (18 kDa), 6-OHDA, Parkinson's disease, SPECT, PET

TABLE DES MATIERES

RESUME	3
RESUME EN ANGLAIS	4
TABLE DES MATIERES	5
ABBREVIATIONS	10
LISTE DES TABLEAUX	12
LISTE DES FIGURES	13
INTRODUCTION	16
CHAPITRE I : SYSTEME DOPAMINERGIQUE ET MALADIE DE PARKINSON	18
I. Le Système Dopaminergique	19
A. La Dopamine et les neurones dopaminergiques.....	19
B. Métabolisme de la dopamine.....	19
1. Synthèse	19
2. Stockage et libération	20
3. Neurotransmission et « re-capture ».....	21
4. Catabolisme.....	22
C. Les récepteurs dopaminergiques	23
D. Les voies dopaminergiques centrales.....	24
1. La voie méso-cortico-limbique	24
2. La voie tubéro-infundibulaire.....	25
3. La voie nigro-striée	25
II. La Maladie de Parkinson.....	26
A. Historique	26
B. Epidemiologie	26
C. Sémiologie.....	27
1. Troubles moteurs et autres signes	27
2. Critères cliniques et diagnostic différentiels	28
3. Evolution de la maladie.....	29
D. Etiologie	29
1. Facteurs génétiques	29
2. Facteurs environnementaux.....	30
E. Physiopathologie	31

1.	Caractéristiques de l'atteinte neuronale	31
a)	Anatomo-pathologie	31
b)	Histopathologie	32
2.	Pathogenèse des neurones dopaminergiques.....	33
a)	Le Stress oxydatif.....	34
b)	Le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale	35
c)	L'excitotoxicité	37
d)	L'alpha-synucléine	38
e)	L'Activation gliale	39
F.	Les traitements	40
1.	Les traitements pharmacologiques	40
2.	Les traitements chirurgicaux	41
3.	Les nouvelles stratégies thérapeutiques	42
a)	Thérapie génique	42
b)	Transplantation de cellules.....	42
c)	Approches thérapeutiques neuroprotectrices et anti-inflammatoires	43
 CHAPITRE II : MODELES ANIMAUX DE LA MALADIE DE PARKINSON.....		48
I.	Modèles d'intoxication à la 6-OHDA	49
1.	Mécanisme d'action de la 6-OHDA.....	49
2.	Les différents modèles animaux utilisant la 6-OHDA	51
II.	Modèle d'intoxication au MPTP.....	55
1.	Mécanisme d'action du MPTP	55
2.	Les différents modèles animaux utilisant le MPTP	56
III.	Modèle d'intoxication au LPS.....	59
1.	Mécanisme d'action du LPS	59
2.	Les différents modèles animaux utilisant le LPS	60
IV.	Modèle d'intoxication à la Roténone	62
1.	Mécanisme d'action de la roténone.....	62
2.	Les différents modèles animaux utilisant la roténone	63
V.	Modèles transgéniques sur-exprimants l'α-synucléine.....	64
1.	Mécanisme d'action de l'α-synucléine	64
2.	Principes d'obtention de modèles transgéniques	64
3.	Les différents modèles animaux transgéniques surexprimant l'α-synucléine	65
 CHAPITRE III : NEUROINFLAMMATION ET MALADIE DE PARKINSON.....		67
I.	La Neuroinflammation	68
A.	Physiopathologie	68
1.	Neuroinflammation aiguë.....	68
2.	Neuroinflammation chronique	69
B.	La Microglie	70
C.	L'activation microgliale	71
II.	La Neuroinflammation dans la Maladie de Parkinson.....	74

A. Facteurs de risque.....	74
B. Perméabilité de la Barrière Hemato Encéphalique	75
C. Activation microgliale.....	75
D. Stress oxydatif.....	77
E. Alpha-synucleine.....	79
F. Médiateurs pro-inflammatoires	80
G. Immunité innée et adaptative	82
1. Immunité Innée	82
2. Immunité Adaptative.....	83

CHAPITRE IV : IMAGERIE MOLÉCULAIRE NUCLEAIRE DE LA NEURODEGENERESCENCE ET DE LA NEUROINFLAMMATION DANS LA MALADIE DE PARKINSON..... 86

I. Principes de l'imagerie moléculaire nucléaire	87
A. Imagerie moléculaire appliquée à la Médecine nucléaire	87
B. Techniques d'imagerie moléculaire par émission.....	88
1. Tomographie par Emission MonoPhotonique (TEMP).....	88
2. Tomographie par Emission de Positons (TEP).....	89
3. Place de l'imagerie TEMP relativement à l'imagerie TEP.....	90
C. Imagerie moléculaire en recherche pré-clinique	91
1. Techniques d'imagerie in-vivo : micro-TEMP et micro-TEP	92
2. Technique d'imagerie in-vitro : l'autoradiographie	92
II. Imagerie moléculaire de la perte neuronale dopaminergique : Cibles potentielles.....	93
A. Le métabolisme et le transport vésiculaire de la Dopamine.....	95
B. Les récepteurs dopaminergiques	96
D. Les transporteurs de la Dopamine (DAT).....	98
1. Le FP-CIT	99
2. Le TRODAT-1	100
3. Le PE2I.....	101
4. Le LBT-999.....	102
III. Imagerie moléculaire de la Neuroinflammation : Cibles potentielles.....	104
A. La Cyclooxygénase-2 (COX-2)	104
B. La protéine de translocation 18kDa (TSPO).....	105
1. Découverte et caractérisation pharmacologique de la TSPO.....	105
2. Structure et Distribution de la TSPO.....	106
3. Fonctions de la TSPO.....	107
4. Expression de la TSPO cerveau sain / neuroinflammation	108
5. Variabilité interindividuelle de l'expression de la TSPO.....	109
C. Radioligands pour l'imagerie moléculaire de la TSPO.....	109
1. Les dérivés carboxamides d'isoquinoline : Le PK-11195	110
2. Les dérivés phénoxyphényl-acétamide	112
a) Le DAA1106 et FEDAA1106.....	112

b) Le PBR28 et PBR06.....	113
3. Les dérivés pyrazolopyrimidine : DPA-713 et DPA-714.....	114
4. Les dérivés imidazopyridine acétamide	115
a) Le PBR111	116
b) Le CLINDE	116

CHAPITRE V: SUIVI LONGITUDINAL ET PARALLELE DE L'ACTIVATION MICROGLIALE ET DE LA PERTE NEURONALE DOPAMINERGIQUE DANS UN MODELE ANIMAL DE MP CHEZ LE RAT..... 119

I. Objectifs du travail experimental	120
II. Matériels et méthodes.....	121
A. Modèle animal.....	121
1. Les animaux	121
2. Lésion intrastriatale unilatérale à la 6-OHDA.....	121
B. Radioligands utilisés	122
1. Le [3H]-PK11195.....	122
2. Le [125I]-PE2I	123
3. Le [125I]-CLINDE.....	126
C. Protocole expérimental.....	129
D. Le test comportemental	130
E. Etudes in-vitro sur coupes de cerveaux.....	130
1. Immunohistochimie anti-TH.....	131
2. Autoradiographies in-vitro du DAT et de la TSPO.....	132
F. Etude <i>ex-vivo</i> de la TSPO par autoradiographie avec du [125I]-CLINDE.....	133
G. Traitement statistique des données.....	134
III. Résultats	135
A. Le test comportemental	135
B. Etudes in-vitro sur coupes de cerveaux.....	135
1. Immunohistochimie anti-TH.....	136
2. Autoradiographie du DAT au [125I]-PE2I	139
3. Autoradiographie de la TSPO au [3H]-PK11195	142
C. Etude <i>ex-vivo</i> de la TSPO par autoradiographie avec du [125I]-CLINDE	145
IV. Discussion	148
A. Choix du modèle animal utilisé.....	148
B. Profil cinétique de la perte neuronale et de la neuroinflammation	150
1. Profil cinétique de la perte neuronale.....	150
2. Profil cinétique de la neuroinflammation.....	152
3. Profil cinétique de la neuroinflammation / perte neuronale.....	154
4. Contribution microglie / astroglie dans l'expression de la TSPO.....	156
C. Évaluation du [125I]-CLINDE dans un modèle de lésion à la 6-OHDA.....	157
V. Perspectives.....	159

A. Utilisation de l'imagerie moléculaire <i>in-vivo</i>	159
B. Exploration de nouvelles approches thérapeutiques neuroprotectrices et anti-inflammatoires.....	160
CONCLUSION.....	163
ANNEXE.....	165
BIBLIOGRAPHIE.....	177

ABBREVIATIONS

AGPI n-3 : Acides gras polyinsaturés n-3
AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AMP : Adényl monophosphate
AMPA : acide- α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionique
AMS : Atrophie multi-systématisée
ATP : Adényl triphosphate
A53T, A30P et E46K : mutations ponctuelles du gène codant pour l' α -synucléine
BHE : Barrière hémato-encéphalique
Bq : Becquerel
BP : Potentiel de liaison (Binding Potential)
CBR : Récepteur central aux benzodiazépines
CD : Cluster de différenciation membranaire
CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance
CLINDE : 6-chloro-2-(4'iodophényl)-3-(N,N-diéthyl)-imidazol[1,2-a]pyridine-3-acétamide
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CoQ : CoEnzyme Q
COX-2 : Cyclo-oxygénase-2
COMT : Catécholamine-O-méthyltransférase
DA : Dopamine
DAB : 3,3'-diaminobenzidine
DAT : Transporteur de la Dopamine
DDC : Dopa décarboxylase
DHA : Acide docosahexaénoïque
DOPAC : Acide dihydroxyphénylacétique
GABA : acide- γ -aminobutyrique
GDNF : Facteur neurotrophique dérivé de la glie
HVA : Acide homovanillique
IL : Interleukine
IRM : Imagerie par résonance magnétique
Kd : Constante de dissociation
kDa : kiloDalton
keV : kilo electronVolt
LCR : Liquide céphalo-rachidien
LDL : Lipoprotéine de basse densité
LPS : Lipopolysaccharide
MAO : Mono-amine oxydase
MBF : Faisceau médian du télencéphale

Mol ou M : Molaire
MP : Maladie de Parkinson
MPTP : 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
NADPH-oxidase : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
NET : Transporteur de la noradrénaline
NFkB : Facteur Neurotrophique kB
NMDA : acide N-méthyl-D-aspartique
iNOS : Nitric oxide synthase
PBR : Récepteur périphérique aux benzodiazépines
PBS : Tampon phosphate (Phosphate Buffer Saline)
PE2I : (E)-N-(3-iodoprop-2-enyl)-2beta-carbomethoxy-3beta-(4'methylphenyl)-nortropane
PFA : Paraformaldehyde
PK11195 : 1-(2-chlorophényl)-N-méthyl-N-(1-méthylpropyl)-3-isoquinoline-carboxamide
PPAR : Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes
PRAX-1 : Protéine associée au récepteur périphérique aux benzodiazepines
PSP : Paralyse supranucléaire progressive
RD2 : Récepteur de la Dopamine D2
ROS : Radicaux libres oxygénés
RNS : Radicaux libres azotés
SERT : Transporteur de la sérotonine
SNc : Substance Noire Compacte
SNC : Système nerveux central
SNCA : Gène codant pour l' α -synucléine
TDM : Tomodensitométrie
TEP : Tomographie par Emission de Positons
TEMP : Tomographie par Emission MonoPhotonique
TH : Tyrosine Hydroxylase
THi : Immunoréactivité à la TH
TLE : Transfert linéique d'énergie
TNF : Facteur de necrose tumorale
TSPO : Protéine translocatrice 18kDa
UPDRS: Echelle d'évaluation globale unifiée de la maladie de Parkinson
VMAT2: Transporteur vésiculaire des monoamines de type 2
VDAC : Canaux anioniques voltage dépendants ou porine mitochondriale
VPP : Valeur predictive positive
6-OHDA : 6-Hydroxy-dopamine

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Tableau récapitulatif des modèles transgéniques α -synucleine actuels et de leurs caractéristiques phénotypiques. D'après Dawson et al. 2010

Tableau II : récapitulatif des caractéristiques principales des radioligands marqueurs des RD2 dopaminergiques

Tableau III : récapitulatif des caractéristiques principales des radioligands marqueurs du DAT

Tableau IV : Principales caractéristiques des récepteurs des benzodiazépines de type central et périphérique, d'après Zisterer et Williams, 1997

Tableau V : récapitulatif des caractéristiques principales des radioligands marqueurs de la TSPO

Tableau VI : récapitulatif de l'état de développement des principaux radioligands marqueurs de la TSPO : Radiosynthèse, études pré-cliniques in-vivo, modèles de neuroinflammation, études chez l'homme sain et études cliniques / pathologies neuroinflammatoires

Tableau VII : Conditions expérimentales des études *in-vitro* par autoradiographie pour l'étude du DAT avec du [125I]-PE2I et pour l'étude de la TSPO avec du [3H]-PK11195

Tableau VIII : Intensités du comportement rotatoire pour les groupes de lésion 6-OHDA et pour les groupes Sham exprimées en nombre de tours / min moyen \pm SEM

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Métabolisme de la dopamine, d'après Landry et Gies, 2009

Figure 2 : Fonctionnement de la synapse dopaminergique – Source : Thèse de Science de Gaëlle Bouchez, 2008

Figure 3 : Les différentes voies centrales dopaminergiques, Source : site www.Pharmaweb.com, Université de Lille, consultation 20 avril 2012

Figure 4 : Schéma des ganglions de la base. D'après Gisquet-Verrier, Epilepsies 2006

Figure 5 : Représentation graphique de la relation entre la dégénérescence dopaminergique et l'apparition des signes cliniques, d'après Langstone et al. 1985

Figure 6 : Coupes de tissu de mésencéphale, à gauche chez un sujet parkinsonien, à droite chez un sujet témoin montrant une dépigmentation chez le sujet parkinsonien au niveau de la SN reflet de la dégénérescence des neurones dopaminergiques. D'après Youdim et Riederer, 1997

Figure 7 : Corps de Lewy – D'après Etienne Hirsch – Source : Site www.INSERM consultation le 27 avril 2012

Figure 8 : Schéma des hypothèses étiologiques et physiopathologiques de la mort neuronale dopaminergique

Figure 9 : Productions et implication dans les processus biologiques des radicaux libres oxygénés (ROS) et azotés (RNS) - site de la bibliothèque de l'université de Laval www.bibl.ulaval.ca/, consultation le 26 avril 2012

Figure 10 : Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale – site www.sciencebio.com, consultation le 26 avril 2012

Figure 11 : Schéma du mécanisme excitotoxique suite à une agression cérébrale. D'après Degos et al. 2008

Figure 12 : Mécanisme de la toxicité de l'alpha-synucleine, d'après Cookson 2009.

Figure 13 : Mécanismes hypothétiques du mécanisme d'action de la 6-OHDA, d'après Blum et al. 2001

Figure 14 : Mécanismes hypothétiques du mécanisme d'action du MPTP, d'après Blum et al. 2001

Figure 15 : Schéma hypothétique du mécanisme d'action du LPS, d'après Dutta et al. 2008

Figure 16 : Schéma d'inhibition du complexe I mitochondrial par la rotenone, d'après Bailey et al. 1999

Figure 17 : Cellules microgliales sous forme rémifiée, source : site www.futura-santé.com, consultation le 30 avril 2012

Figure 18 : Activation des cellules microgliales se traduisant par des modifications morphologiques permettant aux cellules de migrer par mouvement amiboïde vers la zone cérébrale atteinte, d'après Stence et al. 2001

Figure 19 : Cercle vicieux entre activation microgliale et neurodégénérescence dopaminergique, d'après Collins et al. 2012

Figure 20 : Lien entre le stress oxydatif, la neuroinflammation et la neurodégénérescence dopaminergique dans la MP. D'après Hirsch et Hunot, 2009

Figure 21 : Mécanismes sous-jacents aux effets délétères de la neuroinflammation dans la MP via la libération de médiateurs pro-inflammatoires. D'après Hirsch et Hunot, 2009

Figure 22 : Schéma de la contribution immunitaire à la pathogenèse de la MP. D'après Mosley et al. 2011

Figure 23 : Schéma du principe de détection des têtes de caméra TEMP

Figure 24 : Schéma du principe de détection des caméras TEP avec le phénomène d'annihilation des positons

Figure 25 : Schéma de la synapse dopaminergique striatale et des cibles potentielles en imagerie moléculaire

Figure 26 : Liste non exhaustive des radioligands actuellement disponibles dans l'imagerie moléculaire de la terminaison synaptique dopaminergique

Figure 27 : Image TEP de 18F-Dopa a) sujet control, b) patient MP. D'après Redgrave et al. 2010

Figure 28 : Images comparatives des RD2 avec du [11C]-raclopride chez un sujet contrôle (CON), un sujet atteint d'AMS (MSA) et un sujet atteint de MP (PD). D'après Van Laere et al. 2010.

Figure 29 : Images TEMP avec du [123I]-FPCIT. A gauche, chez un sujet sain, à droite chez un sujet parkinsonien à un stade précoce montrant une diminution asymétrique de la fixation. D'après Brooks 2010

Figure 30 : Images TEMP avec du [123I]-PE2I. Ces images montrent une bonne corrélation entre le stade clinique et la fixation du [123I]-PE2I sur les DAT. D'après Prunier et al. 2003

Figure 31 : Images TEP avec du [18F]-LBT999 chez le primate non-humain, d'après Varrone et al. 2011

Figure 32 : Structure du complexe multimérique mitochondrial de la protéine translocatrice (TSPO) et son rôle dans la synthèse des stéroïdes, d'après Papadopoulos et al. 2006.

Figure 33 : Echelle chronologique de l'utilisation des radioligands marqueurs spécifiques de la TSPO utilisables en imagerie moléculaire TEMP ou TEP (selon l'année de la première injection à l'homme). Inspirée de la thèse de science de Nicolas Arlicot, 2010.

Figure 34 : Images de coupes transversales et coronales avec du [11C]-PK11195. Chez le patient atteint de la MP (A et B), la fixation est augmentée dans les noyaux gris centraux et les régions frontales par rapport au sujet témoin sain (C et D). D'après Gerhard et al. 2006

Figure 35 : Imagerie TEP avec du [11C]-PBR28 de coupes axiales de cerveau chez un sujet atteint d'une Epilepsie du lobe temporal en ictal. D'après Hirvonen et al. 2012

Figure 36 : Images TEP avec du 18F-DPA714. A gauche, image chez un sujet controle, à droite image chez un sujet atteint de SLA. Service de Médecine nucléaire du CHRU de Tours (Pr Santiago-Ribeiro)

Figure 37 : Schéma représentant les coordonnées stéréotaxiques utilisées pour l'injection de la 6-OHDA dans le striatum (coupe coronale, bregma +0.5 selon Atlas Paxinos et Watson, 1986)

Figure 38 : Schéma de synthèse du précurseur stannique du PE2I

Figure 39 : Schéma de radiosynthèse du [125I]-PE2I

Figure 40 : Chromatogrammes CLHP UV/radioactivité de purification du [125I]-PE2I (en haut).

Chromatogrammes CLHP UV/radioactivité lors d'un contrôle de pureté radiochimique du [125I]-PE2I par co-injection avec du PE2I froid (en bas)

Figure 41 : Schéma de synthèse du précurseur stannique du CLINDE

Figure 42 : Schéma de radiosynthèse du [125I]-CLINDE

Figure 43 : Chromatogrammes CLHP UV/radioactivité de purification du [125I]-CLINDE (en haut). Chromatogrammes CLHP UV/radioactivité lors d'un contrôle de pureté radiochimique du [125I]-CLINDE par co-injection avec du CLINDE froid (en bas)

Figure 44 : Schéma du protocole expérimental de l'étude.

Figure 45 : Principe de détection immunohistochimique de la perte neuronale dopaminergique à l'aide de l'anticorps primaire anti-TH.

Figure 46 : Immunohistochimie anti-TH (TH-i) dans a) le striatum et b) la SNc.

Figure 47 : Etude *in-vitro* par autoradiographie de la densité du DAT avec du [125I]-PE2I dans a) le striatum et b) la SNc.

Figure 48 : Etude *in-vitro* par autoradiographie de la densité de la TSPO avec du [3H] PK-11195 dans a) le striatum et b) la SNc.

Figure 49 : Etude *ex-vivo* par autoradiographie de la densité de la TSPO avec du [125I]-CLINDE dans a) le striatum et b) la SNc.

INTRODUCTION

Les pathologies neurodégénératives représentent un problème de santé publique majeur dans les pays industrialisés dont l'âge moyen de la population est en constante augmentation. La maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative fréquente, liée à l'âge et caractérisée par la disparition prématurée, lente et progressive d'un certain nombre de neurones dopaminergiques au niveau des noyaux gris centraux, en particulier de la substance noire *pars compacta* (SNc), conduisant à un déficit en dopamine (DA) dans les zones de projection, c'est à dire le noyau caudé et le putamen dans le cerveau des primates et le striatum dans le cerveau des rongeurs. Cette perte est responsable des symptômes moteurs survenant dans cette maladie tels que l'akinésie ou la bradykinésie, la rigidité musculaire et les tremblements des membres au repos (Xia et Mao, 2012).

Bien que les mécanismes moléculaires précis provoquant la dégénérescence des neurones dopaminergiques ne soient pas encore totalement élucidés, de nombreuses études épidémiologiques, cliniques et expérimentales indiquent que la neuroinflammation associée à l'activation de la microglie peut avoir un rôle important dans la pathogenèse de la MP (Tansey et al. 2007, 2010 ; Whitton 2007; Hirsch et Hunot 2009). Plusieurs études ont mis en évidence le fait que la mort neuronale dopaminergique est associée à l'activation microgliale chez les patients parkinsoniens. Cette relation a pu être évaluée à la fois en *post mortem* (McGeer et al. 1988, 2001) et *in vivo* par les méthodes d'imagerie moléculaire comme la Tomographie par Emission de Positons (TEP) (Ouchi et al. 2005; Gerhard et al. 2006).

Une connaissance plus précise des liens spacio-temporels existant entre la neuroinflammation et la neurodégénérescence dans la survenue et l'évolution de la MP, pourrait permettre d'améliorer le diagnostic précoce et / ou de définir l'existence d'une fenêtre thérapeutique potentielle ouvrant la possibilité de la mise en place de protocoles neuroprotecteurs à travers l'utilisation de facteurs anti-inflammatoires. En effet, une des questions majeures concernant l'étiologie de ces atteintes neuronales est de déterminer si la neuroinflammation précède la destruction neuronale, ou si au contraire c'est la mort neuronale qui déclenche le processus inflammatoire (Cicchetti et al. 2002 ; Venneti et al. 2006).

Pour nous aider dans cette démarche, le développement actuel des modalités d'imagerie moléculaires non-invasives comme la Tomographie par émission monophotonique (TEMP) ou la TEP, permettant de suivre directement les processus de neurodégénérescence et de neuroinflammation, peuvent être d'une grande valeur. Dans ce domaine, la cible moléculaire de

choix pour l'étude de la neuroinflammation est la protéine de translocation 18 kDa (TSPO) qui est surexprimée à la surface des mitochondries dans la microglie activée, étant ainsi un biomarqueur sensible associée à la neuroinflammation (Chen et Guilarte 2008). La survenue d'une activation microgliale dans la MP a déjà été démontrée en utilisant la technique d'imagerie moléculaire TEP avec le [11C]-PK11195 comme ligand de la TSPO (Gerhard et al 2006; Ouchi et al 2005, 2009). Cependant, ce traceur présente plusieurs inconvénients qui limitent son champ d'utilisation, une demi-vie courte du [11C] (20 min), un faible passage à travers la barrière hémato-encéphalique et une forte fixation non spécifique (Venneti et al. 2006; Bartels et al 2010). Par conséquent, plusieurs équipes de recherche développent actuellement de nouveaux traceurs alternatifs qui présentent une grande spécificité et une meilleure capacité à quantifier l'expression de la TSPO *in vivo* en imagerie TEP ou TEMP. Le CLINDE (6-chloro-2-(4'iodophenyl) -3 - (N, N-diéthyl)-imidazo [1,2-a] pyridine-3-acétamide) nouveau traceur TEMP semble être très prometteur, avec une grande affinité pour la TSPO (Mattner et al. 2008) et une sensibilité élevée de détection de l'activation microgliale consécutive à des lésions cérébrales chez les animaux (Arlicot et al. 2008, 2010).

C'est dans ce contexte que nous avons décidé d'utiliser le CLINDE pour réaliser un suivi dans le temps de la densité de la TSPO dans un modèle animal de la MP, après une lésion dans le cerveau de rat avec de la 6-hydroxydopamine (6-OHDA). La dégénérescence des neurones dopaminergiques nigro-striés a été suivie en parallèle en utilisant deux marqueurs complémentaires : l'immunoréactivité à la tyrosine hydroxylase (anti-TH) et la densité des transporteurs de la dopamine (DAT).

L'objectif principal du travail présenté dans ce mémoire est de définir, dans le modèle animal de MP étudié, la cinétique de survenue et d'évolution de la neuroinflammation et de la neurodégénérescence l'une par rapport à l'autre, ceci afin d'approfondir la connaissance des liens spacio-temporels qui existent entre ces deux phénomènes physiopathologiques. L'objectif secondaire est l'évaluation du CLINDE comme marqueur de la TSPO pour l'étude de la neuroinflammation dans le modèle animal de la MP utilisé.

CHAPITRE I : SYSTEME DOPAMINERGIQUE ET MALADIE DE PARKINSON

I. LE SYSTÈME DOPAMINERGIQUE

A. La Dopamine et les neurones dopaminergiques

La dopamine (DA) est un neurotransmetteur appartenant à la famille des catécholamines. La DA ne traverse pas la Barrière Hémato Encéphalique (BHE), elle est synthétisée de novo dans le cerveau à partir d'un acide aminé précurseur, la tyrosine. Elle a été nommée ainsi car il s'agit d'une monoamine dont le précurseur direct est le 3,4-dihydroxyphénylalanine (L-Dopa). La DA est le premier neurotransmetteur synthétisé dans la chaîne de biosynthèse des catécholamines, c'est-à-dire qu'elle est le précurseur de la noradrénaline et de l'adrénaline.

Les neurones dopaminergiques ne représentent qu'environ 0.3% des cellules du cerveau. Néanmoins, ils jouent un rôle essentiel dans plusieurs de nos comportements. Leur fonction est particulièrement visible lors de la survenue de pathologies entraînant un déficit ou un excès de DA. Lors de la destruction progressive de ces neurones entraînant un déficit de DA, les symptômes moteurs caractéristiques de la MP apparaissent. Alors qu'un excès de DA dans certaines régions du cerveau induit l'apparition de symptômes associés à la schizophrénie.

B. Métabolisme de la dopamine

1. Synthèse

La tyrosine, acide aminé essentiel précurseur de la voie de synthèse de la DA, est apportée par l'alimentation et arrive au cerveau après le passage de la BHE. Les neurones dopaminergiques captent la tyrosine par un mécanisme de transport actif. La DA est synthétisée dans les neurones au niveau des terminaisons synaptiques grâce à l'action successive de deux enzymes : la tyrosine hydroxylase (TH) qui transforme la tyrosine en L-Dopa par hydroxylation à l'aide de son cofacteur la tétrahydrobioptérine, du fait de la lenteur de cette réaction, l'action de la TH constitue l'étape limitante de la synthèse de la DA. Les mécanismes de la régulation de la synthèse de DA s'exercent donc principalement sur cette enzyme, puis par la DOPA-décarboxylase (DDC) assurant la décarboxylation de cette dernière pour donner la DA à l'aide de son cofacteur, le phosphate de pyridoxal, qui est une forme activée de la vitamine B6. Cette

enzyme présente une vitesse de réaction beaucoup plus importante que celle de la TH et ne constitue pas une étape limitante dans la synthèse de la DA. C'est pourquoi l'administration de L-Dopa permet d'accroître la synthèse de DA (Figure 1).

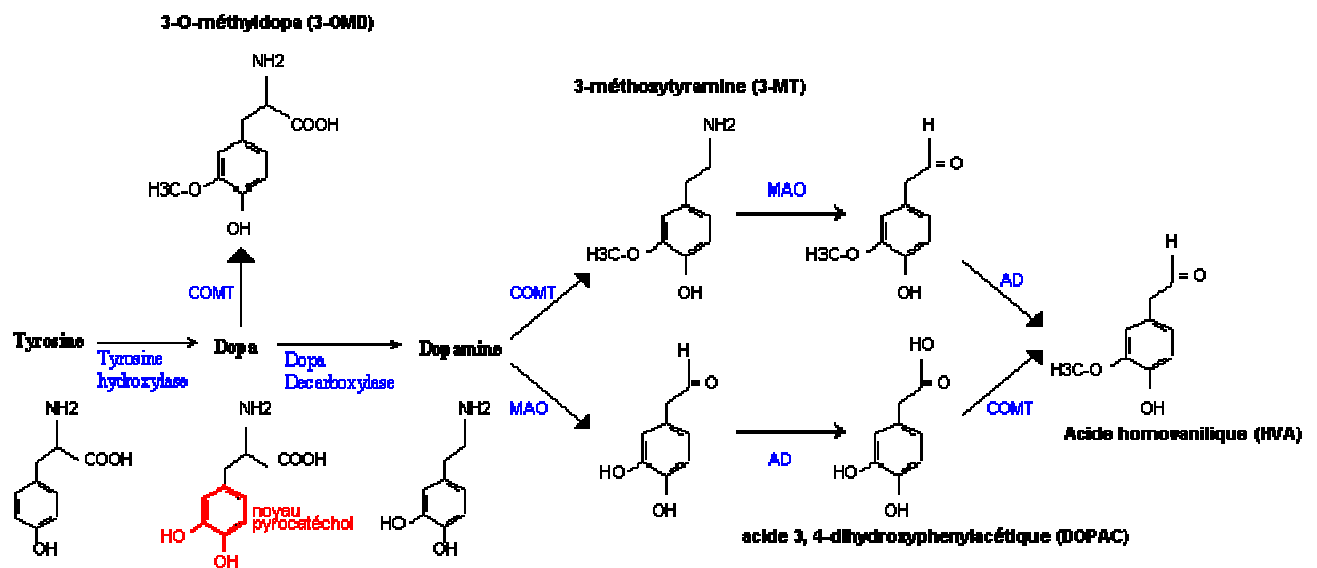


Figure 1 : Métabolisme de la dopamine, d'après Landry et Gies 2009

2. Stockage et libération

Une fois synthétisée dans le cytosol du neurone, la DA est stockée dans des vésicules qui empêchent sa dégradation en acide dihydroxyphénylacétique (DOPAC) par la monoamine oxydase mitochondriale (MAO). Ces vésicules de stockage sont localisées au niveau des terminaisons synaptiques (Figure 2). La DA est concentrée dans les vésicules par un système de transport actif utilisant le transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT2). La DA est donc répartie entre un compartiment vésiculaire (plus de 80%) et un compartiment cytoplasmique. La DA néosynthétisée est libérée dans l'espace synaptique lors de l'arrivée d'un potentiel d'action par les canaux calciques situés au niveau de la membrane pré-synaptique et induit par l'entrée de Ca²⁺. La DA est alors libérée dans la fente synaptique par exocytose.

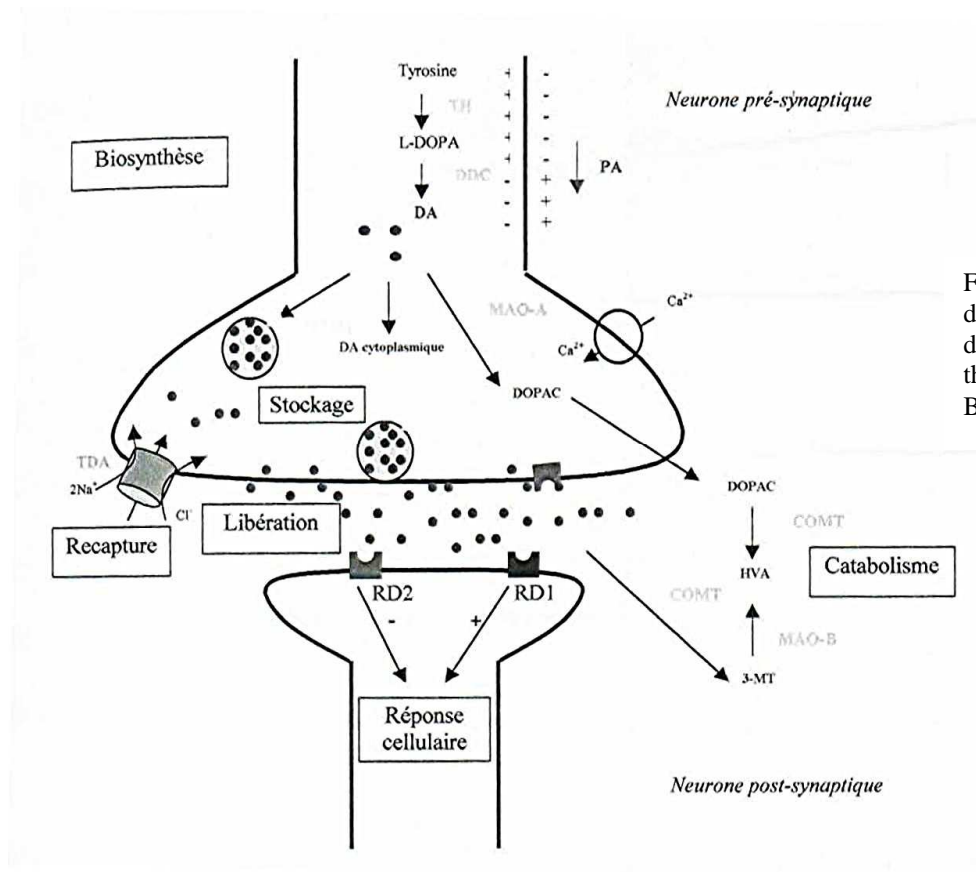


Figure 2 : Fonctionnement de la synapse dopaminergique – Source : thèse de science de Gaëlle Bouchez, 2008

3. Neurotransmission et « re-capture »

Le rôle de la DA est d'activer des récepteurs localisés sur les neurones post-synaptiques et ainsi assurer la transmission du signal neuronal par transduction à la suite d'un potentiel d'action. Cependant pour maintenir une neurotransmission efficace la DA libérée dans la fente synaptique doit être rapidement évacuée de sorte qu'à l'arrivée d'un nouveau potentiel d'action, la DA libérée puisse trouver des récepteurs libres. La DA libérée dans la fente synaptique par exocytose peut avoir plusieurs devenir : soit elle se fixe sur les récepteurs spécifiques post-synaptiques mais également pré-synaptiques ; soit elle est re-captée par les neurones dopaminergiques pré-synaptiques ; soit elle est catabolisée. La re-capture ou capture pré-synaptique représente le moyen le plus efficace d'inactivation de la DA (environ 80%). Cette re-capture se fait par les transporteurs de la dopamine (DAT), protéines de 12 domaines transmembranaires situées sur la membrane pré-synaptique, selon un mécanisme actif Na⁺/Cl⁻ dépendant comme les autres transporteurs des monoamines, la noradrénaline (NET) et la sérotonine (SERT). Le gradient d'ions Na⁺ est maintenu par une pompe Na⁺/K⁺ ATP dépendante qui fournit l'énergie nécessaire pour lui permettre de passer d'une conformation où le site de liaison du ligand est exposé vers l'extérieur de la membrane cellulaire à la

conformation où le site de liaison est exposé vers l'intérieur de la membrane cellulaire. A vide, le DAT présente toujours une conformation orientée vers la fente synaptique. Il est aujourd'hui admis que les DAT, en plus de leur rôle dans la re-capture de la DA, sont également des vecteurs actifs de la libération de ce neurotransmetteur vers la fente synaptique.

Le mécanisme de libération extracellulaire a été pendant longtemps considéré comme étant produit uniquement par l'exocytose des vésicules de stockage, mais récemment il est devenu évident que la concentration de DA dans la fente synaptique est le résultat d'un processus polymorphe de libération qui associe de façon simultanée l'exocytose rapide classique calcium-dépendante avec un processus plus lent sodium-dépendant impliquant les DAT nommé le « transport reverse » (Leviel 2001). Il a été démontré l'existence simultanée du rôle des DAT dans la libération et dans la re-capture de la dopamine. Le concept de « transport reverse » des DAT a été déterminé à travers l'observation que de nombreuses substances psychostimulantes (amphétamine, métamphétamine et ecstasy) sont capables de déclencher un efflux vers l'extérieur de la DA à travers les DAT. Le processus de « transport reverse » pourrait jouer un rôle majeur de régulation de l'homéostasie dopaminergique extracellulaire. Il a également été souvent évoqué dans des situations pathologiques comme l'ischémie cérébrale ou les processus neuro-dégénératifs comme la MP (Leviel 2011). Contrairement à la TH qui est exprimée par l'ensemble des neurones catécholaminergiques, le DAT est spécifique des neurones dopaminergiques, de ce fait le DAT est un bon marqueur de l'intégrité structurale des neurones dopaminergiques.

4. Catabolisme

La dégradation de la DA s'opère soit à l'intérieur du neurone par des enzymes mitochondriales, les MAO, soit dans la fente synaptique par une enzyme extracellulaire, la catécholamine-O-méthyltransférase (COMT) (Figure 1). Les MAO existent sous deux isoformes dans le cerveau : les isoformes A et B. La MAO-A est localisée sur les mitochondries des cellules gliales, elle est responsable de la dégradation de la DA accumulée dans la fente synaptique. La MAO-B est localisée sur les mitochondries de la terminaison pré-synaptique et se charge de la dégradation de la DA intracellulaire. La DA est alors catabolisée en DOPAC lui-même libéré dans l'espace synaptique afin d'y être dégradé. La COMT agit sur deux substrats : la DA et le DOPAC. Elle induit la dégradation de la DA en 3-méthoxytyramine qui est ensuite transformée en acide homovanillique (HVA) par l'action de la MAO-B. Elle catalyse également la transformation directe du DOPAC en HVA par la MAO-A. Le HVA est donc le catabolite final de la

dégradation de la DA. La mesure du taux des deux métabolites (DOPAC et HVA) dans le liquide céphalorachidien (LCR), le plasma ou les urines informe sur l'activité métabolique intraneuronale ainsi que sur le taux de libération de la DA et peut permettre le suivi de l'évolution de la MP ainsi que celui de l'efficacité d'un traitement en comparant leurs taux avant et après administration (Raftapopoulos et al. 1996 ; Heikkinen et al. 2002).

C. Les récepteurs dopaminergiques

On connaît actuellement 5 types de récepteurs de la DA, codés par 5 gènes différents. Ce sont tous des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), formés par des protéines comportant 7 hélices transmembranaires. Ils sont classés en deux familles suivant la nature de la protéine G à laquelle ils sont couplés :

- la famille des récepteurs de type D₁, comprenant les sous-types D₁ et D₅, couplés à la protéine G_s qui augmente l'adénylate cyclase.
- la famille des récepteurs de type D₂, comprenant les sous-types D₂, D₃, D₄, couplés à la protéine G_i qui diminue l'adénylate cyclase.

Lorsque les récepteurs de sous-types D₁ et D₅ de la première famille sont activés par la liaison d'un agoniste, ils induisent la formation d'AMP cyclique par activation de l'adénylate cyclase par l'intermédiaire de la protéine G_s. La cascade de réactions qui s'en suit aboutit à une dépolarisation et donc à une augmentation de la fréquence d'émission des potentiels d'action. Ces récepteurs ont une localisation somato-dendritique dans le système nerveux central. Ils sont fortement exprimés dans le striatum, le noyau accumbens, les tubercules olfactifs, le cortex cérébral, l'hypothalamus, le thalamus, et la SN *pars reticulata* (Landry et Gies 2009). Le récepteur D₅ dont l'affinité pour la dopamine est 10 fois supérieure à celle du récepteur D₁ se trouve essentiellement dans l'hippocampe et l'hypothalamus.

Les récepteurs dopaminergiques de type D₂ comportent les sous-types D₂, D₃, D₄. Ils réagissent différemment à la liaison de la DA, puisque la protéine G_i à laquelle ils sont couplés induit une diminution du taux d'AMP cyclique et donc de l'activité de l'adénylate cyclase. Cette voie de signalisation aboutit à une hyperpolarisation au niveau post-synaptique et à une diminution de la libération de neuromédiateur (par inhibition de l'exocytose) au niveau pré-synaptique. Au niveau central, ces récepteurs sont principalement localisés dans le striatum, le noyau accumbens, les tubercules olfactifs où ils sont exprimés par les neurones GABAergiques. Ils sont également exprimés dans les neurones dopaminergiques au niveau de la SNc, l'aire tegmentale, l'hippocampe, l'hypothalamus et le cortex préfrontal (Landry et Gies, 2009).

D. Les voies dopaminergiques centrales

Il existe quatre grandes voies dopaminergiques : la voie méso- limbique, la voie méso-corticale et la voie nigro-striée sont dites ascendantes, la voie tubéro-infundibulaire est dite descendante (Figure 3). Les voies méso- limbique et méso-corticale ont des origines tellement proches qu'on parle souvent de voie méso-cortico- limbique. Ces voies forment un réseau dont le rôle est de contrôler les systèmes intégrateurs (striatal, préfrontal et amygdalien) qui traitent les modalités sensorielles dans les processus cognitifs, attentionnels et émotionnels et qui sont responsables des conduites adaptées. D'une façon générale, la lésion de ce réseau provoque une perte de capacités d'initiation et d'adaptation.

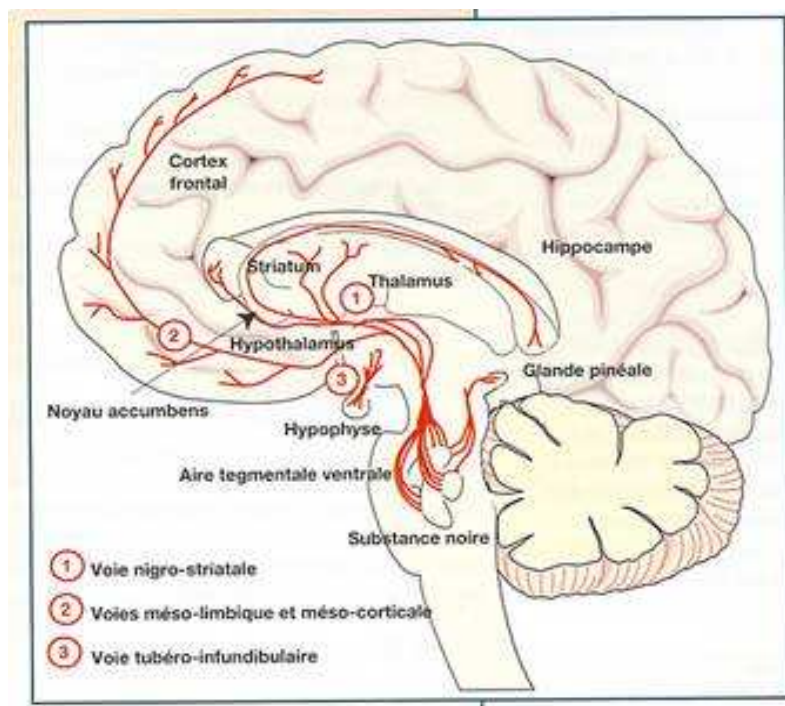


Figure 3 : Les différentes voies centrales dopaminergiques, Source : site www.Pharmaweb, Université de Lille, consultation le 20 avril 2012

1. La voie méso-cortico- limbique

La voie méso- limbique dont les corps cellulaires sont situés dans l'aire tegmentale ventrale, innerve le noyau accumbens, le tubercule olfactif, le cortex frontal et l'amygdale. La voie méso-corticale dont les corps cellulaires sont situés dans la SNc et l'aire tegmentale ventrale, innerve le cortex frontal, cingulaire, entorhinal, préfrontal et faiblement l'hippocampe. Ces deux voies sont impliquées dans le contrôle des réactions liées à l'émotivité et à l'anxiété, les

mécanismes de récompense, l'apprentissage, le processus de motivation. Les neurones dopaminergiques méso-limbiques sont activés par la plupart des substances psychoactives (cannabis, cocaïne, ecstasy, héroïne, nicotine) qui induisent l'augmentation de la quantité de DA dans les synapses et activent le système de récompense qui joue un rôle important dans les aspects psychiques de la dépendance (Spiga et al. 2010).

2. La voie tubéro-infundibulaire

La voie tubéro-infundibulaire dont les corps cellulaires sont situés dans l'hypothalamus réalise un parcours intra-hypothalamique. Cette voie est impliquée dans le contrôle hormonal, synthèse et libération d'hormones pituitaires (Prolactine).

3. La voie nigro-striée

La voie nigro-striée dont les corps cellulaires sont situés essentiellement dans la SNc, plus faiblement dans l'aire tegmentale ventrale, innerve le striatum (noyau caudé et putamen). La voie nigro-striée imbriquée dans le circuit des ganglions de la base, appartient au système extrapyramidal. Par ailleurs, la morphologie, le nombre et l'organisation des neurones de la SN varient d'une espèce à l'autre (Poirier et al. 1983). Chez les primates, les neurones de la SNc forment une bande compacte de cellules situées le long de la bordure dorsale de la SN réticulée et imbriquée à plusieurs endroits dans cette dernière. Chez les rongeurs, la SNc apparaît comme un mince feuillet horizontal, dense en cellules et facilement distinguable de la SN réticulée. Les axones se projettent le long du faisceau médian du télencéphale (MBF) jusqu'au striatum ipsilatéral. Cette voie joue un rôle majeur dans la régulation de la motricité involontaire ou automatique, du tonus et de l'adaptation posturale. C'est elle qui est principalement atteinte lors de la dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la MP ayant pour conséquence un manque de dopamine dans les régions de projection des neurones dopaminergiques de la SNc.

II. LA MALADIE DE PARKINSON

A. Historique

La MP a été décrite pour la première fois en 1817 par le docteur James Parkinson dans un ouvrage intitulé « An assay on the shaking palsy » à la suite de l'observation sur six patients. Il nomme cette maladie la « paralysie agitante » et la décrit comme un tremblement involontaire de certaines parties du corps au repos, ce tremblement n'ayant pas lieu durant le mouvement volontaire. Il décrit en parallèle une diminution de la force musculaire, avec une tendance à plier le tronc en avant. Il définit cette maladie comme « affligeante qui conserve l'intégrité des sens et de l'intelligence ». En 1872, le neurologue français Charcot lui attribue le nom de Maladie de Parkinson. En 1967, Martin propose une nouvelle définition de la MP reposant sur une triade de symptômes moteurs : le tremblement, la rigidité et l'akinésie. Puis, il a été mis en évidence que les patients atteints de la MP pouvaient également présenter des troubles cognitifs. En 1919, le neuropathologiste Tretiakoff montre que le processus lésionnel se situe dans la partie profonde du cerveau, dans la région du mésencéphale appelée locus niger (Substance noire). En 1966, le biochimiste Hornykiewicz fait le lien entre la MP et la baisse de DA dans les régions de projection des neurones dopaminergiques de la SNc. Cette découverte aboutit aux premiers traitements par L-Dopa à la fin des années soixante. L'arsenal thérapeutique s'est diversifié dans les années 70s avec l'arrivée des inhibiteurs de la DOPAC et de la MAO-B et des agonistes dopaminergiques. D'autres types de traitements sont apparus dans les années 80 comme la stimulation haute fréquence et la chirurgie intra-cérébrale. Aujourd'hui, les espoirs se tournent vers les traitements neuroprotecteurs ou neuro réparateurs comme la thérapie génique.

B. Epidémiologie

La MP est la deuxième atteinte neurologique chronique la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Elle touche près de 6,3 millions de personnes dans le monde. Dans la population générale des pays occidentaux, sa prévalence et son incidence annuelle sont estimées, selon les sources, respectivement de 100 à 200 et de 10 à 20 pour 100 000 habitants (Alves et al. 2008).

En France on estime qu'elle touche entre 100 000 et 150 000 personnes et de 8 000 à 10 000 nouveaux cas se déclarent chaque année. Cette analyse est plus intéressante lorsqu'on la rapporte à la tranche d'âge des sujets atteints car la prévalence et l'incidence de la MP sont liées à l'âge. Rarissime avant 45 ans, la MP survient en moyenne entre 58 et 62 ans. Elle atteint 1 % de la population âgée de plus de 60 ans (8 à 10 pour 1000 entre 65 et 69 ans) et augmente jusqu'à 4% dans la population âgée de plus de 80 ans (26 à 35 pour 1000 entre 85 et 89 ans), cependant les études épidémiologiques dans cette tranche d'âge ne distinguent pas la MP des syndromes parkinsoniens (Lees 2009). Par ailleurs, les hommes présentent un risque légèrement supérieur par rapport aux femmes (55 hommes / 45 femmes) (Elbaz et al. 2004). La MP représente donc un vrai problème de santé publique dans les pays développés dont l'âge moyen de la population est en constante augmentation. Il est estimé que le nombre de personnes de plus de 60 ans passera de 11% en 2007 à 22% en 2050 (Long-smith et al. 2009).

C. Sémiologie

La MP touche principalement les zones du cerveau qui sont impliquées dans le contrôle moteur, et se manifeste d'abord cliniquement comme un léger tremblement rythmique, généralement d'un membre. Lorsque la maladie progresse, les critères cliniques habituellement retenus dans la littérature sont les trois signes cardinaux : tremblement de repos, akinésie/bradykinésie, rigidité, auxquels s'ajoutent l'asymétrie, l'absence de signe atypique, l'absence d'autre étiologie, et une réponse marquée à la L-Dopa. Les signes cliniques ne s'expriment pas avec la même intensité chez tous les patients qui souvent ne présentent pas la totalité des signes ce qui rend difficile le diagnostic. L'examen neuro-pathologique *post-mortem* reste la meilleure preuve diagnostique.

1. Troubles moteurs et autres signes

La bradykinésie/akinésie est le signe le plus répandu. Il se définit par une difficulté à initier et une lenteur à effectuer les mouvements volontaires en particulier les mouvements réclamant de la précision et semi-automatiques, comme la marche ou l'écriture (micrographie). Concernant la marche, elle est lente et les pas sont courts avec la perte fréquente du ballant d'un bras. Ce ralentissement concerne également les muscles de la face avec un appauvrissement des mimiques du visage et une limitation de convergence oculaire.

Le tremblement n'est pas le signe prédominant de la MP (absent dans 1/3 des cas), bien qu'il soit le plus connu. Il s'agit d'un tremblement au repos qui diminue ou disparaît lors d'un mouvement volontaire. Il est souvent unilatéral au niveau du membre supérieur et plus rarement un membre inférieur. Avec la progression de la maladie, il devient bilatéral.

La rigidité ou hypertonie est une augmentation du tonus musculaire. Cette tension excessive peut être douloureuse avec une sensation de raideur. Elle peut concerner l'ensemble des muscles du corps, mais se concentre généralement le long de la colonne vertébrale et aux articulations, d'où une posture crispée au repos, voûtée en avant. A l'examen clinique on l'observe lors de l'exécution de mouvements passifs (flexion), elle se traduit par le phénomène de la « roue dentée » qui apparaît lorsque la rigidité cède par à-coups successifs.

Pendant la progression de la MP, les régions « non motrices » du cerveau peuvent être affectées, conduisant à des atteintes psychiques (dépression), cognitives (confusion mentale) et végétatives (hypersudation, hypotension) associées aux trois principaux signes moteurs.

2. Critères cliniques et diagnostic différentiels

Une seule étude clinico-neuropathologique rétrospective a permis d'évaluer la valeur prédictive positive (VPP) des différents critères cliniques en les confrontant systématiquement à la vérification neuropathologique du diagnostic de MP (Hughes et al. 2003). Sur 100 cas de MP diagnostiqués cliniquement, l'examen neuropathologique n'a permis de confirmer le diagnostic que dans 76% des cas. Les VPP étaient les suivantes : - le tremblement : 91% lorsqu'il était prédominant et 82% lorsqu'il était associé à un autre signe clinique, - l'asymétrie des symptômes : 85% ; - le syndrome akinéto-rigide : 57% lorsqu'il était prédominant et 82% lorsqu'il était associé. La VPP augmentait à 88% pour la combinaison des 3 signes cardinaux et à 90% si ils étaient associés à un début asymétrique et à l'absence de signes atypiques. La réponse clinique à la L-Dopa avait une VPP de 78%. Au début de la phase symptomatique, les critères ayant une VPP élevée sont privilégiés : tremblement de repos, asymétrie initiale des symptômes. L'absence de signes atypiques pour la MP contribue à exclure les autres syndromes parkinsoniens dégénératifs et l'absence d'autres étiologies écarte les syndromes parkinsoniens secondaires. Après un délai de 3 à 5 ans, la réponse pharmacologique devient un critère utilisable si l'amélioration des symptômes est supérieure à 50 % (score UPDRS) utilisant la L-Dopa et/ou un agoniste dopaminergique à doses suffisantes. Cela permet d'écarter les autres syndromes parkinsoniens dégénératifs qui répondent moins bien au traitement dopaminergique.

3. Evolution de la maladie

L'évolution de la MP peut se résumer d'après l'échelle de Hoehn et Yahr (Hoehn et Yahr, 1967). C'est un système de classification simple, peu sensible mais fiable et rapide d'utilisation, couramment utilisé pour décrire la progression des symptômes de la MP. L'échelle originale comprenait les stades 1 à 5, le stade 0 a été ajouté, et les stades 1,5 et 2,5 ont été proposés :

Stade 0 : Pas de signes parkinsoniens ; **Stade 1** : Signes unilatéraux seulement qui comprennent au moins deux des trois symptômes cardinaux de la maladie, aucun handicap ; **Stade 1.5** : Atteinte axiale à prédominance unilatérale entraînant un léger handicap (posture déformée) sans altération de l'équilibre ; **Stade 2** : Légère Atteinte bilatérale sans altération de l'équilibre ; **Stade 2.5** : Atteinte bilatérale avec altération de l'équilibre, récupération sur le test de traction ; **Stade 3** : Les symptômes bilatéraux s'aggravent. Perte d'équilibre, le patient présente une gêne fonctionnelle, cependant le patient garde son autonomie ; **Stade 4** : Développement complet de la maladie avec un handicap sévère. Le malade peut se tenir debout et marcher sans aide mais avec difficultés, perte partielle de l'autonomie ; **Stade 5** : Le malade ne peut se déplacer qu'en chaise roulante ou alité, non autonome

D. Etiologie

L'étiologie exacte de la MP est inconnue de nos jours. Des antécédents familiaux sont mis en évidence chez 5% des cas (Toulouse et Sullivan 2008). Néanmoins, la majorité des MP est sporadique et sans doute d'origine multifactorielle, avec l'implication de facteurs génétiques et environnementaux (Das et al. 2011). Plusieurs travaux ont permis de corroborer l'hypothèse qu'un polymorphisme génétique serait susceptible d'affecter la sensibilité des personnes à l'exposition aux facteurs de risque environnementaux (Ross et Smith, 2007)

1. Facteurs génétiques

De façon exceptionnelle, la forme héréditaire de la MP est de type autosomique dominante. Il existe en Europe quelques familles chez lesquelles plusieurs membres sont atteints (Sironi et al. 2010). Plus fréquemment, l'hérédité est de type autosomique récessive. L'étude des familles atteintes a permis de mettre en évidence la responsabilité de certaines mutations génétiques dans la susceptibilité de développer une MP. Depuis 1996, 13 loci et 9 gènes responsables des

formes monogéniques de la MP ont été isolés (International Parkinson Disease Genomic Consortium, 2011). Certains d'entre eux abritent des gènes directement impliqués dans la physiopathologie de la MP dont les plus importants sont ceux codant pour des protéines impliquées dans la réparation lésionnelle, la mort programmée neuronale et le phénomène de dégradation protéique cellulaire via le système ubiquitine-protéasome, comme l' α -synucléine (SNCA), la protéine Tau associée aux microtubules (MAPT), la kinase-2 avec un domaine riche en leucine (LRRK2), la Parkine (PARK2) et la glucocerebrosidase (GBA) (Lin et al. 2009 ; Yasuda et Mochizuki. 2010). Les variants des gènes MAPT et SNCA expliquent à eux seuls, près de 30% du risque de survenue de la MP d'origine héréditaire. D'autres gènes codant pour des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale engagée dans la réponse au stress oxydatif cellulaire comme UCHL1, DJ1, ATP13A2 et PINK1 ont également été décrits comme étant impliqués dans la pathogenèse de la MP. Leur déficit provoque un dysfonctionnement des complexes I et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale des neurones dopaminergiques (Nuytemans et al. 2010 ; Shim et al. 2011).

2. Facteurs environnementaux

Plusieurs toxines omniprésentes en faible quantité, dont les effets cumulatifs peuvent conduire à la MP chez les individus génétiquement prédisposés, ont été identifiées par des études épidémiologiques (Wirdefeldt, 2011). L'exposition chronique à certains métaux comme le cuivre, le fer, le manganèse ou le plomb pourrait être un facteur de risque. Il a été récemment démontré qu'un déséquilibre de l'apport vitamine E /cuivre, qui engendrent une carence en zinc dans l'organisme, pourrait être impliqué dans l'étiologie de la MP (Miyake et al. 2011). Aujourd'hui, il est clair que le risque de développer une MP est augmenté en milieu rural, par l'exposition à l'eau de puits, et par les travaux agricoles, ce qui suggère que les pesticides et/ou les herbicides peuvent contribuer à sa survenue. Cette conclusion a été renforcée par plusieurs travaux étudiant l'effet des toxines telles que la roténone ou le MPTP dans des modèles animaux. Ces toxines altèrent la fonction mitochondriale et augmentent le stress oxydatif soutenant un rôle de ces mécanismes dans la physiopathologie de la MP (Tanner et al. 2011).

E. Physiopathologie

1. Caractéristiques de l'atteinte neuronale

a) *Anatomo-pathologie*

La MP est caractérisée par la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée dans la SNc située dans le mésencéphale, conduisant à un déficit en DA dans les zones de projections ascendantes, surtout au niveau du striatum (putamen, noyau caudé) (Figure 4).

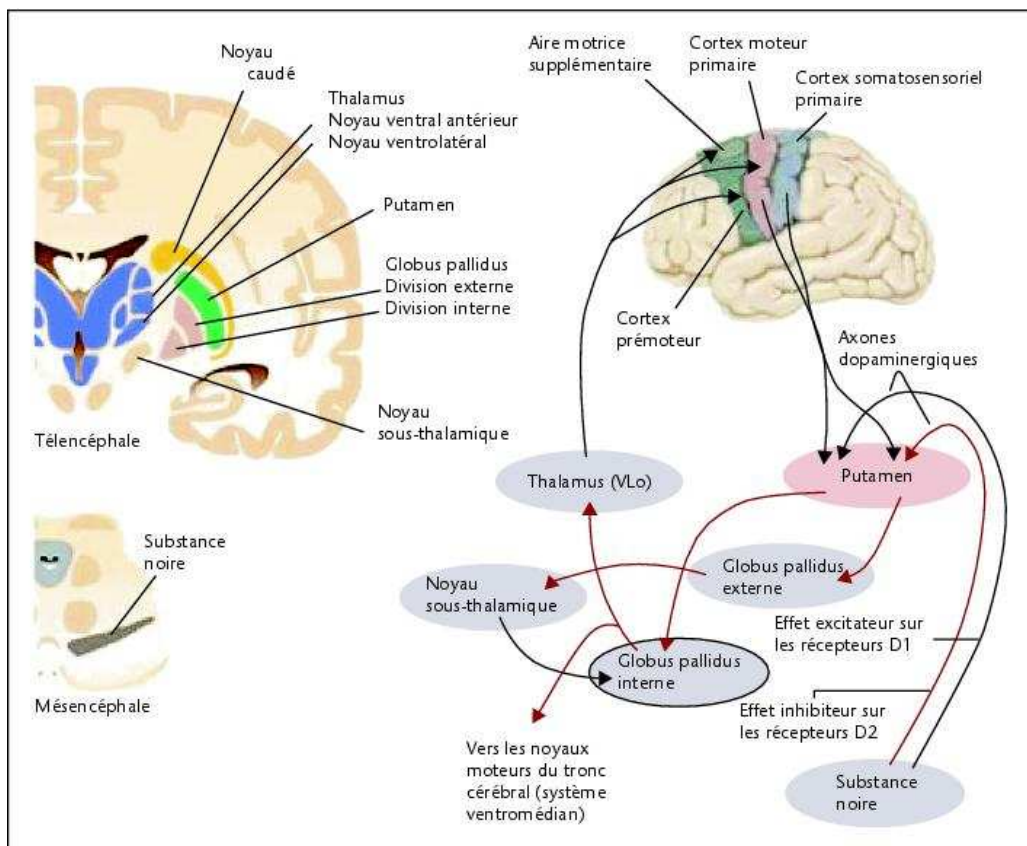


Figure 4 : Schéma des ganglions de la base (noyau caudé, putamen, globus pallidus, noyau sous-thalamique et SN).
Le noyau caudé et le putamen, qui ont une même origine forment le striatum.

D'après Gisquet-Verrier, Epilepsies 2006.

La mort des neurones dopaminergiques est normale au cours du vieillissement, leur diminution est linéaire et estimée à environ 5% par décennie (Langstone et al. 1985). Dans la MP cette diminution est exponentielle avec 75% des neurones perdus en 20 ans. Par ailleurs, au moment du diagnostic symptomatique de la MP, environ 60-70% des neurones dopaminergiques ont disparu au niveau de la SNc et 80 % de la DA a été perdue au niveau du striatum, donc physiologiquement la maladie est déjà très avancée (Figure 5). Ceci sous-tend l'existence de mécanismes compensateurs du dysfonctionnement pré et post-synaptique dopaminergique pendant la phase pré-symptomatique de la MP qui sont dépassés lorsque les symptômes

apparaissent. Alors que la perte neuronale ne cesse de progresser, le taux de transmission de DA est maintenu par une augmentation de l'activité des neurones restants et une augmentation de la sensibilité des RD2 post-synaptiques au niveau du striatum.

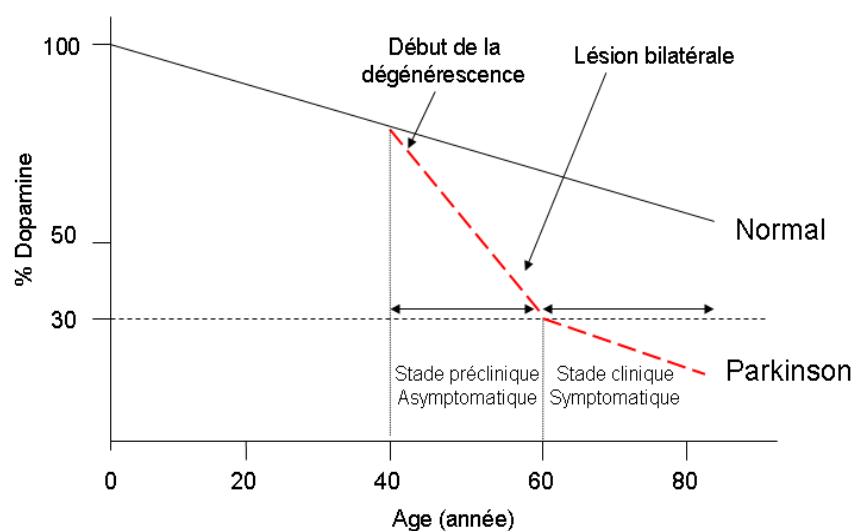


Figure 5 : Représentation graphique de la relation entre la dégénérescence dopaminergique et l'apparition des signes cliniques, d'après Langstone et al. 1985.

b) Histopathologie

Les neurones dopaminergiques sont riches en neuromélanine, ce qui leur confère une pigmentation noire visible sur coupe. La MP caractérisée par la perte des neurones dopaminergiques de la SNc induit une dépigmentation de cette zone (Figure 6).



Figure 6 : Coupes de tissu de mésencéphale, à gauche chez un sujet parkinsonien, à droite chez un sujet témoin. On observe la dépigmentation chez le sujet parkinsonien au niveau de la SN reflet de la dégénérescence des neurones dopaminergiques. D'après Youdim et Riederer, 1997

Il est à noter que la SNc latérale montre une plus grande vulnérabilité que la partie médiane, en raison d'une possible différence d'expression des gènes liés au processus d'apoptose, des gènes codant pour le complexe mitochondrial, la glutathion transférase et les cytokines pro-inflammatoires (Duke et al. 2007).

Une autre caractéristique histopathologique de l'atteinte neuronale est la présence des Corps de Lewy, inclusions cytoplasmiques éosinophiles arrondies insolubles intra-neuronales dans les régions affectées par le processus dégénératif (Figure 7) (Braak et al. 1995). Ces corps de Lewy ont été mis en évidence dans les neurones dopaminergiques de la SN par le neurologue Lewy en 1912, sur des cerveaux de patients décédés avec la MP. Au niveau de la SNc ces Corps de Lewy se retrouvent de façon abondante (Schapira 2011). Ils contiennent des dépôts de protéines

anormales d' α -synucléine, d'ubiquitine E3 et d'autres impliquées dans le processus de détoxification cellulaire. Une étude sur 110 cerveaux de patients atteints de la MP *post-mortem* a permis d'observer la progression de la MP et de séquencer son évolution en plusieurs étapes « Braak's Staging », en prenant comme marqueur des anticorps anti α -synucléine et les Corps de Lewy (Braak et al. 2003).

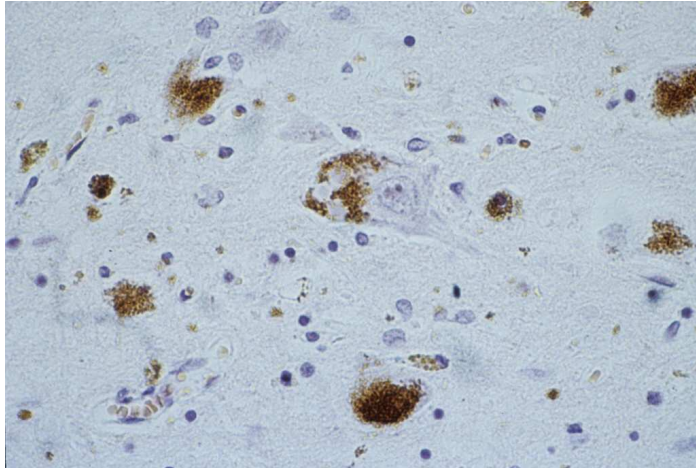


Figure 7 : Corps de Lewy – D'après Etienne Hirsch – Source : Site www. INSERM consultation le 27 avril 2012

2. Pathogenèse des neurones dopaminergiques

La dégénérescence des neurones dopaminergiques est issue de plusieurs mécanismes physiopathologiques aboutissant à un stress oxydatif délétère qui induit un processus de mort neuronale programmée ou apoptose (Figure 8).

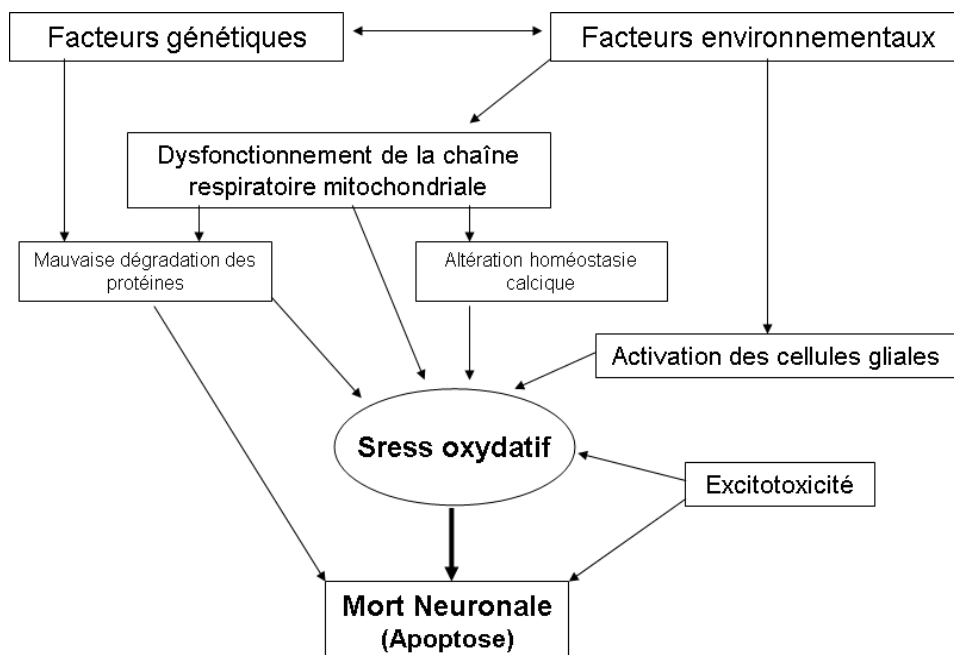


Figure 8 : Schéma des hypothèses étiologiques et physiopathologiques de la mort neuronale dopaminergique

a) Le Stress oxydatif

Le stress oxydatif est une agression des constituants de la cellule par des espèces réactives oxygénées (ROS) (anion superoxyde : O₂⁻ et radical hydroxyle : OH.) et des espèces réactives azotées (RNS) (monoxyde d'azote (NO.) et nitro-peroxyde (ONOOH)). Ces espèces sont des radicaux libres. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est considéré comme une ROS car, en présence de fer, il donne naissance à deux OH. par la réaction de Fenton.

En situation physiologique, la production de ROS et RNS est normale pour tous les organismes vivant en aérobie et ne constitue pas, en soi, une situation de stress oxydant. Cependant, en situation pathologique, ces systèmes anti-oxydants, comprenant des enzymes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase...), des petites molécules (vitamine E, vitamine C...), des protéines (transferrines), et des systèmes de réparation de l'ADN sont submergés par la production de ROS et RNS (Theil, 2006). Il existe alors un déséquilibre en faveur des oxydants consécutif à une surproduction de ROS et RNS et à un défaut du système de protection (carence en vitamines C ou E, en caroténoïdes ou en polyphénols) (Choi, 2011).

Ces radicaux libres peuvent réagir avec des molécules intracellulaires en générant des actions délétères sur la molécule atteinte mais également engendrer la formation de nouveaux radicaux sur des molécules voisines, source de réaction en chaîne accélérée par l'absence de substances anti-radicalaires (Montero et Jassem, 2011). Un stress oxydatif sévère et prolongé entraîne des perturbations majeures du métabolisme cellulaire. Dans la cellule, plusieurs molécules sont des cibles des radicaux libres : - les acides gras et phospholipides des membranes cellulaires (peroxydation lipidique) ; - les protéines cytoplasmiques (oxydation et nitration protéique) ; - l'ADN (oxydation de l'ADN). Les anomalies qui en résultent aboutissent à la mort cellulaire programmée ou apoptose, initiant, développant ou amplifiant le phénomène pathologique ou dégénératif en cause (Figure 9).

Les neurones constituent un terrain favorable au stress oxydatif. Ils sont très riches en mitochondries et consomment beaucoup d'oxygène ce qui génère la production de radicaux libres. Dans la MP, les neurones dopaminergiques de la SNc sont très sensibles au stress oxydatif. En effet, la quantité de fer libre est anormalement élevée, due à l'augmentation de l'expression des récepteurs à la lactoferrine, ce qui favorise la réaction de Fenton (Gerlach et al, 1997). La concentration en superoxyde dismutase est accrue ce qui implique l'augmentation de la production de H₂O₂, alors que les taux de glutathion peroxydase et de catalase sont réduits (Kunikowska et Jenner, 2003). Dans cette situation, l'oxydation des lipides, des protéines et de l'ADN est largement augmentée. Par ailleurs, le métabolisme de la DA a également été associé à des niveaux accrus de ROS (H₂O₂ et de semi-quinones) qui contribuent aux altérations des protéines structurales et à la diminution des niveaux de glutathion (Stokes et al. 1999).

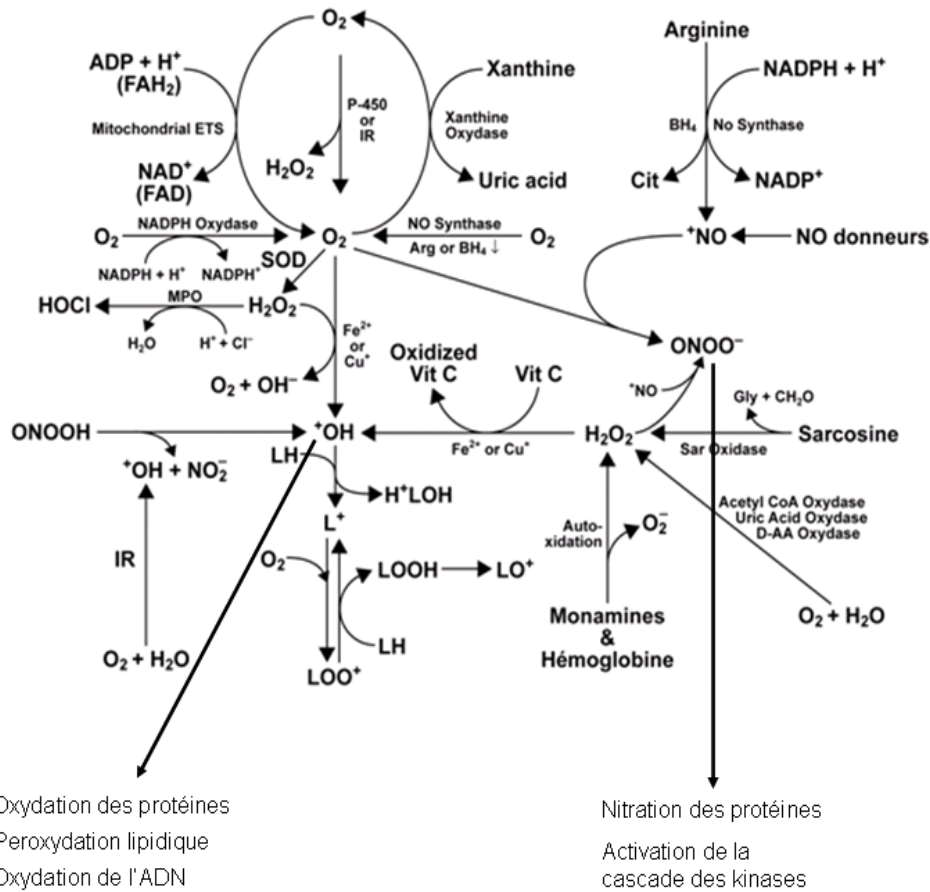


Figure 9 : Productions et implication dans les processus biologiques des radicaux libres oxygénés (ROS) et azotés (RNS). AA : acides aminés ; Arg : L-arginine ; BH₄ : tétrahydro-L-bioptérine ; CH₂O : formaldéhyde ; Cit : L-citrulline ; DQ : diquat ; ETS : système de transport d'électrons ; FAD : dinucléotide flavine adénine (oxydé) ; FADH₂ : dinucléotide flavine adénine (réduit) ; Gly : glycine ; H[•] LOH : radical lipidique hydroxy ; LOOH : hydroperoxyde lipidique ; MPO : myéloperoxydase ; NAD⁺ : dinucléotide nicotinamide adénine (oxydé) ; NADH : dinucléotide nicotinamide adénine (réduit) ; NADP⁺ : dinucléotide nicotinamide adénine phosphate (oxydé) ; NADPH : dinucléotide nicotinamide adénine phosphate (réduit) ; P-450 : cytochrome P-450 ; PDG : glutaminase sulfate dépendante ; Sar : sarcosine ; SOD : superoxyde dismutase – site de la bibliothèque de l'université de Laval www.bibl.ulaval.ca/ consultation le 26 avril 2012

b) Le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale

Toutes les cellules et particulièrement les neurones ont besoin d'un approvisionnement permanent en énergie sous forme d'ATP pour fonctionner. C'est la chaîne respiratoire mitochondriale qui fournit l'ATP, à partir de métabolites tels que le glucose, les acides gras ou les acides aminés. Cette chaîne respiratoire est constituée d'un ensemble complexe de protéines membranaires qui servent à réoxyder les coenzymes NADH et ubiquinone (CoQ) qui ont été réduits au cours du cycle de Krebs. Cette réoxydation s'accompagne de la création d'un gradient transmembranaire de protons. Ce gradient est une forme de stockage de l'énergie contenue dans les coenzymes qui va servir à fabriquer de l'ATP au niveau de l'ATP synthase, une protéine transmembranaire. Il s'agit de l'oxydation phosphorylante.

Il existe 5 ensembles de protéines et de coenzymes impliqués dans les oxydations phosphorylantes de la chaîne respiratoire. Les 4 premiers complexes (I, II, III et IV) interviennent dans le transport des électrons et le cinquième (V) intervient dans la synthèse d'ATP. Ces complexes diffusent de façon indépendante au sein de la membrane interne mitochondriale et sont connectés par un transporteur liposoluble mobile le coenzyme Q (CoQ) et le cytochrome C fixé à la membrane (Lenaz et Genova, 2009) (Figure 10).

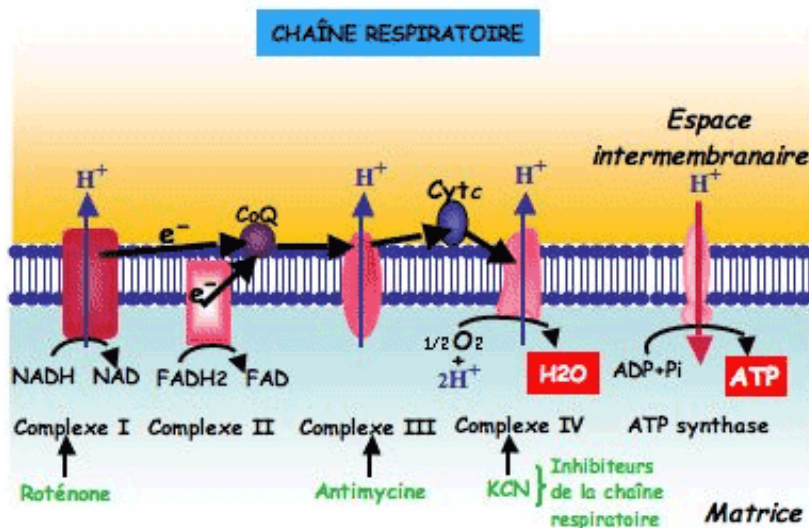


Figure 10 : Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale – site www.sciencebio.com, consultation le 26 avril 2012

Chez les parkinsoniens, il existe un défaut de l'oxydation phosphorylante mitochondriale à travers la diminution de l'activité de la NADH CoQ reductase (complexe I). Cette diminution est limitée aux neurones nigro-striés atteints (Ebadi et al. 2001). Bien que sa cause exacte reste inconnue, des mutations génétiques notamment sur le gène codant pour une kinase, la PINK1, peuvent expliquer ce déficit (Morais, 2009). La diminution d'activité du complexe I a de graves conséquences concernant l'intégrité du neurone :

- La production d'énergie décroît, ce qui affecte les fonctions ATP dépendantes dont celles de la pompe Na⁺/K⁺ ATPase qui entraîne une dépolarisation membranaire des neurones nigro-striés. Les récepteurs glutamatergiques ne sont alors plus bloqués ce qui conduit à une entrée massive de Ca²⁺ qui renforce l'excitabilité neuronale, active des protéines kinases impliquées dans la cascade de synthèse de substances inflammatoires et de radicaux libres.
- Une diminution du nombre d'électrons pris en charge par la chaîne respiratoire ce qui favorise la formation de radicaux libres et augmente l'état de stress oxydatif du neurone.
- La diminution de la différence de potentiel qui en résulte, conjuguée à l'augmentation de la concentration en Ca²⁺ mitochondriale, entraîne l'ouverture des pores de transition et la libération de molécules capables d'activer les caspases et la cascade de réactions apoptotiques.

c) L'excitotoxicité

L'excitotoxicité est un processus pathologique d'altération et de destruction neuronale, consécutif à l'hyperactivation par l'acide glutamique et ses analogues des récepteurs excitateurs neuronaux comme les récepteurs NMDA et AMPA. Les excitotoxines comme le NMDA ou le glutamate en trop grande concentration, en se liant à ces récepteurs provoquent une entrée massive dans la cellule d'ion calcium. Le Ca^{2+} active un certain nombre d'enzymes dont des phospholipases C, des endonucléases et des protéases (calpaïnes). Ces enzymes dégradent les structures cellulaires : cytosquelette, membrane, ADN (Degos et al. 2008) (Figure 11).

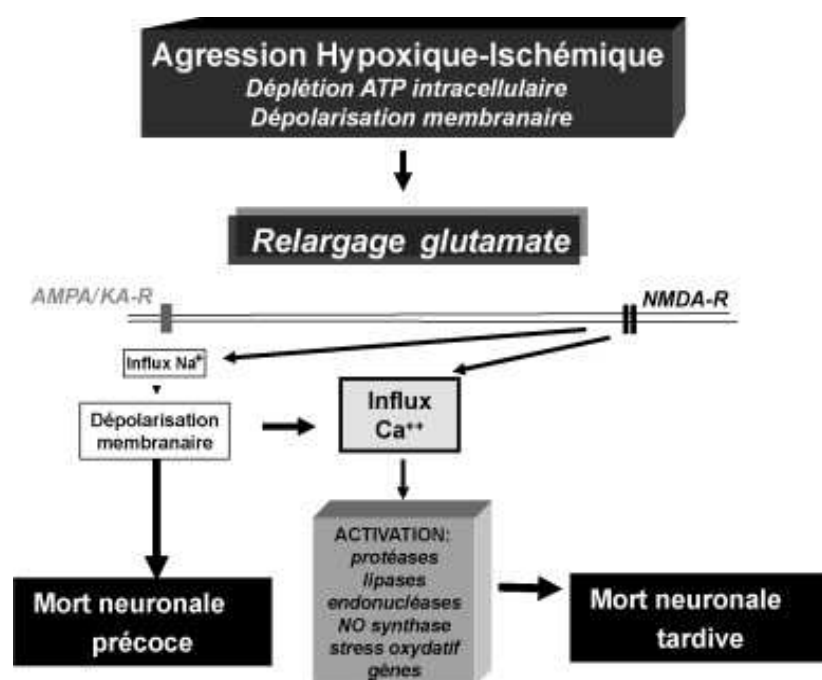


Figure 11 : Schéma du mécanisme excitotoxique suite à une agression cérébrale. D'après Degos et al. 2008

Dans la MP, l'excitotoxicité a comme origine un déficit énergétique consécutif au dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (Greenamyre et al. 1999). Elle est liée à une forte augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire qui active une cascade de réactions enzymatiques impliquant des caspases et une production accrue de radicaux libres qui induisent un processus d'apoptose cellulaire. Par ailleurs, un mécanisme direct reposant sur l'accroissement de la transmission glutamatergique survient également dans le processus. En effet, la SNC reçoit des afférences glutamatergiques en provenance du noyau sous-thalamique qui libère des quantités anormalement élevées de glutamate à la suite de la disparition des neurones dopaminergiques nigro-striés. La protection des neurones qu'offre l'administration d'antagonistes des récepteurs NMDA à des modèles animaux de la MP, témoigne du rôle de l'excitotoxicité dans la pathogenèse de la MP (Morissette et al. 2006).

d) L'alpha-synucleine

L' α -synucleine est une protéine qui se trouve principalement au niveau de la SNc et du thalamus, constituant jusqu'à 1% de toutes les protéines dans le cytosol des neurones. Elle se retrouve aussi localisée dans le noyau des neurones, au niveau des terminaisons présynaptiques, suggérant un rôle dans la transmission neuronale (Yu et al. 2007). Elle est nativement non structurée et soluble. Cependant, dans des conditions pathologiques, elle peut se regrouper pour former des fibrilles insolubles caractérisées par des corps de Lewy. Il existe une incertitude sur le mécanisme d'agrégation de l' α -synucleine, mais on sait que seule la forme monomère soluble s'agrège en petits oligomères qui sont ensuite stabilisés en une structure intermédiaire riche en feuillets- β qui est le précurseur de l'agrégation en fibrilles insolubles (Cookson, 2009) (Figure 12). L'augmentation de la population de la conformation- β est liée à l'agrégation pathogénique de la protéine (Sandal et al. 2008). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer le changement de conformation de l' α -synucleine et son agrégation en fibrilles : - au niveau cellulaire, la présence de lipides favorise la formation d'oligomères sous forme d'annulaires, semblables à des pores qui interagissent avec les membranes; - au niveau biochimique, des phosphorylations par des kinases (PLK2), des coupures par le biais de protéases telles que les calpaïnes ; le stress oxydatif à travers une nitration, par l'intermédiaire de l'oxyde nitrique (NO) ou d'autres espèces azotés réactives, modifient l' α -synucleine tels qu'elle a une tendance plus élevée à s'agréger ; - au niveau génétique, certaines mutations du gène codant pour l' α -synucleine (SNCA) l'amènent à former des fibrilles, impliquées dans la MP (Bartels et al. 2011). Dans des cas de MP familiales, trois mutations ponctuelles ont été identifiées à ce jour: A53T, A30P et E46K (Lees et al. 2009).

L' α -synucleine agrégée a des effets néfastes sur plusieurs entités cellulaires induisant sa toxicité neuronale en déclenchant un phénomène d'apoptose : - Un effet inhibiteur sur l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale peut être un facteur potentiel pouvant affecter la fonction mitochondriale et prédisposer certains neurones à la dégénérescence (Liu et al. 2009) ; - L' α -synucleine se lie aux vésicules présynaptiques et modifie l'exocytose des vésicules contenant des catécholamines dans les cellules chromaffines, laissant penser que la transmission synaptique soit directement ou indirectement une cible de sa toxicité (Buré et al. 2010) ; - L' α -synucleine oligomère peut se lier aux membranes des lysosomes et des protéasomes et inhiber leurs fonctions conduisant à la mort neuronale (Yang et al. 2009) ; - Les niveaux d'expression d' α -synucleine peuvent influencer sur la viscosité et la quantité relative en acides gras dans la bicouche lipidique et ainsi altérer sa structure conduisant à la formation de petites vésicules (Uversky, 2007).

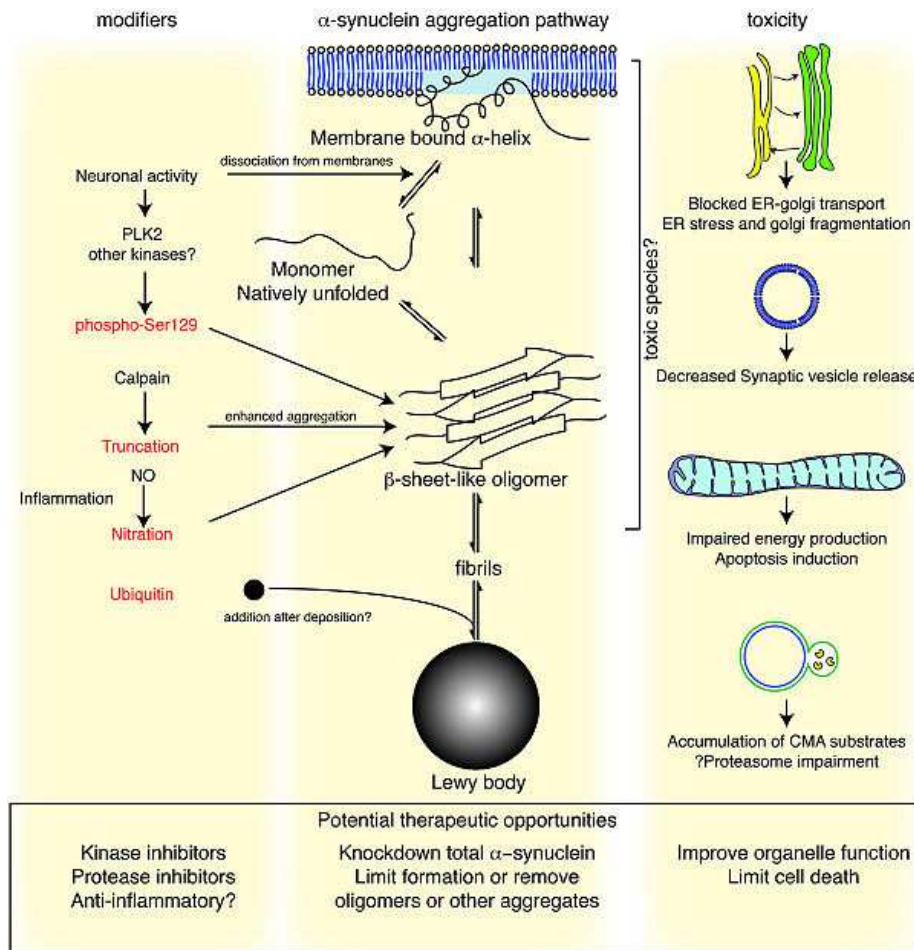


Figure 12 : Mécanisme de la toxicité de l'alpha-synucleine, d'après Cookson 2009.

e) L'Activation gliale

Dans la SN des patients atteints de la MP une inflammation via une activation gliale importante a été décrite (Hirsch et al. 1999). Les cellules gliales et microgliales sont particulièrement abondantes à proximité des neurones dopaminergiques de la SNc et pourraient participer activement à la destruction oxydative des neurones nigro-striés.

Au cours des deux dernières décennies, de très nombreux travaux ont été réalisés pour étudier l'implication de la neuroinflammation dans la dégénérescence progressive de la voie dopaminergique nigro-striée. La multiplicité des modèles animaux permettant d'étudier cette neuroinflammation et les perspectives thérapeutiques anti-inflammatoires qui peuvent en découler, expliquent l'engouement qu'il existe en recherche pour comprendre la relation physiopathologique exacte entre la neuroinflammation et le développement de la MP.

Afin de détailler cette relation, nous décrivons dans le chapitre II les différents modèles animaux de la MP permettant d'étudier le rôle de la neuroinflammation en relevant les avantages et les inconvénients de chacun, puis dans le chapitre III nous développerons les liens physiopathologiques qui existent entre la neuroinflammation et la MP.

F. Les traitements

Aujourd'hui, il n'existe pas de traitement qui permet de guérir de la MP. Il s'agit de traitements qui soulagent uniquement les symptômes. Le traitement par la L-Dopa reste le « gold standard » mais les patients souffrent généralement de graves effets secondaires plusieurs années après le début du traitement. De nouvelles stratégies ont alors été développées non seulement pour améliorer l'effet de la L-Dopa, mais aussi pour avoir de nouveaux traitements antiparkinsoniens et neuroprotecteurs (Yuan et al. 2010).

1. Les traitements pharmacologiques

Ces traitements pallient l'insuffisance de DA soit en administrant son précurseur (L-Dopa), soit en fournissant un agoniste de la DA, soit en inhibant la dégradation de la DA.

➤ Les médicaments visant à combler le déficit en dopamine

- **La Levodopa** ou L-Dopa est le médicament le plus puissant pour l'amélioration des troubles moteurs. Cependant, la L-Dopa associée à la dégénérescence des neurones induit à terme des complications motrices : fluctuations d'efficacité et les mouvements anormaux involontaires (dyskinésies). Les causes de ces complications motrices sont d'une part la perte progressive du stock de DA et d'autre part le fait que la DA sous forme de médicament n'est pas délivrée de façon continue dans le cerveau mais de façon pulsatile (Obeso et al. 1989).

- **Les agonistes dopaminergiques** (bromocriptine, lisuride, pramipexol, ropinirole) agissent directement sur les RD2 post-synaptiques en mimant l'action de la DA. Ils ont un effet sur la motricité plus modéré et engendrent moins de dyskinésies que la L-Dopa. En revanche, ils entraînent de façon plus marquée d'autres effets indésirables dopaminergiques (nausées, hallucinations, troubles du comportement, addictions diverses) (Perez-Lloret et al. 2010).

➤ Les médicaments inhibant la dégradation de la dopamine

- **Les inhibiteurs de la COMT et de la MAO-B** empêchent la dégradation de la L-Dopa. Ces inhibiteurs n'ont pas ou peu d'effet symptomatique en l'absence de L-Dopa, mais associés à la L-Dopa, ils potentialisent ses effets sur les troubles moteurs (Siderowf et Kurlan 1999). Les inhibiteurs de la COMT et de la MAO-B agissent sur la L-Dopa mais aussi sur la DA

synthétisée par le cerveau. Ils peuvent donc entraîner ou majorer les effets indésirables dopaminergiques décrits avec la L-Dopa, y compris les dyskinésies.

➤ **Les médicaments n'agissant pas par l'intermédiaire de la dopamine**

Au cours de la MP, d'autres systèmes neurochimiques que le système dopaminergique peuvent être endommagés. De ce fait, des agents agissant sur les récepteurs d'autres neurotransmetteurs comme le glutamate (amantadine), la sérotonine (fluoxétine), l'acétylcholine (trihexyphenidyle), l'adénosine (antagonistes des récepteurs A2A) (Szabo et al. 2011) ont été développés. Ils possèdent généralement une efficacité modérée sur les signes moteurs avec des effets secondaires cholinergiques fréquents, mais sont cependant efficaces sur les dyskinésies.

2. Les traitements chirurgicaux

Les traitements chirurgicaux de la MP ont connu un essor depuis les années 1980, ceci pour trois raisons principales : 1) l'apparition des dyskinésies liées au traitement par la L-Dopa ; 2) une meilleure compréhension de l'organisation fonctionnelle des ganglions de la base (la diminution de l'hyperactivité de la voie glutamatergique excitatrice au niveau du globus pallidum et des noyaux sub-thalamiques conduit à une amélioration des symptômes moteurs) ; 3) l'amélioration de la neurochirurgie stéréotaxique en relation avec les progrès dans les techniques de neuro-imagerie (ventriculographie, IRM). Aujourd'hui, il existe deux grandes techniques utilisées : la stimulation cérébrale profonde chronique et la chirurgie lésionnelle des zones cérébrales hyperactives.

➤ **Stimulation cérébrale profonde**

Procédure la plus couramment utilisée (Benabid et al. 1998), elle consiste à implanter des fils branchés à un dispositif implanté sous la peau qui génère des impulsions électriques à haute fréquence dans les zones hyperactives du cerveau (globus pallidum, thalamus ou noyaux sub-thalamiques) de façon bilatérale afin de réduire leur activité. Cette technique ne détruit aucun tissu cérébral et est réversible. La stimulation du noyau sous-thalamique est la cible privilégiée pour contrôler les symptômes moteurs et les dyskinésies. La stimulation cérébrale ne concerne que des patients très handicapés du point de vue moteur, le problème demeurant la lourdeur et les risques liés à la chirurgie (Weaver et al. 2009).

➤ **Chirurgie lésionnelle :**

Cette technique consiste à détruire une partie des zones cérébrales hyperactives à l'origine des symptômes moteurs de la MP. Le nom de cette opération varie selon la partie cérébrale ciblée:

pallidotomie, thalamotomie ou sous-thalamotomie (Walter et Vitek, 2004). Etant donnée sa nature destructrice et donc irréversible, la chirurgie lésionnelle est rarement pratiquée de nos jours. De plus, cette technique peut uniquement être unilatérale et s'avère donc moins efficace que la stimulation cérébrale profonde. La pallidotomie peut être envisagée chez certains patients souffrant de dyskinésie très graves et ne pouvant pas bénéficier d'une stimulation cérébrale profonde du noyau sous-thalamique.

3. Les nouvelles stratégies thérapeutiques

a) Thérapie génique

La thérapie génique consiste à injecter dans certaines zones du système nerveux central des vecteurs viraux rendus non pathogènes et porteurs de certains gènes. Ces gènes vont être intégrés dans le génome des cellules hôtes du cerveau et sécréter des substances neuroprotectrices ou des enzymes intervenant dans la synthèse de la DA (Jarraya et al. 2009).

L'une des premières approches thérapeutiques a ciblé les enzymes de la biosynthèse de la DA telles que la TH ou la L-amino decarboxylase aromatique (AADC). Les premiers résultats chez l'homme (Witt et Mark 2011) ont montré que cette thérapie est bien tolérée et qu'elle prolonge les effets de la L-dopa tout en diminuant les dyskinésies. Le second axe de développement de la thérapie génique a ciblé les facteurs neurotrophiques et en particulier la neurturine, une cytokine de la famille du GDNF qui a fait l'objet d'essais cliniques de phase I et II (Marks et al. 2008 ; 2010). Les patients MP ont reçu des injections dans le putamen de virus adéno-associé 2 (AAV2) contenant le gène codant pour la neurturine (AAV2-neurturine). Les résultats sont nuancés, avec un manque d'efficacité significative dans l'amélioration des critères cliniques et la survenue fréquente d'événements indésirables comme des hémorragies ou des tumeurs.

b) Transplantation de cellules

Cette technique consiste à transplanter des cellules souches ou dopaminergiques dans le système nerveux afin de restaurer le système dopaminergique et la synthèse de DA.

➤ **Les cellules souches embryonnaires :**

Ces cellules totipotentes peuvent en théorie se transformer en cellules neuronales capables de sécréter de la DA. Il existe encore de nombreux obstacles, en particulier liés au risque élevé de cancérisation due à la non-différenciation cellulaire (Roy et al. 2006).

➤ **Les cellules fœtales :**

Il s'agit de transplanter des cellules dopaminergiques provenant du mésencéphale de fœtus. Les résultats obtenus sur plusieurs études sont médiocres et inconstants (Olanow et al. 2009), associés à une forme potentiellement invalidante de dyskinésie qui persiste même après le retrait de la L-Dopa. Cette complication est liée à la multiplication des cellules greffées, qui secrètent en excès de la DA. De plus, les neurones dopaminergiques implantés finissent par dysfonctionner et contiennent des corps de Lewy, ce qui suggère qu'ils sont affectés par le processus pathologique de la MP (Kordower et Brundin, 2009).

➤ **Les cellules souches mésenchymateuses :**

Il s'agit de transplanter des cellules multipotentes d'origine mésodermique. Les cellules souches mésenchymateuses sont présentes dans la moelle osseuse mais également dans le sang de cordon ombilical. L'intérêt de ce type cellulaire dans le traitement de la MP réside dans le fait que ces cellules peuvent se différencier en cellules non-mésenchymateuses et surtout en cellules neuronales, qu'elles sont faciles à produire en grande quantité *in-vitro* et qu'elles présentent des propriétés immunomodulatrices qui permettraient de s'affranchir de traitement immunosuppresseur dans le cadre de greffes allogéniques (Bourin et Sensébé, 2006). Cette technique a montré des résultats encourageants dans un modèle animal de la MP avec une restauration partielle des fonctions dopaminergiques (Bouchez et al. 2008).

c) Approches thérapeutiques neuroprotectrices et anti-inflammatoires

Trois grandes approches thérapeutiques sont actuellement à l'étude afin de retarder ou même de prévenir la neurodégénérescence dopaminergique induite par le processus neuroinflammatoire :

- les approches pharmacologiques ;
- les approches d'immunomodulation ;
- les approches nutritionnelles.

Les différents agents utilisés ont pour effet soit de diminuer le stress oxydatif, soit de fournir des facteurs neurotrophiques, soit d'activer la fonction mitochondriale, soit de contrecarrer l'inflammation, soit d'induire une immunomodulation de la réaction microgliale. En raison de la complexité des interactions biochimiques des voies inflammatoires, il est probable qu'une approche multi-cibles soit nécessaire (Long-smith et al. 2009).

➤ **Approches pharmacologiques :**

- **La sélégiline et la rasagiline** sont des inhibiteurs irréversibles de la MAO-B qui préviennent notamment la transformation de la toxine MPTP en MPP⁺, son métabolite actif et diminuent la désamination de la DA en dopac, donc la formation de radicaux libres. De plus, ce sont des molécules de la famille des propargylamines qui possèdent une action anti-apoptotique. Une étude clinique récente d'évaluation de l'utilisation de la sélégiline dans la progression de la MP

a montré que la sélégiline administrée pendant 3 ans ou plus dans les stades précoces est associée à une progression plus lente de la MP (Zhao et al. 2011).

- **Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)** tels que l'aspirine, l'ibuprofène et l'indométacine inhibent l'activité de la COX. De ce fait, les AINS bloquent la production de médiateurs pro-inflammatoires comme les cytokines et les prostaglandines. Il a également été montré que les AINS réduisaient la production de molécules oxydatives (ROS) dans les cellules neuronales et désactivaient le facteur nucléaire pro-inflammatoire de transcription NFκB (Hirsch et Hunot 2009). Les AINS activent les récepteurs-gamma activés par les proliférateurs de peroxysoxe (PPARγ), médiateurs anti-inflammatoire de la microglie. De nombreuses études expérimentales dans des modèles animaux de la MP ont démontré que le pré-traitement par les AINS protège de la dégénérescence neuronale dopaminergique (Esposito et al. 2007). Bien que des études épidémiologiques aient associé la prise d'AINS à une diminution du risque de développer la MP il n'y a pas de preuve de leur efficacité dans le traitement de la maladie.

- **La minocycline** va avoir des propriétés anti-inflammatoires par l'inhibition de l'activation microgliale. Elle va également exercer un pouvoir neuroprotecteur en inhibant la libération de médiateurs apoptotiques du cytochrome-c à partir des mitochondries et du cytoplasme tels que les caspases. La minocycline a montré une efficacité dans la prévention des effets neurodégénératifs dans de nombreux modèles animaux de la MP en réduisant le stress oxydatif induit par l'activation microgliale (Quintero et al. 2006). Une étude clinique de phase II chez les patients nouvellement diagnostiqués a permis de juger utile la minocycline dans le ralentissement de la progression de la MP (NINDS NET-PD investigators, 2008).

- **Les statines** ont été proposées dans le traitement précoce de la MP. Plusieurs études épidémiologiques ont montré une relation entre une consommation accrue de cholestérol, un taux sérique important en cholestérol total et le risque de développer une MP (Mikaye et al. 2010). La simvastatine a montré dans des modèles animaux de la MP un effet neuroprotecteur des neurones dopaminergiques à travers l'inhibition de l'activation des cellules gliales et de la production de cytokines pro-inflammatoires, provoquant une atténuation de la neuroinflammation expliquant son pouvoir neuroprotecteur (Yan et al. 2011 ; Kumar et al. 2012). Cependant, une autre étude a montré qu'un taux faible en lipoprotéines de basse densité (LDL-C) était associé à une prévalence plus élevée de MP. Il apparaît alors que le taux de LDL-C soit une conséquence plutôt qu'une cause de la MP liée à une plus grande susceptibilité des parkinsoniens de porter le gène Apo-E2 (Williams-Grey et al. 2009).

- **L'ubiquinone (CoQ10)** est une coenzyme intermédiaire qui a la capacité de transférer des électrons le long des complexes I à III. La CoQ10 possède un effet antioxydant en inhibant la prolifération de radicaux libres et protège ainsi les membranes microsomaux humaines.

Plusieurs études *in-vivo* chez l'animal ont montré une réduction de la destruction des neurones dopaminergiques induite par le MPTP après administration de CoQ10 (Moon et al. 2005). Par ailleurs, il a été retrouvé un taux de CoEnzyme Q10 diminué chez des sujets parkinsoniens. En accord avec ces observations, les essais cliniques de phase II ont permis de mettre en évidence un ralentissement de la neurodégénérescence et une diminution des symptômes chez des patients atteints de la MP traités avec une forte dose de CoQ10 suggérant que celle-ci peut ralentir la progression de la MP (Liu et al. 2011). Récemment une étude de phase III a été lancée afin d'évaluer l'effet de CoQ10 sur l'évolution de la MP (Kones 2010).

- **La créatine** joue le rôle de réservoir d'énergie permettant la synthèse d'ATP. Elle stabilise la créatine kinase mitochondriale et empêche l'activation de la perméabilité mitochondriale de transition qui habituellement condamne la cellule par apoptose suite au stress oxydatif induit, ayant ainsi un effet neuroprotecteur dose-dépendant (Schlattner et al. 2006). Il a été récemment observé les effets additifs neuroprotecteurs d'une combinaison de la CoQ10 avec de la créatine dans un modèle animal de la MP (Beal et al. 2011). Cette combinaison a également bloqué le développement des agrégats d' α -synucléine. Un essai clinique de phase II a montré une amélioration de la MP liée à la prise de créatine (NINDS NET-PD investigators, 2006). La créatine est aujourd'hui testée dans un essai clinique de phase III avec le recrutement de patients à un stade précoce non traités qui devrait durer 5-7 ans (Kones 2010).

➤ **Approches d'immuno-modulation de l'immunité innée :**

- **Les agonistes des PPAR γ , la pioglitazone et la rosiglitazone** présentent des effets neuroprotecteurs dans le SNC en empêchant l'inflammation, les dommages oxydatifs et l'apoptose (Chaturvedi et Beal, 2008). Les études précliniques ont montré que la pioglitazone peut prévenir la perte cellulaire dopaminergique induite par le MPTP. Cet effet s'explique par l'inhibition de la MAO-B qui est responsable de la conversion du MPTP en MPP + son métabolite toxique (Quinn et al. 2008). Récemment, les effets neuroprotecteurs de la rosiglitazone ont été démontrés dans le modèle animal de la MP, à travers la baisse de l'activation des microglies dans la SNc (Schintu et al. 2009). Un autre avantage majeur des agonistes des PPAR γ est leur rôle dans la régulation de la chaîne bioénergétique mitochondriale au-delà de leurs propriétés immunomodulatrices. Ces effets cumulés font de ces molécules une nouvelle perspective thérapeutique intéressante pour la MP (Hirsch et Hunot 2009).

- **Les agonistes des récepteurs alpha7-nicotinique d'acétylcholine :** Il a été démontré, *in-vitro* et *in-vivo*, que l'activation des cellules microgliales peut être sensiblement inhibée par l'activation des récepteurs de surface cellulaire α 7-nicotinique d'acétylcholine (Simone et al. 2005). Parce que le tabac est associé à une incidence plus faible de la MP, il est tentant de penser que la nicotine soit le responsable des effets protecteurs chez les fumeurs. Pour appuyer

cette hypothèse, il a été observé que la nicotine avait des effets de protection sur les voies nigrostriées chez la souris et le primate non-humain intoxiqués au MPTP (Quik et al. 2006). Les effets neuroprotecteurs de la nicotine ne sont pas limités à un mécanisme anti-inflammatoire, ces études suggèrent que les agonistes des récepteurs alpha7, comme les quinuclidines, pourraient avoir un effet sur l'immunité adaptative associée à l'activation microgliale dans la MP et mériteraient une évaluation préclinique plus approfondie.

➤ **Approches d'immuno-modulation de l'immunité adaptative :**

L'immuno-intervention basée sur l'utilisation d'antigène est apparue comme un moyen de rediriger les effets nocifs des lymphocytes T dans un processus anti-inflammatoire et neuroprotecteur. Une telle approche thérapeutique a été testée avec succès en préclinique par l'utilisation d'un polymère d'acides gras, l'acétate de glatiramère ou Copaxone, en tant que vaccination à base d'antigène. L'acétate de glatiramère administré à des animaux exposés au MPTP atteint les zones du cerveau lésées et peut supprimer l'activation des cellules microgliales, les cellules T recrutées stimulent alors la synthèse de facteur neurotrophique astrocytaire (GDNF), ce qui confère une neuroprotection contre la mort neuronale (Johnston et al. 2008). Les lymphocytes T impliqués dans ce résultat sont CD4+ / CD25+ caractéristiques de la population connues pour produire des quantités élevées de cytokine anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- β). Le bénéfice que l'immunisation active de l'acétate de glatiramère ou d'autres antigènes, qui induisent des lymphocytes T suppresseurs à libérer des cytokines inhibitrices pourrait apporter dans la MP, doit être évalué. Par ailleurs, l'immunomodulation par la vaccination contre d'autres constituants moléculaires du système nerveux, tels que la myéline oligodendrocyte glycoprotéine (MOG), ou un traitement avec l'adjuvant complet de Freund, peut moduler l'étendue de la lésion nigrostriatale induite par le MPTP chez la souris et justifie l'utilisation de cette stratégie vaccinale (Kukowska-Jastrzebska et al. 2005). Cependant, il reste de nombreuses étapes à franchir pour développer une vaccination efficace dans la MP, en effet le mode d'administration de l'antigène conditionne l'efficacité et la tolérance du traitement.

➤ **Approches nutritionnelles :**

- **Les acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI n-3)**, appelés parfois oméga-3, sont un groupe d'acides gras essentiels qui font partie intégrante des membranes cellulaires dont ils assurent la fluidité. L'acide docosahexaénoïque (DHA) constitue 40 à 60% des acides gras estérifiés des phospholipides membranaires des neurones. Ils jouent donc un rôle crucial dans le maintien de la fonction neurologique normale. Les AGPI n-3 sont exclusivement apportés par l'alimentation. Des études épidémiologiques ont montré qu'une consommation accrue de AGPI n-3 était associée à un risque significativement inférieur du développement de la MP. Il a été

démontré dans des modèles animaux de la MP qu'un régime enrichi en AGPI n-3 et pauvre en graisses avait un fort effet neuroprotecteur contre la neurodégénérescence dopaminergique à travers un effet antioxydant (Calon et Cichetti 2008). Ceci a été corroboré par le fait que les dommages oxydatifs de la membrane constituée des AGPI jouent un rôle majeur dans la dysfonction mitochondriale liée à la MP (Schepinov et al. 2011). Des études ont montré qu'un médiateur dérivé du DHA, la D1 neuroprotectin (NPD1), retrouvé en grande quantité dans l'huile de poisson, exerce des effets neurotrophiques bénéfiques, il régule positivement les composés anti-apoptotiques de la famille du gène Bcl-2 et négativement les médiateurs pro-inflammatoires (Niemoller et al. 2009).

- **La vitamine D calcitriol (1,25-dihydroxyvitamine D)** est importante dans la régulation de la synthèse des neurotrophines, de la iNOS, des monoamines ainsi que dans la répression de l'apoptose. Elle facilite également l'utilisation du Ca²⁺ par l'organisme indispensable au bon fonctionnement du SNC. De plus, elle joue un rôle dans la diminution de la neuroinflammation en interaction avec d'autres composés comme les prostaglandines. Plusieurs études cliniques ont montré des taux sériques plus faibles en vitamine D chez les patients parkinsoniens comparativement à des sujets sains (Evatt et al. 2008). Récemment, il a été observé chez 157 patients avec une MP précoce non traités une forte prévalence d'insuffisance (69,4%) et de carence (26,1%) en vitamine D (Evatt et al. 2011). Ces résultats sont cohérents avec l'hypothèse qu'une insuffisance à long terme est un facteur de risque dans la pathogenèse de la MP.

- **La vitamine A (Acide rétinoïque), la vitamine E (tocophérol) et la vitamine C (acide ascorbique)** ont un rôle antioxydant très important. Elles éliminent certains radicaux libres et empêchent l'oxydation des acides gras polyinsaturés. Ces effets antioxydants en font des composés pouvant réduire la neuroinflammation impliquée dans la MP. Il a été démontré que la vitamine A régule la production de MCP-1 et de plusieurs autres cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL1- β) (Kolseth et al. 2012). La Vitamine E inhibe l'activation de la phospholipase A2 et donc la cascade arachidonique induite par le glutamate. Une méta-analyse d'études observationnelles a conclu qu'un apport alimentaire important en vitamine E avait des effets neuroprotecteurs et atténue le risque de développer la MP (Etminan et al. 2005). Une étude récente a montré une relation entre la consommation alimentaire augmentée en vitamine A et E et la réduction du risque de MP (Miyake et al. 2011). Cependant, une autre étude clinique importante ayant comme objectif d'observer les avantages d'un traitement associant déprényl (sélégiline) et α -tocophérol à ralentir la progression de la MP n'a trouvé aucune différence entre le groupe traité et le groupe témoin (Miklya et al. 2003). Ce résultat a été attribué à l'incapacité de la vitamine E synthétique de traverser la BHE contrairement à la vitamine E naturelle.

CHAPITRE II : MODELES ANIMAUX DE LA MALADIE DE PARKINSON

L'utilisation de modèles animaux de la MP est indispensable pour une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de la maladie humaine et la définition de nouvelles approches thérapeutiques. Un bon modèle animal de la MP doit présenter une lésion spécifique de la voie nigro-striée, reproductible et n'induisant pas de mortalité ou de privation des fonctions vitales. Les premiers modèles ont été développés à partir de l'utilisation de toxines : la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) chez le rat et le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) chez la souris et le primate. Les toxines utilisées telles que la 6-OHDA, le MPTP, le LPS ou la roténone sont capables de reproduire certaines caractéristiques anatomopathologiques et/ou biochimiques de la MP. L'identification de mutations génétiques dans certaines formes familiales de la MP, a plus récemment conduit au développement de modèles animaux transgéniques tel que le modèle A53T- α -synucleine.

I. MODÈLES D'INTOXICATION À LA 6-OHDA

La 6-OHDA est un analogue hydroxylé de la DA. Elle représente l'une des neurotoxines les plus employées pour induire, dans les modèles *in-vitro* et *in-vivo*, la dégénérescence des projections catécholaminergiques, incluant le système nigro-strié. En 1968, le premier modèle animal de la MP a été créé avec l'injection de 6-OHDA au niveau de la SNc chez le rat (Ungerstedt 1968). De par son mimétisme chimique avec les catécholamines, la toxicité induite par la 6-OHDA est sélective des neurones catécholaminergiques car elle possède une forte affinité pour le transporteur noradrénergique (NET) et le DAT. Ainsi cette neurotoxine permet de produire des lésions nigrales apparentées à celles observées dans la MP idiopathique humaine.

1. Mécanisme d'action de la 6-OHDA

Chez l'homme, une production physiologique basale endogène de 6-OHDA a été décrite dans la SN. Elle est issue d'un mécanisme non-enzymatique d'oxydation de la DA par le H₂O₂ et des ions Fe²⁺ présents en grande quantité dans les neurones dopaminergiques. Chez les parkinsoniens, la production endogène de 6-OHDA est accrue du fait d'une augmentation

pathologique des taux de radicaux libres et de Fe^{2+} , ce qui renforce l'intérêt de ce modèle. La lésion neuronale induite par la 6-OHDA est principalement due à un stress oxydatif massif. La 6-OHDA entre dans les neurones dopaminergiques par les DAT, puis elle s'accumule dans le cytosol et subit rapidement un phénomène d'auto-oxydation qui se traduit par la formation d'un taux élevé de radicaux libres (H_2O_2). Elle induit la mort cellulaire des neurones dopaminergiques par trois principaux mécanismes (Figure 13).

1) la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) générés par l'auto-oxydation intra ou extracellulaire à partir du H_2O_2 via la réaction de Fenton. De plus, la 6-OHDA favorise le stress oxydatif en réduisant l'activité du glutathion et de la superoxyde dismutase et en augmentant celle de la NADPH oxidase (Rodriguez-Pallares et al. 2007).

2) la formation de H_2O_2 induite par l'activation de la MAO. La 6-OHDA est un substrat pour la MAO, la génération de ROS peut résulter de sa désamination par la MAO. Une implication de la MAO a été suggérée à la suite du constat que la sélégiline, un inhibiteur de la MAO (MAO-I), empêche la toxicité de la 6-OHDA (Salonen et al. 1996).

3) l'accumulation de la 6-OHDA dans les mitochondries, où elle inhibe l'activité de la chaîne respiratoire par le blocage du complexe I induisant un phénomène oxydatif indirect (Betarbet et al. 2002).

Ces mécanismes physiopathologiques de la lésion ne sont pas nécessairement liés mais semblent agir en synergie et induisent un stress oxydatif amplifié par la présence de Ca^{2+} libre cytoplasmique et une diminution de l'ATP cellulaire. L'intense stress oxydatif provoque des altérations des systèmes de détoxification et du potentiel redox intracellulaire, la dépolymerisation de la tubuline et surtout la peroxydation de molécules cellulaires comme les lipides et les acides nucléiques, conduisant à la mort cellulaire par apoptose (Blum et al. 2001).

Par ailleurs, la lésion nigro-striatale à la 6-OHDA est associée à une réaction inflammatoire marquée qui est exprimée par l'activation des cellules microgliales dans la voie nigrostriatale. Une augmentation significative de la microglie activée a été mise en évidence par immunohistochimie anti-CMH classe II dans la SNc de rats intoxiqués à la 6-OHDA (Crotty et al. 2008). D'autres études ont montré une activation microgliale chez la souris et le rat avec une augmentation de la production de molécules pro-inflammatoires comme l' $IL-1\beta$ et le $TNF-\alpha$ (Rogers et al. 2007). Ces observations ont été confirmées dans le modèle de rat 6-OHDA avec la technique d'imagerie TEP qui a permis de visualiser la relation entre l'activation microgliale et la neurodégénérescence dopaminergique à travers l'évolution de radioligands spécifiques (Cicchetti et al. 2002). La neuroinflammation à travers l'activation microgliale est donc un facteur important dans le processus neurodégénératif induit par la 6-OHDA.

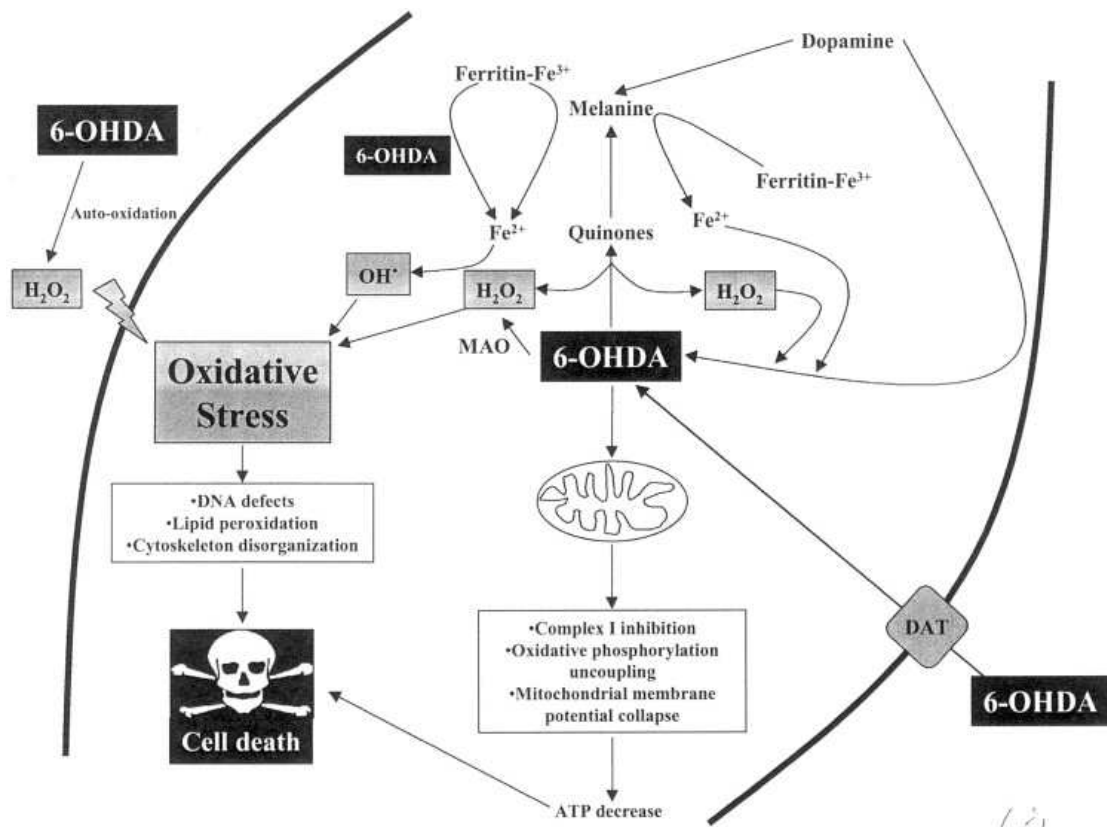


Figure 13 : Mécanismes hypothétiques du mécanisme d'action de la 6-OHDA, d'après Blum et al. 2001

2. Les différents modèles animaux utilisant la 6-OHDA

Comme la DA, la 6-OHDA ne traverse pas la BHE et doit de ce fait être injectée par stéréotaxie dans le cerveau. L'injection de la 6-OHDA a été étudiée dans différentes espèces incluant la souris, le rat et les primates non-humains. Le rat est l'espèce la plus utilisée. C'est un modèle stable, reproductible et la taille de l'animal permet de réaliser des lésions stéréotaxiques de précision. Chez le rat, l'intensité de la lésion varie en fonction de la dose injectée, du nombre d'injections et de la structure du cerveau dans laquelle la toxine est injectée (Blandini et al. 2008). Par ailleurs, la lésion peut être unilatérale ou bilatérale. Cependant, l'injection est généralement réalisée de façon unilatérale. Bien que le modèle de lésion bilatérale présente les caractéristiques motrices essentielles de la MP, perte de l'équilibre, augmentation de la résistance musculaire, et l'apparition de tremblements, il est peu utilisé en raison du taux élevé de mortalité et par le fait que le rat lésé bilatéralement nécessite des soins intensifs.

L'injection stéréotaxique unilatérale de 6-OHDA induit un syndrome hémiparkinsonien qui possède deux avantages majeurs : - l'hémisphère intact sert de contrôle interne par rapport à l'hémisphère lésé dans l'analyse des différentes structures touchées ; - ce modèle induit des déficits sensorimoteurs qui ont permis de mettre au point des tests comportementaux comme le test de rotation qui est le plus utilisé.

Le principe du test de rotation est l'induction d'un comportement moteur rotatoire asymétrique après injection d'apomorphine ou d'amphétamine. Classiquement, les rats avec une lésion unilatérale de la voie nigro-striée présentent une rotation controlatérale au côté lésé quand ils reçoivent un agoniste dopaminergique direct, comme l'apomorphine, tandis qu'ils ont une rotation du côté lésé ou ipsilatérale lorsqu'ils sont injectés avec un agoniste dopaminergique indirect comme l'amphétamine qui agit comme un stimulateur présynaptique, en favorisant la libération de DA à partir des terminaisons du striatum. Son injection crée donc un déséquilibre en DA qui favorise le système nigro-strié non-lésé et induit des rotations ipsilatérales (Meredith et Kang 2006). L'apomorphine induit pour sa part des rotations du côté non-lésé ou controlatéral à cause de la stimulation des RD2 postsynaptiques qui sont régulés à la hausse en compensation à la dénervation du striatum ipsilatéral (Carey, 1990). L'intensité de la lésion peut alors être quantifiée de manière indirecte par le nombre de rotations réalisées par l'animal en un temps déterminé. Ceci-dit, il a été démontré qu'à faible niveau de perte dopaminergique, des phénomènes compensatoires se mettent en place par augmentation de la synthèse de DA par les neurones intacts de la SNc ou par l'augmentation des taux de DA endogène libérés dans l'espace extracellulaire du striatum lésé. De ce fait, les animaux avec une lésion restreinte de la SNc, induisant une baisse modérée de la densité des neurones dopaminergiques dans le striatum ne montrent pas de comportement rotatoire après stimulation par l'apomorphine alors qu'il existe lors de la stimulation par l'amphétamine. Par ailleurs, la récupération partielle de la fonction motrice dans les mois qui suivent l'administration de 6-OHDA peut être observée chez les animaux portant des lésions partielles de la voie nigrostriatale (Blandini et al. 2008).

Trois modèles sont couramment décrits et utilisés dans la littérature. Ils diffèrent par le site d'injection de la neurotoxine. Les sites préférentiels d'injection de la 6-OHDA sont le faisceau médian du télencéphale (MBF), la substance noire compacte (SNc) et le striatum:

➤ **Injection de la 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale (MBF).**

Le modèle animal de lésion unilatérale dans le MBF est le plus utilisé en recherche pré-clinique sur la MP. Ce type d'injection peut provoquer une perte totale de la DA dans le striatum ipsilatéral selon la dose utilisée. Elle induit également une hypersensibilité des récepteurs dopaminergiques post-synaptiques dans le striatum ipsilatéral après l'élimination d'au moins 90% des neurones dopaminergiques de la SNc. A plus faible intensité de lésion, il n'y a pas de phénomène d'hypersensibilité, il est compensé par une augmentation de la synthèse de DA par les cellules résiduelles de la SNc (Kowall et al. 2000) ou par augmentation de la quantité de DA endogène dans le striatum. Par ailleurs, ce modèle de lésion présente un comportement rotatoire

caractéristique. La lésion unilatérale du MBF cause une asymétrie motrice et donc une asymétrie rotatoire. Cependant selon l'importance de la lésion et du déficit de DA dans le striatum, les animaux sont soit stimulés par l'injection d'apomorphine (déficit en DA de 99%), soit non stimulés par l'injection d'apomorphine (déficit en DA de 75%) (Berneoud et al. 1995).

➤ **Injection de 6-OHDA dans la substance noire**

Ce type d'injection a été utilisé dans le but de créer un modèle animal plus sélectif avec une lésion spécifique de la voie nigro-striée. La sévérité de la lésion dépend de la dose utilisée. La lésion standard se caractérise par la perte d'environ 90% des neurones dopaminergiques de la SNc. Plusieurs zones de la SNc ont été ciblées dans le but de reproduire au mieux la lésion humaine qui montre une perte dopaminergique localisée dans la zone latérale de la SNc. Il a été démontré qu'une injection latérale de 6-OHDA dans la SNc induit une perte neuronale plus importante que lors d'une injection dans la zone médiane (Dentresangle et al. 2001). De plus, on sait que la distribution des fibres dopaminergiques dans le striatum et la distribution des neurones dopaminergiques de la SNc sont corrélées. Enfin, il a été démontré que la quantité de neurones dans la SNc, la densité des fibres neuronales dans le striatum et le nombre de rotations effectuées sous induction d'apomorphine sont corrélés. Ainsi le comportement rotatoire sous apomorphine permet de prédire le degré du déficit neuronal dans la SNc et le déficit dans le striatum. Par ailleurs, l'injection dans la SNc induit des contraintes techniques importantes dues à la petite taille de la structure.

➤ **Injection de 6-OHDA dans le striatum :**

Dans ce modèle, la 6-OHDA est injectée dans le striatum, où les projections des neurones du SNc sont situées (Sauer et Oertel 1994). La 6-OHDA pénètre dans le neurone grâce au transporteur de la dopamine (DAT) présynaptique et induit des dommages des terminaisons nerveuses du striatum, suivie par une perte cellulaire retardée, progressive des neurones de la SNc à travers un mécanisme rétrograde. Le degré de lésion dans la SNc obtenu avec cette procédure est moins marqué, par rapport à celui obtenu lors d'une injection directement dans le MBF ou le SNc, avec une perte d'environ 50 à 70% des neurones dopaminergiques (Blandini et al. 2007). Ce type d'injection permet d'obtenir un modèle hautement sélectif et spécifique de destruction des neurones de la voie nigro-striée.

Deux régions du striatum ont été particulièrement utilisées : la région ventrolatérale et la région dorsomédiane du striatum. L'aire ventrolatérale représente l'équivalent du putamen et l'aire dorsomédiane représente l'équivalent des noyaux caudés chez l'homme. Une lésion de l'aire ventrolatérale provoque des troubles de l'initiation du mouvement, l'orientation sensorimotrice

et le comportement moteur spécifique. Le modèle animal de rat lésé dans la zone ventrolatérale du striatum est l'un des modèles qui mime le mieux la pathologie idiopathique chez l'homme. Les effets de la 6-OHDA dépendent du nombre d'injections, de la dose totale injectée et du ou des sites d'injection. On sait qu'une injection unique n'a d'effet que sur l'intensité de la destruction des fibres dopaminergiques, alors que la même dose distribuée en plusieurs injections le long de l'axe latéral du striatum induit une lésion des neurones dopaminergiques mais aussi un déficit comportemental rotationnel sévère (Kirik et al. 1998). Le modèle animal de MP doit présenter une baisse de 70 à 100% de la densité de fibres dopaminergiques dans le striatum afin de mimer l'atteinte neuronale chez l'homme. Dans cette optique, il a été comparé les effets d'une simple et d'une double injection d'une même dose de 6-OHDA dans le striatum chez le rat (Ben et al. 1999). Il en résulte qu'une double injection induit une lésion stable avec une perte d'environ 80-90 % du taux de DA striatale, alors qu'une simple injection est soumise au phénomène de compensation et ne permet pas la stabilité de la lésion (Barneoud et al. 2000).

La polyvalence est une autre caractéristique importante du modèle à la 6-OHDA. En fonction du site et du nombre d'injection, une lésion complète et immédiate ou partielle et progressive de la SNc peut être obtenue. Ainsi, si l'expression motrice et les conséquences neurobiologiques d'une lésion nigrostriatale doivent être étudiées, une lésion totale sera nécessaire, par conséquent, la 6-OHDA sera infusée dans la SNc ou dans le MFB. Cela s'applique, par exemple, à l'étude des mouvements involontaires anormaux liés à la prise prolongée de la L-dopa, qui ne se développent pleinement qu'en présence d'une lésion nigrostriatale massive. Alors que, si les stratégies thérapeutiques visant à interférer avec le processus neurodégénératif sont à tester, une évolution lente et progressive de la lésion du SNc sera nécessaire. Dans ce cas, la perte progressive des cellules obtenues avec une injection intrastriatale de la 6-OHDA fournit un meilleur outil pour tester les traitements neuroprotecteurs innovants (Armentero et al. 2006).

Bien qu'elle n'induisse pas l'apparition de corps de Lewy et ne mime pas toutes les caractéristiques de la pathologie humaine, l'injection unilatérale intracérébrale de 6-OHDA est à ce jour le modèle de référence pour l'obtention d'une lésion nigrostriatale contrôlée et stable chez l'animal (Blandini et al. 2008). Plus important encore, la lésion obtenue par injection de 6-OHDA, dans la SNc ou dans le striatum, est hautement reproductible. Cela représente une valeur ajoutée considérable à ce modèle surtout lorsque de nouvelles stratégies thérapeutiques doivent être étudiées et des effets neuroprotecteurs doivent être démontrés.

C'est pour cette raison et par l'expérience que nous en avons au sein de l'équipe de recherche que ce modèle animal de MP a été choisi dans le cadre du travail expérimental de cette thèse.

II. MODÈLE D'INTOXICATION AU MPTP

Le MPTP est utilisé dans l'industrie comme intermédiaire de synthèse, le chlorure du métabolite toxique MPP⁺ a été transformé en herbicide, le Cyperquat, substance proche du Paraquat, actuellement largement utilisé en agriculture. Depuis la découverte de cas juvéniles de syndromes parkinsoniens dans une population américaine de toxicomanes, ainsi que la mise en évidence de la responsabilité du MPTP dans le développement de la pathologie, cette molécule a été employée pour mettre au point des modèles animaux de la MP (Fahn et al. 1996).

1. Mécanisme d'action du MPTP

Le MPTP lui-même n'est pas toxique et comme tout composé hautement lipophile traverse facilement la BHE. Une fois dans le cerveau, le MPTP entre dans les cellules gliales et astrocytaires où il est oxydé grâce à la MAO-B en MPP⁺, son métabolite actif, qui est libéré dans le milieu extracellulaire. Le MPP⁺ a une forte affinité pour le DAT qui permet son entrée dans les neurones dopaminergiques (Blum et al. 2001) (Figure 14). Le MPP⁺ s'accumule dans le cytoplasme où il se lie à la neuromélanine qui retarde sa libération dans l'espace synaptique. Le MPP⁺ peut également être stocké dans les vésicules de stockage de la DA grâce à son affinité pour le VMAT2. En parallèle, cette molécule est transportée de manière active vers les mitochondries où il inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire et dans une moindre mesure les complexes III et IV. Cette inhibition diminue la quantité d'ATP synthétisée, ce qui génère la production de ROS en excès. Le stress oxydatif induit par l'intoxication au MPTP est associé, comme pour l'intoxication à la 6-OHDA, à la présence accrue de fer dans la SNc. Ce stress oxydatif conduit à la mort neuronale par apoptose (Wu et al. 2003).

Par ailleurs, il a été démontré que le MPTP induit également une réponse inflammatoire chez l'homme et le primate non-humain (Langston et al. 1999). Cette réponse inflammatoire du MPTP est liée à l'activation microgliale. L'augmentation de l'expression des antigènes CMH de classe I et II et de la iNOS a été démontrée chez la souris intoxiquée au MPTP, ainsi qu'une augmentation des cytokines pro-inflammatoires comme les interleukines IL-1 β , IL6, IL10 et le TNF- α (Mandel et al. 2003). De plus, une augmentation des lymphocytes-T a récemment été décrite dans le cerveau des souris intoxiquées au MPTP (Brochard et al. 2009). Enfin, plusieurs

études chez la souris et le primate non-humain ont montré que la perfusion intrastriatale de MPP⁺ provoque une libération prolongée de DA accompagnée d'une diminution des concentrations de DOPAC et HVA qui peuvent être considérées comme la première étape de l'épuisement dopaminergique dans le striatum induite par le MPTP. (Serra et al. 2008).

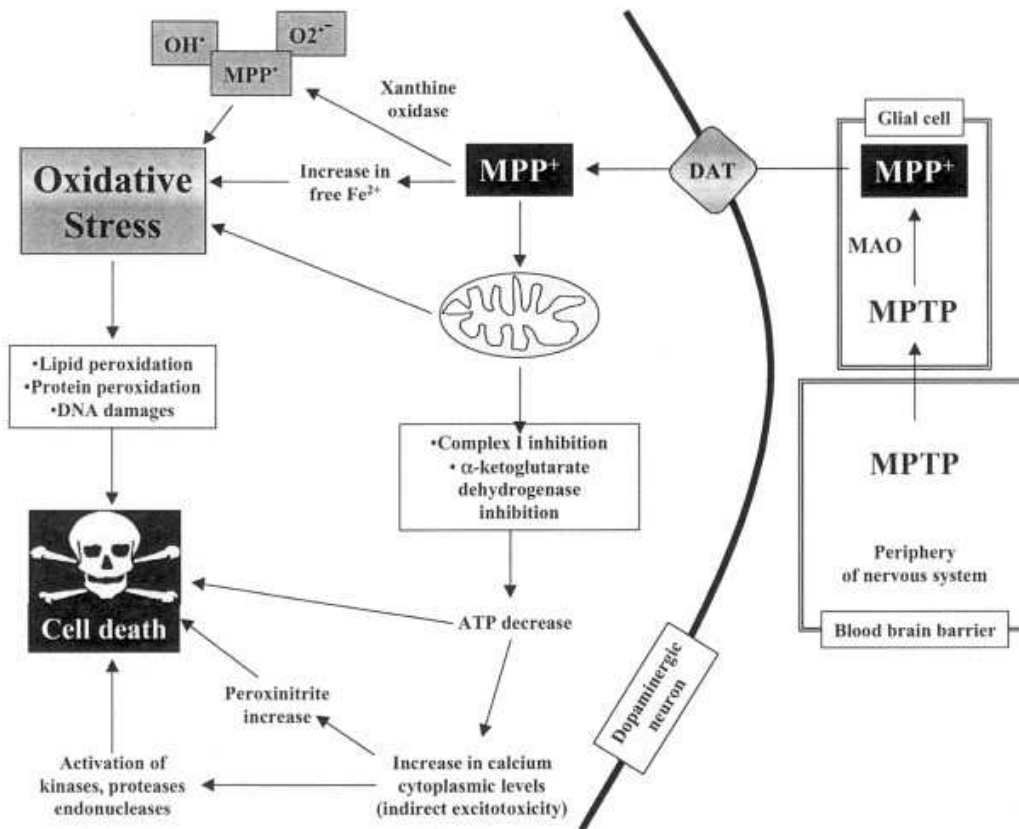


Figure 14 : Schéma hypothétique du mécanisme d'action du MPTP, d'après Blum et al. 2001

2. Les différents modèles animaux utilisant le MPTP

Les caractéristiques biochimiques et histologiques ont démontré que le syndrome parkinsonien induit par le MPTP chez l'homme, reflète les caractéristiques relevées dans le développement de la MP idiopathique. Le MPTP a donc été utilisé pour la mise au point de modèles animaux de la MP. Il existe une différence de sensibilité au MPTP selon l'espèce animale utilisée. La biodistribution du MPTP et son taux de transformation en son métabolite actif le MPP⁺, les différents sous-types de MAO, ainsi que le métabolisme de la DA, pourraient expliquer ce phénomène. Il existe deux espèces plus sensibles, le singe et la souris (Fox et al. 2010 ; Serra et al. 2008). Le rat est insensible au MPTP par le fait de la présence d'une barrière enzymatique due au fort niveau de MAO-B dans les capillaires sanguins du cerveau qui oxyde rapidement le MPTP en MPP⁺ qui se fixe à la membrane des cellules épithéliales empêchant le MPP⁺ d'accéder aux neurones dopaminergiques (Riachi et Harick, 1988).

➤ **Modèle de singe intoxiqué au MPTP :**

Chez les primates non-humains, le MPTP produit un syndrome parkinsonien sévère et stable répliquant tous les symptômes de la MP idiopathique. L'administration de MPTP induit une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée et l'apparition de micro-inclusions eosinophiles apparentées aux corps de Lewy (McCormack et al. 2008). Chez le singe, le protocole d'intoxication le plus employé est l'injection multisystémique ou l'infusion intracarotidienne (Fox et al. 2010). Le singe est une espèce très sensible au MPTP, une injection systémique en intramusculaire pendant plusieurs jours consécutifs induit une mort cellulaire aiguë et sévère, cependant les animaux présentent une grande variabilité interindividuelle. Pour induire une lésion moins sévère avec moins de variabilité interindividuelle, il est nécessaire d'administrer le MPTP une ou deux fois par semaine pendant plusieurs semaines selon l'intensité de la lésion souhaitée (Langston et al. 2000). Ce protocole induit une dégénérescence lente, progressive et stable. L'administration intracarotidienne est un protocole attrayant car il réduit énormément la variabilité interindividuelle observée après injection systémique de MPTP et présente un taux de mortalité nul (Fox et al. 2010). Les singes traités au MPTP développent des troubles moteurs similaires à ceux rencontrés chez l'homme parkinsonien. D'un point de vue histopathologique ces animaux présentent une destruction sélective des neurones de la SNc. Par ailleurs, une étude a montré dans ce modèle animal une bonne corrélation entre l'évolution de l'imagerie TEMP du DAT, la numération des neurones Nissl+ et les scores des tests comportementaux (Ashkan et al. 2007). Le modèle de singe intoxiqué au MPTP a l'avantage d'être proche de la MP chez l'homme. Cependant, l'intoxication au MPTP induit une dégénérescence plus rapide même lors d'une intoxication chronique que celle observée chez l'humain. Par ailleurs, le singe est un modèle coûteux incluant des contraintes d'hébergement et éthiques, il est donc difficile d'étudier un nombre significatif d'animaux simultanément.

➤ **Modèle de souris intoxiquée au MPTP**

La souris est le second modèle d'intoxication par le MPTP le mieux caractérisé et le plus utilisé bien que moins sensible au MPTP que le singe. Ce modèle nécessite l'injection d'une forte dose de MPTP pour observer une diminution significative des neurones dopaminergiques. L'injection systémique de MPTP entraîne une dégénérescence bilatérale des neurones nigro-striés mais n'induit pas l'apparition de structure apparentée aux corps de Lewy. C'est le modèle le plus utilisé pour les études physiopathologiques, en revanche il se révèle peu fiable pour les études comportementales (Luchtman et al. 2009).

Chez la souris les facteurs influençant la reproductibilité de la lésion sont le genre, l'âge et le poids. Des souris mâles de la lignée C57/BL6 âgés de huit à dix semaines et pesant de 25 à 30 g ont montré une bonne sensibilité au MPTP et la reproductibilité de la lésion semble maximale

(Przedborski et Vila, 2003). La toxine peut être administrée par plusieurs voies, l'injection systémique par voie sous-cutanée, intraveineuse ou intrapéritonéale. Récemment, un modèle d'intoxication par voie intra-nasale a vu le jour (Prediger et al. 2011). L'intoxication par injection systémique intrapéritonéale reste le protocole le plus utilisé. La souris intoxiquée au MPTP est un modèle facile à réaliser techniquement, il est économique et permet l'étude simultanée de nombreux animaux. La dose de MPTP injectée ainsi que le protocole d'injection permettent d'obtenir des modèles animaux mimant différents stades de la MP.

L'intoxication aiguë induit une dégénérescence rapide des neurones dopaminergiques essentiellement par nécrose et provoque un taux de mortalité important, en revanche l'intensité de la lésion est quantifiable par des tests comportementaux spécifiques (Przedborski et Vila, 2003). L'intoxication aiguë permet d'obtenir un modèle pré-symptomatique après une unique injection systémique de MPTP ou un modèle mimant la phase précoce de la MP après quatre injections de MPTP en intrapéritonéal à deux heures d'intervalle (Jackson-Lewis et Przedborski, 2007). La diminution des neurones dopaminergiques au niveau du striatum peut varier de 40% (MPTP à 14 mg / kg × 4) à environ 90% (MPTP à 20 mg / kg × 4) 7 jours après l'intoxication. Une étude utilisant l'imagerie TEP des DAT dans un modèle d'intoxication aiguë au MPTP chez la souris a montré une baisse de 60% de la liaison au niveau du striatum reflétant la perte neuronale dopaminergique (Honer et al. 2006).

L'intoxication chronique provoque une dégénérescence plus progressive et chronique des neurones dopaminergiques essentiellement par apoptose. Le modèle d'intoxication chronique ne permet pas d'évaluation comportementale avec les tests classiques. Ce modèle peut être obtenu après injection de 4 mg/kg/jour de MPTP pendant au moins 20 jours, il peut également être obtenu par une à deux injections de 20 mg/kg/jour de MPTP en intrapéritonéal pendant au moins 5 jours consécutifs (Luchtman et al. 2009). Une étude a montré chez la souris soumise à une injection de 30 mg/kg par jour pendant 5 jours consécutifs de MPTP, que la mort des neurones nigro-striée a lieu à partir de 6 jours après la lésion, et le tissu dopaminergique striatal est diminué de 59% 1 jour après la fin de la lésion (Serra et al. 2002). Un nouveau modèle d'intoxication chronique a récemment été utilisé, il s'agit de l'injection répétée sur 5 semaines de MPTP en association avec le probénécide qui ralentit la clairance du MPTP. Ce modèle (MPTP / p) a montré chez la souris une perte des neurones dopaminergiques dépassant 60% dans la SNc et une diminution du taux de DA striatale de 70 à 80% (Meredith et al, 2008). Le modèle d'intoxication chronique permet des études de neuroprotection, de neuroréparation et des mécanismes compensatoires mis en place.

III. MODÈLE D'INTOXICATION AU LPS

Le lipopolysaccharide (LPS) est un composant essentiel de la paroi externe des bactéries gram négatif. Il s'agit d'une endotoxine capable d'activer les cellules microgliales (Kim et al. 2000).

1. Mécanisme d'action du LPS

Bien que les mécanismes moléculaires précis de l'action responsable de la neurotoxicité induite par le LPS ne soient pas complètement connus, il est clair qu'une interaction complexe existe entre l'activation microgliale, la production des divers facteurs pro-inflammatoires et immunomodulateurs et cette neurotoxicité (Sanlioglu et al. 2001). Le LPS se lie à son récepteur CD14 qui est ancré dans le feuillet externe de la membrane plasmique des cellules microgliales. La transduction du signal à travers la membrane plasmique est rendue possible grâce à l'interaction du LPS avec le complexe transmembranaire CD14 / TLR4 et la protéine adaptatrice MD-2 (Dutta et al. 2008). Le signal déclenche l'activation de kinases et de différentes voies de signalisation intracellulaires. La cascade MyD88-dépendante initie l'activation du facteur de transcription du facteur nucléaire kB (NF-kB) ou de la voie MAPK, conduisant à l'expression des gènes de molécules pro-inflammatoires (interféron- α , IL-6 et récepteur d'IL-6), à l'augmentation de production des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β) et d'autres médiateurs de l'inflammation (NO, PGE2 et COX -2) (Koprach et al. 2008). Par ailleurs, l'activation microgliale induite par le LPS conduit à un stress oxydatif qui se traduit par une libération accrue de ROS extracellulaire tels que la superoxyde qui peut se combiner au NO pour former du peroxynitrite très toxique pour la cellule, et une augmentation de la concentration intracellulaire de ROS qui renforcent l'expression des gènes du TNF- α , IL-1 β , et de la COX-2 (Wang et al. 2004) (Figure 15). Ces médiateurs pro-inflammatoires solubles induisent collectivement la lésion neuronale dopaminergique nigro-striée. Les neurones stressés, libèrent à leur tour des médiateurs (MMP-3 et α SYN) qui aggravent l'activation microgliale provoquant un cercle vicieux neurodégénératif. L'injection de LPS provoque donc une forte activation de la microglie et la dégénérescence qui peut être spécifique et sélective des neurones dopaminergiques dans la SNc et le striatum si il est injecté in-situ. En revanche, le LPS ne semble pas avoir un effet direct sur les neurones en raison de

leur manque d'expression du récepteur TLR4, ce qui en fait un bon outil pour étudier la neurodégénérescence dopaminergiques médiée par l'inflammation (Lenhardt et al. 2003).

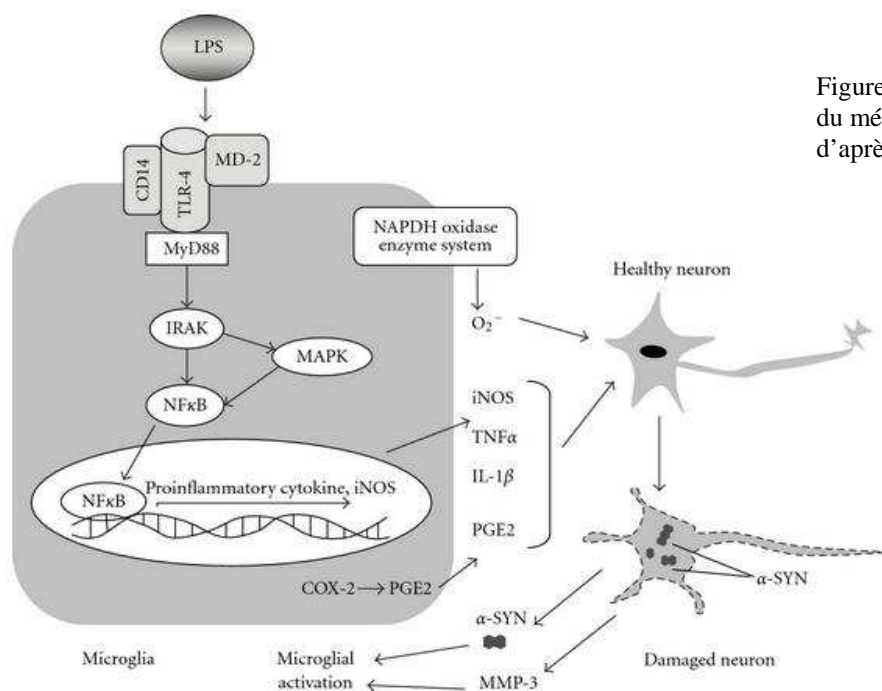


Figure 15 : Schéma hypothétique du mécanisme d'action du LPS, d'après Dutta et al. 2008

2. Les différents modèles animaux utilisant le LPS

Plusieurs modèles de rongeurs sont aujourd'hui utilisés. Ils diffèrent par le protocole et le lieu d'injection du LPS selon la cinétique de dégénérescence voulue et le mécanisme physiopathologique exploré.

➤ Injection unique de LPS dans la SNc

Il s'agit de l'injection d'un bolus de faible quantité (μg) de LPS dans la région de la SNc conduisant à une perte marquée (50-85%) des neurones dopaminergiques de la SNc. Ce modèle a rendu possible la comparaison de la vulnérabilité relative aux dommages inflammatoires des neurones dopaminergiques par rapport aux neurones non-dopaminergiques dans la SNc et dans le striatum (Liu et al. 2000). L'injection unique de LPS dans la SNc induit une perte progressive, préférentielle et irréversible des neurones dopaminergiques de la SNc. Il a été montré que lors d'une injection unique unilatérale dans la SNc de 2 μg de LPS à des rats une diminution de la DA existait à la fois dans le striatum et la SNc ($\sim 50\%$) jusqu'à 21 jours après l'injection de LPS. Du point de vue cinétique, le LPS induit l'activation de la microglie, la régulation positive des cytokines pro-inflammatoires, et la génération de radicaux libres, de façon très rapide, en quelques heures (Arai et al. 2004). En revanche, la perte des neurones dopaminergiques est différée 1 semaine après injection de LPS.

➤ **Perfusion chronique de LPS dans la SNc**

Ce modèle de lésion chronique, moins intense que la lésion aiguë, a été créé afin d'étudier l'effet de la neuroinflammation chronique sur la neurodégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc. À cette fin, les quantités de l'ordre du nanogramme de LPS ont été lentement délivrées par une mini-pompe osmotique sur une période de deux semaines dans la SNc de rats (Gao et al. 2002). La perfusion chronique de LPS induit un degré croissant de l'activation microgliale dans la SNc. L'activation de la microglie débute 3 jours après la perfusion et 1 à 2 semaines après la microglie est pleinement activée et les cellules sont sous forme amiboïde. En revanche, la perte des neurones dopaminergiques de la SNc commence entre 2-4 semaines et devient significative à partir de 6 semaines après le début de perfusion de LPS (McCoy et al. 2006). Ces résultats suggèrent que la neuroinflammation chronique est capable d'induire une activation microgliale importante accompagnée par une dégénérescence tardive et progressive des neurones dopaminergiques de la SNc.

➤ **Injection systémique de LPS**

L'inflammation systémique est considérée comme un facteur d'activation des cellules immunitaires dans le cerveau et par conséquent contribue au processus neurodégénératif chronique dans la MP. Une étude chez la souris a permis d'observer une activation microgliale chronique et une neurodégénérescence progressive des neurones dopaminergiques nigro-striés après une injection intrapéritonéale de 5 mg / kg de LPS. Comme chez les autres modèles utilisant le LPS, la lésion se révèle spécifique des neurones dopaminergiques de la SNc. L'activation de la microglie a été détectée dans la SN et d'autres régions du cerveau à des stades précoces après l'administration de LPS, coïncidant avec des niveaux accrus de TNF- α et d'IL-1 β pendant toute la durée de l'étude (10 mois) (Perry 2004). Ces observations ont été retrouvées après l'administration systémique de LPS chez le rat (Qin et al. 2007).

➤ **Injection In utero de LPS**

Les infections vaginales ou cervicales par des toxines bactériennes y compris le LPS peuvent influencer sur le développement neuronal du fœtus (Ling et al. 2002). Pour tester les effets du LPS sur le développement embryonnaire du système dopaminergique, le LPS a été administré par injection *in utero* à des rats à 10 jours de gestation. Sur les ratons de 3 semaines il a été observé une réduction significative du nombre de neurones dopaminergiques dans la SNc (27%) et de la DA dans le striatum (29%) dans le groupe issu des mères exposées au LPS par rapport au groupe témoin. La spécificité de la lésion du LPS sur les neurones dopaminergiques nigro-striés a également été démontrée (Ling et al. 2004). En outre, l'exposition prénatale au LPS induit le développement en nombre moins important de neurones dopaminergiques normaux.

IV. MODÈLE D'INTOXICATION À LA ROTÉNONE

La roténone est un des membres les plus puissants de la famille des roténoïdes, composés cytotoxiques naturels extraits de plantes tropicales et très largement utilisés comme insecticide et pesticide dans l'agriculture et le jardinage.

1. Mécanisme d'action de la roténone

La roténone est hautement lipophile et traverse facilement la BHE. La roténone s'accumule dans la mitochondrie où elle inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire. Cette inhibition entraîne l'apparition d'un stress oxydatif provoquant l'oxydation des protéines cellulaires et entraîne un mécanisme d'apoptose (Norazit et al. 2010) (Figure 16). De plus, elle inhibe la formation des microtubules à partir de la tubuline ce qui pourrait être corrélé avec la perte des cellules dopaminergiques provoquée par la toxine puisqu'une accumulation de tubuline se révèle toxique pour la cellule. Il a été également mis en évidence que la roténone active la microglie induisant une neurodégénérescence (Sherer et al. 2003).

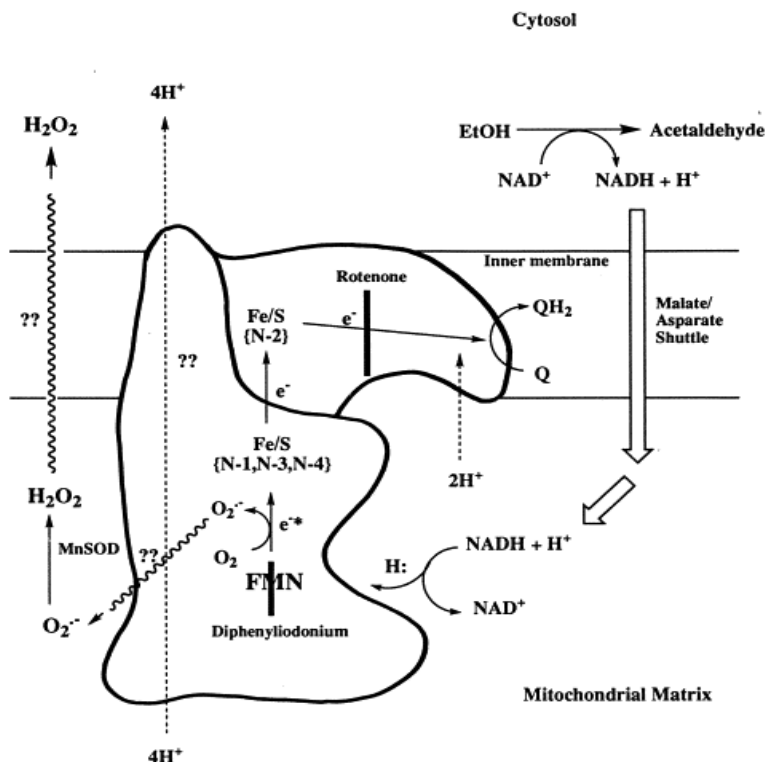


Figure 16 : Schéma d'inhibition du complexe I mitochondrial par la roténone, d'après Bailey et al. 1999

2. Les différents modèles animaux utilisant la roténone

La roténone induisant une inhibition du complexe I mitochondrial a été étudiée pour mettre au point un modèle animal de la MP (Greenamyre et al. 1999). Chez le rat, la roténone a été administrée selon différents protocoles. Le protocole le plus utilisé consiste en une injection intraveineuse ou sous-cutanée chronique de 2 à 3 mg/kg/jour pendant 3 semaines. Ce modèle a permis de mettre en évidence une perte spécifique des neurones dopaminergiques nigro-striés entraînant une dégénérescence qui débute dans les terminaisons nerveuses et se poursuit de façon rétrograde vers les corps cellulaires (Sherer et al. 2003). L'atteinte dégénérative semble mimer celle observée chez l'humain puisque les régions ventrolatérales du striatum sont atteintes préférentiellement. Dans ce modèle, une diminution de 55% de la densité des fibres dopaminergiques striatales ainsi qu'une perte de 30% des neurones dopaminergiques au niveau de la SNc a été mise en évidence. Récemment, un nouveau modèle de rat par injection stéréotaxique directement dans le MBF a été développé, ce modèle a montré une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques à travers la diminution graduelle dans le temps des corps cellulaires de la SNc et des fibres nerveuses dans le striatum (Norazit et al. 2010). Par ailleurs, il a été mis en évidence que l'intoxication à la roténone provoque l'apparition d'inclusions immunoréactives pour l'ubiquitine et l' α -synucleine comme le sont les corps de Lewy dans les neurones dopaminergiques de la SNc (Betarbet et al. 2000). De plus, les animaux développent des symptômes moteurs comme l'akinésie et la rigidité. Il apparaît donc que le modèle d'intoxication à la roténone reproduit les caractéristiques de la MP idiopathique humaine. Cependant, il a été rapporté que la lésion à la roténone n'est pas spécifique des neurones dopaminergiques et atteint en particulier les neurones sérotoninergiques du raphé, les neurones cholinergiques du noyau ponté et les neurones GABAergiques du striatum (Hoglinger et al. 2003). En conclusion, le modèle de lésion à la roténone se rapproche davantage d'un modèle de dégénérescence multi-systématisé telle que la PSP ou l'AMS. Ce modèle semble en outre peu reproductible (Lapointe et al. 2004).

V. MODÈLES TRANSGÉNIQUES SUR-EXPRIMANTS L'α-SYNUCLEINE

1. Mécanisme d'action de l'α-synucleine

L'α-synucleine est une phosphoprotéine de 14kDa, composant principal des corps de Lewy, marqueurs spécifiques de la MP. La mise en évidence de mutations ponctuelles de l'α-synucleine associées à de rares formes héréditaires de la MP a permis d'évoquer un rôle de cette protéine dans la physiopathologie de la maladie. Trois mutations ponctuelles ont été identifiées à ce jour: A53T, A30P et E46K (Lees et al. 2009). Il a été rapporté que la duplication ou la triplication du gène codant l'α-synucleine est suffisante pour provoquer la MP, ce qui suggère que le niveau d'expression de cette protéine est un facteur déterminant de la progression de la MP. L'α-synucleine, dans sa forme sauvage et mutée, est une toxine qui en s'accumulant peut entraîner la mort cellulaire et joue donc un rôle essentiel dans le mécanisme de neurodégénérescence (Figure 12). La toxicité induite par l'accumulation d'α-synucleine est caractérisée par un dysfonctionnement mitochondrial (inhibition du complexe I) et par un stress oxydatif (Banerjee et al. 2009). Il a également été rapporté que l'α-synucleine active la microglie. D'ailleurs la libération de l'α-synucleine des neurones endommagés potentialise la mort neuronale par l'activation microgliale (Block et Hong, 2005).

2. Principes d'obtention de modèles transgéniques

L'obtention de modèles transgéniques se fait par transfert du gène considéré dans les cellules cibles grâce à l'utilisation de vecteurs. Aujourd'hui, seuls les vecteurs de type viral sont capables de transférer du matériel génétique dans une large proportion. Les vecteurs viraux les plus utilisés sont les adénovirus (AAV), les lentivirus et les rétrovirus modifiés et inactivés. D'autres vecteurs non viraux peuvent être utilisés comme les prions (PrP) ou des plasmides comme l'antigène Thy-1 (Dawson et al. 2010). Le résultat phénotypique des modèles transgéniques dépend fortement du type de promoteur utilisé pour diriger le transfert du gène. Bien que la création de modèles transgéniques suscite un enthousiasme et un nouvel essor dans la recherche sur la MP, il est important de rappeler que seules environ 10% des MP sont dues à des causes génétiques.

3. Les différents modèles animaux transgéniques surexprimant l' α -synucléine

Trois modèles animaux transgéniques ont été développés, chez la drosophile, chez la souris, et chez le rat (Tableau I). Le degré des effets neurodégénératifs est fonction du type du virus utilisé, du sérotype du vecteur utilisé et de sa concentration (Dawson et al. 2010).

Model	Neuronal Loss Dopamine (DA) Non-Dopamine (Non-DA)	L-DOPA-Responsive Motor Deficits	Mitochondrial Dysfunction	Lewy Body - like Inclusions	Suitability for Testing Disease Modifying Therapy
α -synuclein					
<i>Drosophila</i> (WT, A30P, A53T)	DA+ Non-DA-	+	ND	+	+
Mouse Thy1 (WT, A30P, A53T)	DA- Non-DA+	ND	ND	- (nonfibrillar α -synuclein inclusions)	+ (A30P, A53T)
Mouse PrP (WT, A30P, A53T)	DA- Non-DA+	ND	+	+	+ (A53T)
Rat AAV (WT, A53T)	DA+ Non-DA-	+	ND	- (nonfibrillar α -synuclein inclusions)	+ (A53T)

Tableau I : Tableau récapitulatif des modèles transgéniques α -synucléine actuels et de leurs caractéristiques phénotypiques. D'après Dawson et al. 2010

Chez la drosophile, la surexpression de l' α -synucléine humaine sauvage ou mutée dans les neurones engendre l'apparition d'inclusions intracytoplasmiques semblables aux corps de Lewy. Au cours du vieillissement de la drosophile, c'est-à-dire après 30 jours de vie, certaines sous-populations de neurones dopaminergiques du cerveau disparaissent. Des troubles locomoteurs s'ajoutent à cette dégénérescence neuronale. L'ensemble de ces effets récapitule les symptômes caractéristiques et l'aspect progressif de la MP. La force du modèle drosophile, c'est qu'il est le seul qui présente une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques. Cependant, la drosophile n'a pas la complexité des vertébrés et n'exprime pas naturellement l' α -synucléine ce qui en fait un modèle imparfait de la MP. En outre, ces modèles ne parviennent pas à présenter les caractéristiques cliniques de la MP (bradykinésie, tremblement de repos, rigidité) et donc leur valeur réside principalement dans l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques modifiant la neurodégénérescence induite par l' α -synucléine (Dawson et al. 2010).

Chez la souris et le rat, l'expression ciblée de l' α -synucléine humaine dans tous les neurones induit l'apparition d'inclusions riches en α -synucléine dans le cerveau des animaux mutants. Le modèle de souris (PrP) A53T est le seul à présenter la gamme complète des mécanismes physiopathologiques qui est observée chez l'homme, y compris l'agrégation d' α -synucléine en fibrilles, la phosphorylation et l'ubiquitination de l' α -synucléine, une progression de la

neurodégénérescence dépendante de l'âge. Les autres modèles transgéniques présentent des stades d'agrégation de l' α -synucléine différents qui n'ont pas les caractéristiques des fibrilles qui sont présentes dans la MP. Certaines études ont observé chez les souris surexprimant la mutation A53T un dysfonctionnement de la neurotransmission et une altération de la plasticité synaptique qui reflètent les premiers changements au sein des ganglions de la base avant même la neurodégénérescence (Kurz et al. 2010). Ce modèle est donc particulièrement intéressant car il reflète un stade préclinique de la MP. Cependant, à ce jour, les modèles transgéniques ont été variables dans leur phénotype, difficiles à reproduire, ce qui entrave leur utilisation comme un modèle pour tester de nouvelles thérapies. Pour y remédier le vecteur AAV1/2 a été utilisé pour créer un modèle transgénique A53T- α -syn de rat. Ce vecteur peut être préparé à titre élevé, possède une bonne capacité reproductible de transfert des gènes avec une dynamique d'expression optimisée pour fournir une expression rapide du gène transféré. Ce modèle a montré la formation des agrégats d' α -synucléine dans les neurones dopaminergiques de la SN avec une réduction du nombre de neurones et du niveau de la TH dans le striatum d'environ 50% (Koprach et al. 2010). Par ailleurs, les différentes tentatives visant à générer des modèles transgéniques d' α -synucléine de souris avec une perte progressive des neurones dopaminergiques n'ont pas été fructueuses (Ramsey et al, 2010). Les neurones dopaminergiques de souris pourraient être particulièrement résistants à la surexpression de l' α -synucléine ou qu'il soit nécessaire que cette surexpression ait lieu dans les neurones et dans les cellules gliales pour induire la neurodégénérescence dopaminergiques, (Chesselet et al. 2008). Seul le vecteur adénovirus associé (AAV) a montré l'expression de l' α -synucléine dans les neurones et les cellules gliales. Certains arguments sont en faveur de l'existence de mécanismes compensatoires qui empêchent la perte des neurones dopaminergiques chez la souris comme ceux existant chez l'homme (Palop et al. 2006).

Les modèles transgéniques offrent des avantages par rapport aux modèles actuels standards pour évaluer l'efficacité de nouveaux traitements qui pourraient prévenir / inverser l'agrégation de l' α -synucléine (Koprach et al. 2010). Les stratégies thérapeutiques visant à maintenir ou à convertir l' α -synucléine dans son état monomère semblent avoir un réel intérêt. L'utilisation des modèles transgéniques sur-exprimant les agrégats fibrillaires d' α -synucléine pourrait donc être un outil intéressant pour tester l'efficacité de ces stratégies portées sur la conversion ou le maintien de la protéine dans son état monomère (Dawson et al. 2010).

CHAPITRE III : NEUROINFLAMMATION ET MALADIE DE PARKINSON

I. LA NEUROINFLAMMATION

A. Physiopathologie

La neuroinflammation est l'inflammation d'un nerf ou de toute une partie du système nerveux. Elle implique deux types de cellules immunitaires: les lymphocytes, monocytes et macrophages, du système hématopoïétique et les cellules microgliales du système nerveux central (SNC). La neuroinflammation perturbe la BHE, ce qui permet aux cellules du système hématopoïétique de quitter la circulation sanguine et d'entrer en contact avec le site de l'agression. Les cellules immunitaires répondent à des agressions en synthétisant et libérant une multitude de substances, comme les compléments, les cytokines et chimiokines, du glutamate, les interleukines, l'oxyde nitrique, les espèces réactives de l'oxygène. Ces substances ont des effets à la fois bénéfiques et néfastes sur l'environnement cellulaire. Cependant, le rôle délétère ou protecteur de la neuroinflammation, via la sécrétion de molécules pro- et anti-inflammatoires, est encore actuellement en discussion (Masliah et al. 2005 ; Streit et Xhu 2009). Bien que la neuroinflammation soit essentielle pour le fonctionnement normal et la protection du SNC, il est maintenant admis que ce processus peut dans certaines pathologies échapper à tout contrôle avec une forte activation des cellules microgliales, une production renforcée de cytokines pro-inflammatoires, ainsi que la libération accrue de molécules destructrices telles que les espèces réactives de l'oxygène produisant des radicaux libres. Nous pouvons distinguer la neuroinflammation aiguë et chronique (Streit et al. 2004).

1. Neuroinflammation aiguë

La neuroinflammation aiguë comprend la réponse immédiate et précoce à un agent nuisible ou à une agression et est essentiellement une réaction de défense pour la réparation du site endommagé. L'activation gliale aiguë correspond à la libération par les cellules gliales de facteurs qui vont agir sur des cellules cibles de la même façon que la réponse cellulaire immune périphérique. A la périphérie, l'activation cellulaire d'origine immune aboutit normalement à l'infiltration leucocytaire dans les tissus agressés. Au niveau cérébral cette infiltration est absente, sauf si la BHE est lésée ou détruite. En l'absence de rupture de la BHE, il existe une

réaction du système immunitaire cérébral intrinsèque et en particulier une activation des cellules microgliales (Kreutzberg 1996 ; Heneka et al. 2010). La neuroinflammation aiguë est directement mise en cause dans l'aggravation des lésions cérébrales aiguës secondaires à une infection d'origine systémique périphérique, comme par exemple l'encéphalopathie associée au sepsis (EAS) ou l'encéphalomyélite aiguë disséminée (ADEM) (Degos et al. 2008). Elle est également directement liée à l'aggravation de lésion aiguë du cerveau comme lors d'accident vasculaire cérébral (AVC) (Ginsberg 2008). En effet, le cerveau est en communication constante avec la périphérie. Les mécanismes par l'intermédiaire desquels l'inflammation aiguë périphérique est délétère sur le cerveau lésé restent incomplètement décrits. Cependant, il a été retrouvé, sur plusieurs cohortes de malades lésés au niveau cérébral, une relation négative entre l'inflammation périphérique et le pronostic neurologique, les conséquences étant plus sévères et irréversibles (Degos et al. 2008). Il existe également une association statistique entre le pronostic des malades présentant un AVC et la concentration sérique en médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-6, les cytokines, les chemokines et les radicaux libres.

2. Neuroinflammation chronique

La neuroinflammation chronique est le résultat de stimuli qui sont répétés et persistants, C'est un concept plus adapté dans le contexte de la compréhension des pathologies cérébrales, en effet le terme pathologie cérébrale est lié au terme de chronicité.

Il est maintenant bien documenté que la neuroinflammation chronique est activement impliquée dans des maladies et troubles neurologiques, comme la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, l'épilepsie, la maladie de Huntington, la sclérose en plaques et la MP. Il est proposé que la neuroinflammation chronique soit un facteur causal dans la pathogenèse de ces maladies et des troubles neurologiques (Whitton, 2007). Les cellules immunitaires et les substances pro-inflammatoires impliquées dans la neuroinflammation sont liées aux mécanismes pathologiques des maladies neurodégénératives. Des cycles soutenus d'agressions et de réponses inflammatoires et les effets cumulatifs néfastes de l'activation microgliale et astrocytaire contribuent à élargir les premiers effets neuro-destructifs et ainsi le maintien et l'aggravation du processus de la pathologie. La sclérose en plaques est un exemple sans équivoque et reconnu depuis longtemps d'une maladie cérébrale neuroinflammatoire chronique. Même si la cause sous-jacente n'est pas connue, il est permis de penser que la persistance de l'agression à minima due à la présence d'une protéine liée à la myéline immunogène, conduit à la neuroinflammation (D'Aversa et al. 2012). Malgré les grandes

variabilités des processus physiopathologiques impliqués dans toutes ces altérations neuronales, elles ont en commun un phénomène neuroinflammatoire localisé aux aires cérébrales atteintes, la SNc et le striatum concernant la MP (Gerhard et al. 2006). Du point de vue cellulaire, il n'y a pas d'infiltration leucocytaire, mais la neuroinflammation chronique est caractérisée par la mobilisation des cellules mononucléaires (macrophages, lymphocytes) et par l'activation microgliale (Eikelenboom et al. 2002).

B. La Microglie

La microglie est formée par des cellules microgliales qui constituent environ 20% de la population cellulaire gliale cérébrale totale. Immunocompétentes, elles sont assimilées à des macrophages résidant dans le cerveau et la moelle épinière (Ajami et al. 2007). A ce titre, ce sont des cellules présentatrices d'antigènes étrangers, qui utilisent les mécanismes phagocytaires et cytotoxiques pour détruire les matières étrangères ou les débris cellulaires. Le cerveau et la moelle épinière sont considérés comme des organes immunitaires particuliers car ils sont séparés du reste du corps par la BHE, ce qui empêche la plupart des infections ainsi que les anticorps d'atteindre le tissu nerveux. Dans le cas où les agents infectieux sont introduits directement dans le cerveau ou traversent une BHE endommagée, les cellules microgliales doivent être capable de reconnaître rapidement les corps étrangers, les phagocyter, et agir en tant que cellules présentatrices d'antigène aux lymphocytes T pour diminuer l'inflammation et détruire les agents infectieux (Dissing-Olesen et al. 2007). La microglie constitue donc la première ligne de défense du système immunitaire du SNC.

Vers 1920 Del Rio Hortega identifie le rôle de ces cellules dans le SNC et propose la dénomination de « microglie », et en 1927, il caractérise la réponse microgliale suite à des lésions cérébrales. Les cellules microgliales présentent une grande variété de changements structurels selon leur emplacement et leur rôle. Dans le cerveau adulte, elles se retrouvent essentiellement sous deux formes : ramifiée et amiboïde. Les études d'imagerie *in-vivo* par microscopie photonique ont permis de montrer des cellules microgliales dans leur état ramifié, et d'illustrer la capacité de ces cellules à s'activer rapidement et réorganiser leur structure (Davalos et al. 2005). La majorité des cellules microgliales sont dans un état de « repos » avec une morphologie caractéristique ramifiée (Kreutzberg 1996) (Figure 17).

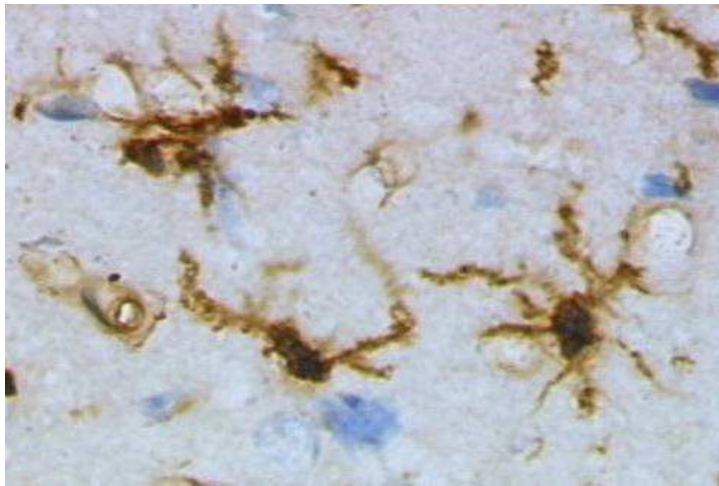


Figure 17 : Cellules microgliales sous forme rémifiée, source : site www.futura-santé.com, consultation le 30 avril 2012

Cette forme est communément retrouvée dans l'ensemble du cerveau et la moelle épinière en l'absence de corps étrangers ou de débris cellulaires. Elle est composée d'un petit corps cellulaire avec de longues branches. Les cellules de « repos » ne sont pas statiques. Si le corps de la cellule ramifiée reste immobile, les branches sont constamment en mouvement et surveillent les zones environnantes car elles sont très sensibles aux changements dans leur microenvironnement (Davalos et al. 2005). La forme ramifiée est incapable de phagocytter et expose peu ou pas de molécules de l'immunité ou de récepteurs de surface requis pour agir comme cellule présentatrice d'antigène aux lymphocytes, (Chung et al. 2010). Le but de cet état est de maintenir un taux constant de cellules microgliales disponibles pour détecter et combattre l'agression, tout en maintenant un environnement immunologique quiescent.

Les cellules microgliales peuvent également avoir la forme amiboïde qui se trouve principalement dans les zones périnatales de la substance blanche des corps calleux (Del Rio-Hortega 1937). Cette forme permet le mouvement microgliale dans tout le tissu neural. Les cellules amiboïdes sont capables de phagocytter les débris cellulaires, mais ne remplissent pas leur rôle de cellules présentatrices d'antigène et ne participent pas au processus inflammatoire comme les microglies activées. Les cellules amiboïdes sont particulièrement répandues au cours du développement neuronal et du « câblage » du cerveau, quand il y a de grandes quantités de débris cellulaires à supprimer.

C. L'activation microgliale

En réponse à toute agression neuronale, les cellules de la microglie vont s'activer (Heneka et al. 2010). Dans la neuroinflammation chronique, la microglie est activée de façon prolongée et produit de façon soutenue une grande diversité de molécules pro-inflammatoires,

immunomodulatrices et neurotoxiques qui affectent la viabilité et les fonctions neuronales (Willenborg 2003). Ces médiateurs potentialisent à leur tour l'activation microgliale en se liant à leurs récepteurs exprimés par la microglie (Kim et Vellis, 2005). Il s'agit :

- d'espèces réactives oxygénées et azotées ROS / RNS qui peuvent tuer les agents pathogènes environnants et participent également à la mort cellulaires neuronales;
- de cytokines comme les interleukines (IL-1 et IL-6) et le TNF- α . Les cytokines pro-inflammatoires ont une capacité pour induire une réponse immunitaire soutenue ;
- de chimiokines comme la protéine chimioattractive monocytaire (MCP-1) et les protéines inflammatoires des macrophages (MIP-1) qui ont un rôle dans le recrutement de cellules microgliales supplémentaires par le site endommagé en stimulant leur migration directionnelle.

De façon contradictoire, d'autres études suggèrent un rôle protecteur de la microglie à travers la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (Masliah et al. 2005). Les facteurs neurotrophiques, tels que le facteur de croissance des neurones, libérés par la microglie ont été proposés pour participer à la survie et la régénération des neurones (Batchelor et al. 2002). L'hypothèse dominante est que la microglie existerait sous différents états d'activation, en fonction de son environnement cellulaire, certains états favorisant la sécrétion de molécules neurotoxiques, et d'autres ayant un rôle protecteur de phagocytose.

Une fois activée par des changements dans le microenvironnement extracellulaire du cerveau lésé ou malade, la microglie subit des changements morphologiques et phénotypiques. Un épaissement du corps cellulaire et une rétraction des branches font passer les cellules de la forme de repos ramifiée vers une forme amiboïde activée (Figure 18).

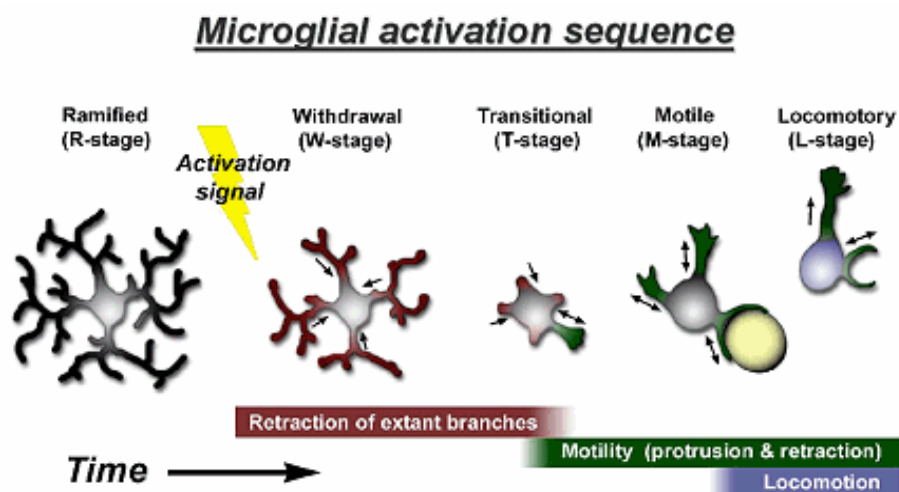


Figure 18 : Activation des cellules microgliales se traduisant par des modifications morphologiques permettant aux cellules de migrer par mouvement amiboïde vers la zone cérébrale atteinte, d'après Stence et al. 2001

Cette forme activée facilite la migration vers le site de la lésion, la phagocytose des toxines et des débris cellulaires, déclenche une réponse immunitaire et sécrète des facteurs pro-

inflammatoires afin de promouvoir sa prolifération sur le site inflammatoire (Davalos et al. 2005). Les cellules amiboïdes activées agissent comme des cellules présentatrices d'antigènes, elles sont capables de phagocyter les pathogènes et d'afficher les immuno-molécules qui en résultent aux lymphocytes T pour générer une réponse adaptative immunitaire. La présence de l'antigène CMH classes I / II exprimés par la microglie activée corrobore cette théorie. Elles participent également activement aux processus cytotoxiques et inflammatoires par la sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires. La microglie activée interagit également avec les astrocytes pour combattre l'infection le plus rapidement possible avec un minimum de dommages aux cellules du cerveau environnantes. Par conséquent les cellules endommagées sont englouties par phagocytose et les cellules voisines protégées (Garden et Moller, 2006).

Une activation modérée a en apparence des effets bénéfiques sur les cellules environnantes, mais quand la microglie est continuellement activée de façon soutenue, des effets néfastes inappropriés, comme la mort des cellules viables alentour, en particulier des neurones, en découlent. L'exposition chronique à des signaux pro-inflammatoires lors d'infections systémiques qui se produisent tout au long de la vie, favorise une réponse exagérée microgliale et contribue à la détérioration neuronale (Perry et al. 2007). En raison de l'implication de l'inflammation à travers l'activation microgliale chronique dans la MP (McGeer et al. 1988a), et d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (McGeer et al. 1988b), il est admis que le cercle vicieux de l'inflammation peut se produire, quel que soit le facteur d'activation initial. En effet, la microglie activée, soit de façon directe par l'intermédiaire d'une toxine, une protéine pathogène ou endogène, ou indirecte via des signaux des neurones endommagés peut persister en raison d'un feed-back positif à partir des neurones endommagés, même si l'agression initiale a cessé. Des travaux ont d'ailleurs montré que les neurones endommagés nécrotiques peuvent activer la microglie (Pais et al. 2008). L'activation microgliale peut, grâce à la neuroinflammation, se propager et se prolonger pour amplifier la destruction des neurones, ceci est une caractéristique commune des maladies neurodégénératives (Gao et Hong 2008). Par ailleurs, il a été constaté que la présence de neurones sains diminue la réponse microgliale ce qui sous-tend l'idée qu'ils ont un effet inhibiteur sur l'activation microgliale (Pabon et al. 2011).

L'existence d'une relation entre la dégénérescence neuronale et l'activation microgliale due à la neuroinflammation paraît donc une évidence. Quels sont les facteurs de risque et les mécanismes biologiques et biochimiques spécifiques qui lient ces deux phénomènes physiopathologiques en particulier dans la MP ?

II. LA NEUROINFLAMMATION DANS LA MALADIE DE PARKINSON

En 1988, McGeer et son équipe trouvent la présence d'une activation microgliale et de lymphocytes T dans la SNc d'un patient atteint de la MP en *post-mortem* (McGeer et al. 1988a). Depuis, l'existence de processus inflammatoires qui peuvent contribuer à la progression de la MP est étayée par la présence de microglies activées, l'accumulation de cytokines et les dommages oxydatifs aux protéines, dans les modèles animaux de MP ainsi que dans le LCR et le cerveau *post-mortem* et *in-vivo* de personnes atteintes de la MP (Hirsch et Hunot, 2009).

A. Facteurs de risque

L'idée de facteurs de risque dans l'implication de la neuroinflammation dans la MP provient de trois types d'études : biologiques, génétiques et épidémiologiques.

Dans les études biologiques, il a été trouvé que les hommes avec un taux plasmatique important d'interleukine IL-6 avaient un risque plus élevé de développer la MP (Chen et al. 2008).

De nombreuses études génétiques ont analysé la relation entre certains polymorphismes de molécules pro-inflammatoires ou liés à la neuroinflammation et le risque de développer la MP (Hirsch et Hunot 2009). Il a été trouvé une relation entre certaines expressions génétiques et le risque de MP, comme par exemple plusieurs polymorphismes du TNF- α , des interleukines IL1- β et IL1- α (Wahner et al. 2007), et des modifications alléliques de l'interferon- γ et du récepteur CD14 monocyttaire (Lin et al. 2006). Ces polymorphismes peuvent affecter le niveau basal de réponse inflammatoire des patients et leur réponse à des stimuli, ils augmentent ou diminuent également les effets inflammatoires sur la mort neuronale. De même, la mutation de certains gènes jouant un rôle dans l'activation microgliale, comme le gène Nurr1, répresseur transcriptionnel de gènes qui codent pour les facteurs pro-inflammatoires (Maguire-Zeiss, 2010), qui diminue l'expression de Nurr1 sont associés à la survenue de MP familiale.

Certaines études épidémiologiques montrent un lien entre infection systémique et neurodégénérescence (Tansey et Goldberg, 2010). Les maladies neurodégénératives ont tendance à être aggravées par des infections systémiques, cependant il n'est pas encore évident

de dire si les patients parkinsoniens souffrent d'une aggravation des symptômes après avoir subi une infection systémique. Deux grandes observations ont permis de suggérer que l'infection peut augmenter le risque de développer la MP. La première est le développement de la MP chez des patients ayant subi une encéphalite (Dale et al. 2004). La seconde est le lien entre certaines infections gastrointestinales comme la Maladie de Crohn (Barrett et al. 2008), les ulcérations avec la présence d'*Helicobacter-pylori* et la survenue de la MP. D'autres études épidémiologiques montrent que le risque de survenue de la MP est moins important chez les personnes ayant pris régulièrement au long cours des médicaments anti-inflammatoires, tels que l'aspirine (AINS) et l'ibuprofène (Chen et al. 2005) confirmant le rôle de la neuroinflammation dans le développement de la MP.

B. Perméabilité de la Barrière Hemato Encéphalique

Plusieurs études ont montré le rôle de la perméabilité de la BHE dans l'étiologie et la progression de la MP (Chung et al. 2010). Étant donné que le principal facteur de risque dans la MP idiopathique est l'âge, il est envisagé que l'augmentation de charge inflammatoire dans le SNC qui augmente avec l'âge pourrait augmenter la perméabilité de la BHE à des toxines périphériques et aux cellules immunitaires, augmentant ainsi la vulnérabilité de la voie nigrostriatale à la dégénérescence. Cependant, l'idée la plus répandue est que la perturbation de la BHE associée à l'inflammation se produit uniquement après la dégénérescence d'un nombre important de neurones dopaminergiques nigrostriés, et dans ce cas elle est susceptible de contribuer à la progression de la MP plutôt que d'être un facteur causal majeur (Lee et al. 2009).

C. Activation microgliale

Plusieurs observations et travaux ont mis en évidence un lien entre l'activation microgliale et la dégénérescence neuronale dans la MP. Un nombre particulièrement élevé de microglies activées a été observé dans les cerveaux de patients atteints de la MP en *post-mortem*, principalement au niveau de la SNc dans le voisinage des neurones dopaminergiques dégénérésents (Sawada et al 2006). Ces observations ne permettent pourtant pas de dire si l'activation microgliale est une conséquence de la perte neuronale importante, ou à un stade antérieur une cause de la progression de la maladie. Par ailleurs, plusieurs études sur des

modèles animaux de MP ont montré l'induction d'une activation de la microglie en lien avec une neurodégénérescence dopaminergique (Hirsch et Hunot 2009).

Bien que les niveaux accrus de microglies activées ont été également trouvés dans le SNC de la population âgée en général, il est probable que les neurones nigro-striés qui subissent un stress ou sont endommagés exacerbent l'activation de la microglie et les incitent à libérer des facteurs neurotoxiques (Gao et Hong 2008). Les substances qui sont produites par les neurones dopaminergiques dégénérésents et qui peuvent activer ou réactiver la microglie comprennent par exemple les agrégats d' α -synucléine, l'ATP, le MMP-3 et la neuromelanine. La SNC contient une forte concentration de cellules microgliales, les neurones dopaminergiques de la SNC sont donc particulièrement sensibles et vulnérables au stress oxydatif et à l'excès de ROS produits consécutifs à l'activation microgliale (Long-Smith et al. 2009). Les taux de base de la peroxydation lipidique sont d'ailleurs augmentés dans le SNC de patients parkinsoniens (Whitton, 2007). Il a été postulé qu'au cours de la MP, les débris cellulaires stimulent la réaction microgliale qui augmente elle-même la neurodégénérescence, ce processus peut vite devenir un cercle vicieux qui aboutit à une sur-production de cytokines et médiateurs pro-inflammatoires, ainsi que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Whitton, 2007). Il a également été postulé que ce cercle vicieux de l'inflammation peut exacerber les effets de la perte de neurones dopaminergiques dans la MP, indépendamment du fait que l'inflammation soit une cause ou une conséquence de la maladie (Block et Hong, 2007) (Figure 19).

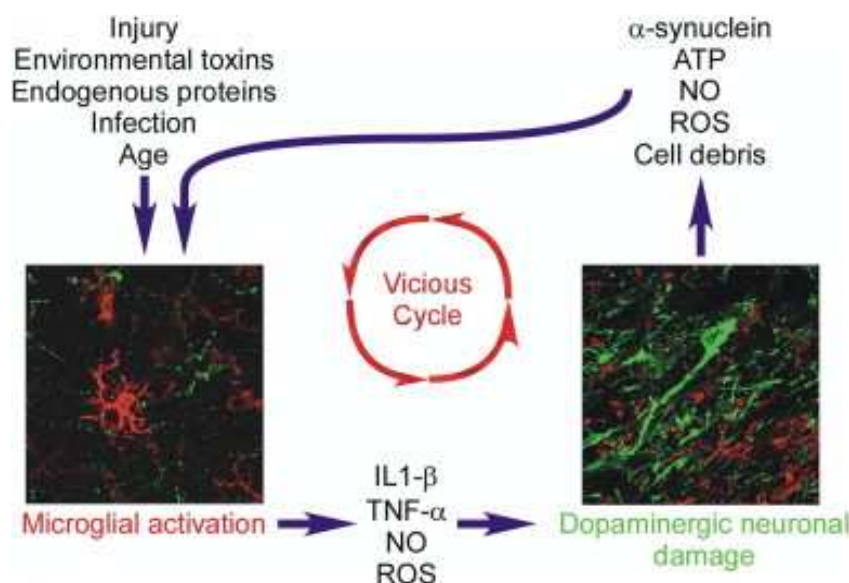


Figure 19 : Cercle vicieux entre activation microgliale et neurodégénérescence dopaminergique, d'après Collins et al. 2012

Les résultats de travaux récents soutiennent l'idée que la microglie activée contribue au processus de la maladie à un stade précoce et joue un rôle important dans sa progression. Ceci suggère que les changements dans l'activation de la microglie au niveau de la voie nigro-striée sont susceptibles de se produire au début de la maladie et/ou en parallèle avec la perte des

terminaisons dopaminergiques. Des données récentes indiquent que lors du vieillissement, la charge microgliale est importante et reste dans un état « amorcé », ce qui peut entraîner des réponses exagérées neuroinflammatoires dans les cerveaux âgés, comparativement aux cerveaux jeunes (Henry et al, 2009). Pour appuyer cette idée de microglie « amorcée », des travaux montrent que quel que soit le nombre d'années de présence de la maladie, les patients avec une MP idiopathique présentent une neuroinflammation sensiblement plus élevée au niveau des noyaux gris centraux et le striatum par rapport à des témoins sains appariés (Gerhard et al. 2006). Ces travaux suggèrent que la microglie est activée au début de la MP et reste amorcée, lui laissant la possibilité de réagir fortement ou de façon aberrante à un stimulus ultérieur, augmentant ainsi l'inflammation induite par le stress oxydatif sur les populations de neurones vulnérables.

D. Stress oxydatif

Une caractéristique importante de l'hypothèse du rôle du stress oxydatif dans la physiopathologie de la MP est qu'un facteur d'initiation transitoire (toxines, infections bactériennes ou virales, particules, pesticides, etc) peut déclencher un cycle auto-entretenu de la neuroinflammation chronique à travers l'augmentation de la production des chimiokines, des cytokines, des radicaux libres ROS / RNS et des molécules d'adhésion, par les microglies activées (Banati et al, 1998). Tous les tissus peuvent être endommagés à la suite d'un stress oxydatif, mais le cerveau semble être particulièrement sensible, sans doute en raison de ses besoins importants en oxygène (Halliwell, 2006). Bien que les différences régionales sont évidentes, le fait que la SNc semble être très sensible au stress oxydatif, est probablement dû, au moins en partie, à sa grande population de neurones dopaminergiques, qui produisent d'abondantes quantités de ROS. Dans des conditions pathologiques comme dans la MP, la microglie activée est capable de produire et de re-larguer dans son environnement un grand nombre de dérivés oxygénés et azotés toxiques (ROS et RNS). Elle induit différents systèmes enzymatiques comme la NADPH oxidase, la nitric oxyde synthetase (iNOS) et les myeloperoxydases (MPO) qui jouent respectivement sur la production de quantité toxique d'ion superoxyde (O_2^-), de radicaux libres comme le NO et d'acide hypochloreux (HOCl). Cette cascade oxydative est surexprimée dans la SNc de cerveaux de patients parkinsoniens (Hunot et al. 1996). Les ions O_2^- et radicaux libres NO peuvent réagir à leur tour pour générer du peroxynitrite ($ONOO^-$) très réactif et qui cause des dommages oxydatifs sur plusieurs protéines comme la TH et l' α -synucleine. Les ions O_2^- peuvent aussi se dismuter en H_2O_2 qui produit

des radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton en présence de Fe^{2+} . Les radicaux NO_2^- non réactifs dont la concentration augmente dans les cerveaux de parkinsoniens peuvent être oxydés par les MPO en radicaux NO_2^- activés et vont contribuer à la nitrosylation des protéines. Sur la base de ces observations, Hirsch et Hunot ont proposé un schéma du mécanisme des dommages causés par le stress oxydatif sur les neurones dopaminergiques (Figure 20). Par ailleurs, certaines données indiquent aussi que le stress oxydatif associé au métabolisme de la DA contribue à une réaction inflammatoire accrue au niveau nigro-strié. Le stress oxydatif dans la MP est associé *in fine* à l'oxydation accrue des lipides, de l'ADN et des protéines qui conduit à l'apoptose cellulaire à travers l'activation de caspases (Friedlander, 2003).

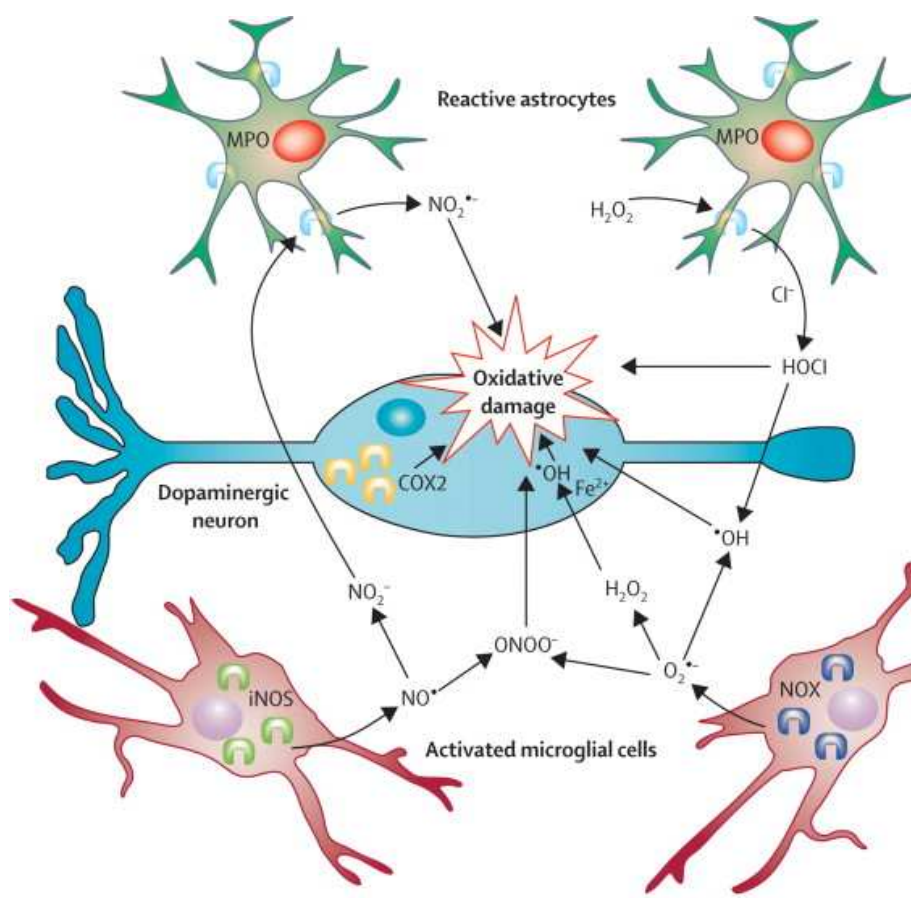


Figure 20 : Lien entre le stress oxydatif, la neuroinflammation et la neurodégénérescence dopaminergique dans la MP. Les cellules microgliales activées sur-expriment la iNOS et la NADPH oxydase induisant la production de grande quantité de ROS et RNS (H_2O_2 , NO) conduisant à un stress oxydatif des neurones dopaminergiques. Les cellules astrocytaires activées sur-expriment la myeloperoxydase (MPO) induisant la production de HOCl et de radicaux NO_2^- qui contribuent également au stress oxydatif. D'après Hirsch et Hunot, 2009

E. Alpha-synucléine

Une hypothèse concernant le rôle de l'inflammation dans la MP idiopathique est que les réponses d'activation des microglies sont modulées par l'agrégation de protéines anormales résultant de mutations : les α -synucléines (Maguire-Zeiss, 2010). Une étude récente avec des modèles transgéniques de souris suggère que le résultat des réponses neuroinflammatoires dans la SNc peut être influencé par la présence anormale (augmentée ou mutée) d' α -synucléine. En effet, une seule injection de LPS dans la SNc chez les souris qui surexpriment la forme sauvage (SYN) ou mutée (mutation A53T) de l' α -synucléine induit une surexpression de la neuroinflammation s'accompagnant de la perte de neurones dopaminergiques, associée avec la détection d'inclusions nigrales d' α -synucléine par rapport aux souris n'exprimant pas l' α -synucléine (SYN-null) (Gao et al. 2008). Il a également été démontré dans des modèles transgéniques α -synucléine de souris que l'inhibition de la production de radicaux libres (NO et superoxyde) par la microglie activée entraîne une neuroprotection significative contre les effets du LPS, suggérant que ces médiateurs font le lien entre neuroinflammation et la protéine aberrante α -synucléine qui contribue à la neurodégénérescence dopaminergiques (Lee et al. 2009). D'autres études ont montré que la surexpression de type sauvage de l' α -synucléine dans les neurones est associée à une activation de la microglie précoce, et la libération d' α -synucléine à partir des neurones dopaminergiques déclenche une cascade de médiateurs inflammatoires comprenant le TNF- α , IL-1 β , IL-6, la COX-2, et iNOS (Su et al. 2008). De plus, les formes mutées d' α -synucléine, et en particulier, l'A30P, E46K, et A53T, liées à la forme familiale de la MP ont montré *in-vitro* un rôle dans l'activation de la microglie associée à la sécrétion importante de cytokines comme IL-1 β et TNF (Lees et al. 2009).

L' α -synucléine peut également avoir un rôle important dans la régulation de l'état d'activation de la microglie. Plus précisément, chez les souris n'exprimant pas le gène codant pour l' α -synucléine (SCNA^{-/-}), les microglies ont affiché soit un phénotype faiblement réactif dans la production de cytokines pro-inflammatoires comme IL-6 et TNF- α soit un phénotype hyper-réactif mais avec une faible faculté à phagocyter, par rapport à la microglie de souris de type sauvage (Austin et al. 2006). L'ensemble de ces données suggère que l' α -synucléine, qui a une importance spécifique dans les neurones dopaminergiques, est impliquée dans la modulation de la réponse microgliale. Les protéines agrégées d' α -synucléine sont donc des facteurs de la dégénérescence neuronale dans la MP, à travers l'activation de la microglie et la stimulation de la production de composés neurotoxiques (Floden et al. 2005).

F. Médiateurs pro-inflammatoires

La microglie activée au niveau du striatum et de la SNc de cerveaux de patients atteints de la MP en *post-mortem* exprime des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF- α , la β 2-microglobuline, la TGF- α , l'interferon- γ et les interleukines IL-1 β , IL-6, IL-2 (Hirsch et Hunot 2009). En outre, une expression accrue en IL-1, IL-6 et TNF- α a également été trouvée dans le LCR chez des patients parkinsoniens (Blum-Degen et al. 1995). Ces médiateurs agissent tous sur la modulation du processus inflammatoire et sur la perméabilité de la BHE (Whitton 2007). Par ailleurs, les neurones dopaminergiques expriment les récepteurs de ces cytokines et cette expression est augmentée chez les patients atteints de la MP.

Les cytokines peuvent exercer des effets délétères sur les neurones de façon directe en se liant à leurs récepteurs et en activant des voies de messagerie apoptotique secondaires. Parmi ces cytokines, le TNF- α pourrait avoir un effet direct négatif sur les neurones dopaminergiques par l'activation d'une voie de mort cellulaire couplée avec son récepteur (TNF-R1) exprimé à la surface des neurones dopaminergiques. Les voies secondaires induites par l'activation du TNF-R1 sont liées à l'augmentation de l'expression de la COX2 dans les neurones dopaminergiques. La COX2 est une enzyme clé qui cause la production de prostaglandines durant l'inflammation. Elle est très abondante dans les neurones, c'est un médiateur important impliqué dans la neurodégénérescence dopaminergique dans la MP (Hunot et al. 2004). La toxicité de la COX2 dérive d'un mécanisme de dommage oxydatif à travers la formation de ROS lors de la peroxydation de la prostaglandine G2 ou H2.

Les cytokines peuvent également avoir des effets indirects. Les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'interleukin-1 β et l'interferon- γ stimulent l'expression de iNOS dans les cellules microgliales à travers l'expression et l'activation du récepteur de faible affinité des immunoglobulines (CD23) (Hirsch et Hunot 2009). Ce processus pourrait conduire à la production de quantités toxiques de radicaux libres (NO) via le mécanisme de stress oxydatif. À leur tour, ces radicaux libres potentialisent l'expression et la libération de TNF- α par les cellules microgliales adjacentes, amplifiant la réaction inflammatoire. En outre, les Lymphocytes T recrutés autour des neurones dans le site inflammatoire expriment de façon importante des médiateurs comme le TNF- α , l'interféron- γ et le Fas-Ligand. Le Fas-Ligand est une molécule de la surface cellulaire appartenant à la famille du TNF- α qui active le Fas-récepteur (Fas) et induit un mécanisme d'apoptose dans les cellules qui expriment le Fas. Le Fas-Ligand est surexprimé chez les patients parkinsoniens. Les voies de signalisation de la mort neuronale dopaminergique que sont le NF κ B et p38 MAP kinases sont activées en liaison avec le Fas et le

TNF-R1 (Hirsch et Hunot 2009). De plus, la molécule d'adhésion cellulaire ICAM-1 (CD54), appartenant à la superfamille des immunoglobulines d'adhésion, qui semble jouer un rôle important dans le maintien de la neuroinflammation, est surexprimée dans la microglie activée dans la SNc de patients parkinsoniens, ainsi que ses récepteurs de la famille des β 2-intégrines, le LFA-1 (CD11a/CD18) et le Mac-1 (CD11b/CD18) (Whitton 2007). Chez ces patients, l'expression d'ICAM-1 est particulièrement intense autour des résidus neuronaux dans les zones de perte cellulaire ce qui permet à la microglie d'adhérer aux neurones (Kreutzberg, 1996). Ceci suggère que les interactions entre l'ICAM-1 et LFA-1 joue un rôle dans le maintien de la neuroinflammation chez les patients parkinsoniens.

L'activation du facteur neurotrophique NF κ B dans les neurones favorise généralement leur survie. Cependant il a été démontré que le NF κ B module la prolifération et l'activation des cellules gliales et peut promouvoir des processus inflammatoires. Une relation possible entre la localisation du NF κ B dans les neurones dopaminergiques de la SNc des patients parkinsoniens et le stress oxydatif est soutenue par de récentes études, dans lesquelles le stress oxydatif induit chez le rat par la 6-OHDA dans la SNc a été médié par la voie de signalisation NF- κ B-dépendante p53 (Liang et al. 2007). Sur la base de toutes ces observations, Hirsch et Hunot ont proposé un schéma du mécanisme de la neuroinflammation via les médiateurs pro-inflammatoires sur la mort cellulaire (Figure 21).

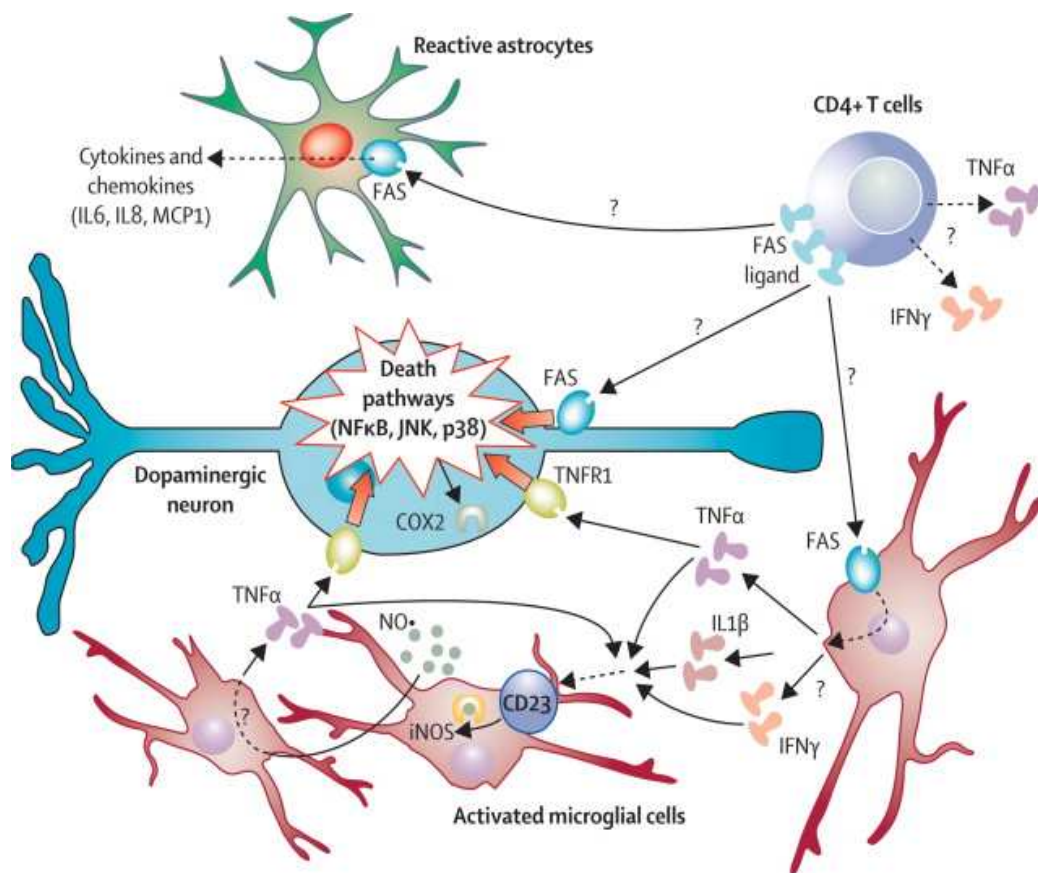


Figure 21 : Mécanismes sous-jacents aux effets délétères de la neuroinflammation dans la MP via la libération de médiateurs pro-inflammatoires comme le TNF α , l'IL-1 β , l'IFN- γ et la COX-2. D'après Hirsch et Hunot, 2009.

G. Immunité innée et adaptative

Le SNC est considéré comme une région immunitaire privilégiée due à la présence de la microglie comme moyen d'immunité innée. Les lymphocytes peuvent également participer à la réaction inflammatoire dans le cerveau de patients atteints de la MP. En effet, il a été détecté la présence plus importante de cellules CD4⁺ et CD8⁺ dans le cerveau de patients atteints de la MP en *post-mortem* que dans celui des individus sains, indiquant l'infiltration de cellules immunitaires périphériques lors du processus neuroinflammatoire (Brochard et al. 2009). De nombreuses autres données expérimentales confirment que des mécanismes immuns de type innés et adaptatifs sont à l'œuvre dans la MP et participent à la dégénérescence neuronale (Hirsch et Hunot 2009). Alors que l'immunité innée ne requiert pas la présence d'un antigène spécifique pour son déclenchement, l'immunité adaptative se produit lorsque des antigènes spécifiques sont présentés et reconnus par les lymphocytes.

1. Immunité Innée

Au cours de l'hématopoïèse, certaines cellules souches se différencient en monocytes qui peuvent voyager de la moelle osseuse vers le cerveau, où ils se différencient en cellules microgliales. Les cellules microgliales vont contribuer à la réponse immunitaire innée dans le cerveau, en agissant comme des cellules présentatrices d'antigènes, ainsi qu'à la promotion de l'inflammation en sécrétant des cytokines et d'autres molécules de signalisation et de communication avec les cellules environnantes (astrocytes, lymphocytes), comme décrit précédemment (Tansey et Wyss-Coray, 2008). La microglie joue un rôle homéostatique dans le SNC en répondant à des stimuli environnementaux (bactérie, virus, pesticides) et en supprimant les excès de neurotoxines comme des protéines anormales (α -synucleine), des sous-produits du catabolisme des catécholamines (neuromélanine), ou de débris cellulaires. Plusieurs études visant à la compréhension des réponses immunitaires innées du cerveau à une lésion ou à une infection ont mis en lumière les différentes caractéristiques du phénotype des cellules microgliales activées entre les sujets sains et ceux atteints de la MP (Hirsch et Hunot, 2009). La microglie activée dans la MP produit de façon plus soutenue des prostaglandines, des chimiokines, des cytokines, des protéines du complément, des protéinases, ROS et RNS. A des taux élevés, ces substances ont un effet délétère sur les populations neuronales en augmentant le

stress oxydatif et en activant les voies de l'apoptose. Les cellules de la microglie activée, en plus de pouvoir être présentatrices de l'antigène, sont également capables de phagocyter les corps étrangers et de présenter à leurs surfaces des immuno-molécules (antigènes) qui en résultent pour l'activation des lymphocytes T et le déclenchement de l'immunité adaptative (Aloisi, 2001).

2. Immunité Adaptative

Étant donné que la réduction de la fonction des pompes à efflux qui régulent la perméabilité de la BHE a été rapportée chez les patients parkinsoniens, il est fort probable que l'activité neuroinflammatoire dans le SNC, à proximité des neurones dopaminergiques, est en partie le résultat de l'infiltration de cellules immunitaires (lymphocytes) périphériques due à un dysfonctionnement de la BHE (Hirsch et Hunot, 2009). Ce concept est soutenu par la présence d'infiltrats de lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ et cellules T effectrices CD4⁺ dans le cerveau de patients parkinsoniens (Brochard et al. 2009). De plus, il a été rapporté des changements pathologiques dans la micro-anatomie des capillaires cérébraux des patients atteints de la MP due aux espèces réactives libérées par la microglie activée qui stimulent l'angiogenèse et induisent des dommages des capillaires cérébraux pour permettre aux cellules lymphocytaires d'entrer dans le SNC. Il semble que l'infiltration de lymphocytes T périphériques dans le SNC joue un rôle important dans la modulation de la réponse inflammatoire et donc dans la limitation ou la propagation de la perte neuronale selon le stade de la MP (Lee et al. 2009).

Pendant la neuroinflammation, les lymphocytes T qui traversent la BHE se lient directement à la microglie activée grâce à des marqueurs de surface spécifiques, afin de reconnaître les antigènes présentés par les cellules microgliales. Les lymphocytes T sont recrutés à l'endroit de l'agression grâce à la production microgliale des molécules chimiotactiques comme le MDC, l'IL-8, et le MIP- β (Kuhle et al. 2009). Une fois qu'ils ont été présentés aux antigènes, les lymphocytes T vont avoir une variété de rôles : - formation d'une banque de cellules mémoires productrices d'anticorps ; - sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires et cytotoxiques ; - attaques directes sur les membranes plasmiques des cellules étrangères (Aloisi 2001). Le rapport entre les lymphocytes T exprimant l'INF- γ et ceux exprimant l'IL-4 est augmenté chez les parkinsoniens, ce qui suggère un changement phénotypique vers un phénotype pro-inflammatoire des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ (Hirsch et Hunot 2009).

Les anticorps produits par les lymphocytes lors de l'immunité adaptative peuvent reconnaître différents composants des neurones dopaminergiques, y compris les produits de

protéines oxydées par la DA qui ont été trouvés dans le sérum des patients atteints de la MP (Hirsch et Hunot 2009). Des études récentes ont mis en cause l' α -synucléine modifiée par oxydation et surtout l' α -synucléine nitrée, que l'on trouve en abondance dans le cerveau de patients parkinsoniens, comme médiateur moléculaire déclenchant la réponse adaptative. En effet, l' α -synucléine nitrée est impliquée dans le recrutement de lymphocytes T CD4+ périphériques au niveau des ganglions lymphatiques du cerveau et joue un rôle dans le processus neurodégénératif à travers un mécanisme apoptotique impliquant la voie Fas / FasL (Mosley et al. 2011). D'autres études dans le modèle de souris MPTP ont montré que les lymphocytes T CD4+ peuvent promouvoir l'activation de la microglie et la neurotoxicité en réponse à l' α -synucléine nitrée (Reynolds et al. 2009). Ces observations appuient l'idée que le système immunitaire adaptatif peut influencer la pathogenèse de la MP via la modulation des fonctions effectrices de la microglie (Figure 22).

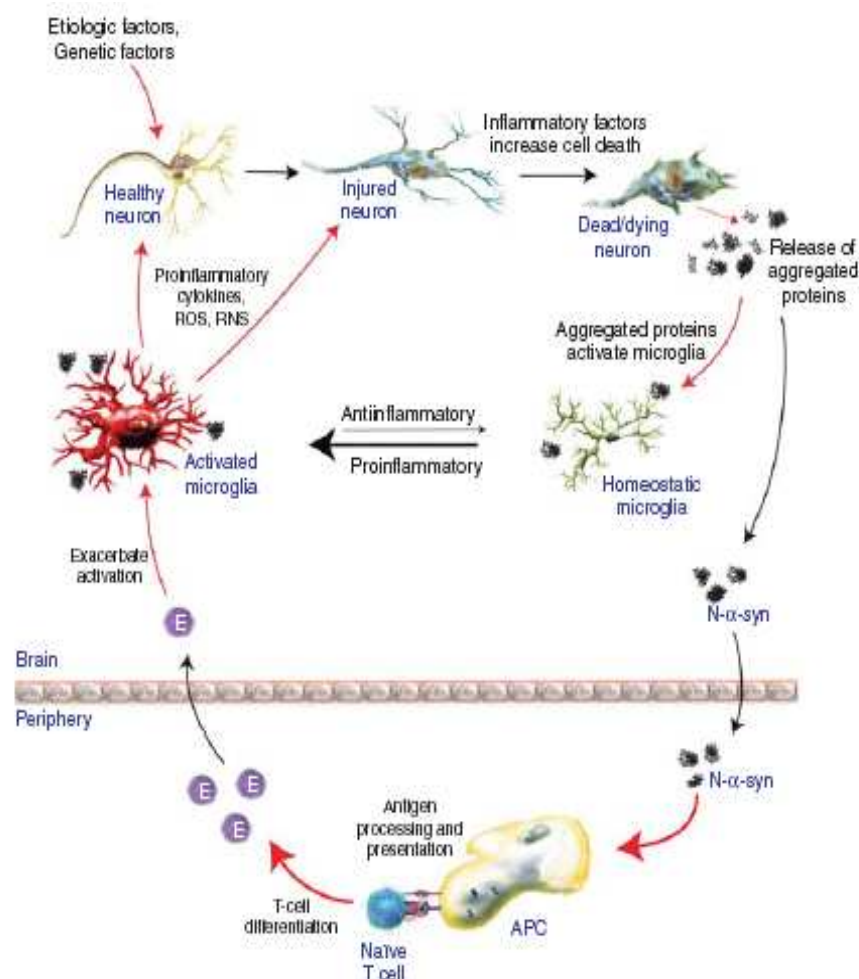


Figure 22 : Schéma de la contribution immunitaire à la pathogenèse de la MP. Les microglies sont sensibles aux changements dans leur microenvironnement, qui comprennent les facteurs libérés des neurones endommagés, notamment les protéines modifiées sous formes d'aggrégats, comme l' α -synucléine modifiée (N α -synucléine) qui induit une réponse immunitaire adaptative contre ces antigènes en périphérie. Au niveau du SNC, les microglies présentent l'antigène aux lymphocytes T effecteurs (E) et contribuent à l'activation des microglies et accélèrent la neurodégénérescence à partir de la voie Fas-Fas-L. D'après Mosley et al. 2011

Toutes ces données suggèrent que des facteurs immunogènes déclenchent une réponse immunitaire adaptative qui amplifie le processus neurodégénératif de la MP. Les mécanismes mis en jeu impliquent des interactions entre le SNC et le système immunitaire périphérique mais aussi entre la microglie et d'autres cellules comme les astrocytes et les lymphocytes (Hirsch et Hunot 2009). L'identification de la nature et du rôle des molécules impliquées dans ces interactions pourrait permettre l'identification de cibles pour réduire la progression de la neurodégénérescence. Par ailleurs, l'infiltration des lymphocytes T de la périphérie vers le SNC permet d'envisager une stratégie thérapeutique qui consisterait à apporter *in-situ* des agents neuroprotecteurs via ces cellules immunitaires (Tansey et al. 2010). Cette stratégie d'immunomodulation est l'une des approches thérapeutiques anti-inflammatoire et neuroprotectrice actuellement en développement dans le traitement de la MP.

La neuroinflammation et la neurodégénérescence dopaminergique sont donc liés. La survenue et l'évolution des relations entre ces deux phénomènes physiopathologiques reste cependant une question à approfondir. Une meilleure connaissance spacio-temporelle de ces relations permettrait de définir une fenêtre thérapeutique potentielle ouvrant la possibilité de la mise en place de protocoles neuroprotecteurs à travers l'utilisation de facteurs anti-inflammatoires.

Aujourd'hui, l'imagerie moléculaire nucléaire utilisant des molécules radioactives est un outil qui permet de détecter des changements moléculaires précoces, spécifiques, associés aux mécanismes physiopathologiques de nombreuses maladies, à leur récurrence ou à la probabilité de réponse à un traitement. Cette technique offre de vastes possibilités dans le développement et l'approbation de nouveaux traitements en permettant leur expérimentation et évaluation chez l'animal et surtout chez l'homme. L'imagerie moléculaire est donc très intéressante pour étudier les liens moléculaires et spacio-temporels qui existent entre le processus de neuroinflammation et la dégénérescence neuronale dopaminergique ainsi que pour l'évaluation de nouvelles approches thérapeutiques anti-inflammatoires de la MP.

**CHAPITRE IV : IMAGERIE MOLÉCULAIRE
NUCLEAIRE DE LA NEURODEGENERESCENCE ET
DE LA NEUROINFLAMMATION DANS LA MALADIE
DE PARKINSON**

I. PRINCIPES DE L'IMAGERIE MOLÉCULAIRE NUCLÉAIRE

L'imagerie moléculaire regroupe des techniques ou des associations de différentes techniques permettant de visualiser, *in-vivo* et de façon non invasive le fonctionnement cellulaire ou des processus moléculaires. Elle crée les conditions pour comprendre le fonctionnement de l'organisme sans le perturber. Aujourd'hui trois types de techniques permettent d'obtenir une imagerie métabolique, il s'agit de l'imagerie optique ou de fluorescence qui n'est pas encore transférable à l'homme, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) fonctionnelle qui a récemment vu le jour et a permis l'analyse fonctionnelle de certains organes notamment en neurologie et l'imagerie moléculaire nucléaire qui utilise des marqueurs radioactifs.

A. Imagerie moléculaire appliquée à la Médecine nucléaire

L'imagerie moléculaire nucléaire utilisée en Médecine nucléaire permet, contrairement à d'autres techniques d'imagerie anatomique (IRM, scanner), de visualiser le fonctionnement cellulaire et d'étudier les processus physiologiques à l'échelle moléculaire. La Médecine nucléaire est une spécialité médicale qui utilise les rayonnements ionisants en sources non scellées à des fins diagnostiques ou thérapeutiques. Les sources non-scellées sont des sources radioactives non confinées et dont la présentation ne permet pas de prévenir la dispersion de la substance radioactive dans l'espace. Dans son application diagnostique, la Médecine nucléaire est également appelée imagerie fonctionnelle métabolique ou scintigraphie. Il s'agit d'une méthode d'imagerie non-invasive qui permet le suivi à l'intérieur de l'organisme, après administration à l'homme, d'un radionucléide émettant des rayonnements γ , grâce au recueil extérieur de ces rayonnements par des caméras dédiées. Les radionucléides utilisés peuvent présenter une biodistribution intrinsèque permettant la visualisation d'un organe ou d'une fonction comme l'iode-123 ou le thallium-201, dédiés respectivement à la scintigraphie de la thyroïde et du cœur. Cependant, pour réaliser des explorations plus spécifiques d'un organe ou d'une pathologie, il est nécessaire d'intégrer l'élément radioactif à une structure organique qui servira de vecteur et déterminera le tropisme de la molécule radioactive ainsi constituée pour un organe ou une fonction métabolique cible. La molécule radioactive ou radioligand est donc une

sonde moléculaire et un marqueur spécifique d'un organe ou d'une fonction métabolique étudiée. Ceci suppose que le radioligand ne soit pas modifié par son environnement biologique et physicochimique tout au long de l'examen médical (Rudin et Weissleder, 2003). Le radioligand est injecté à une dose très faible appelée microdose, définie comme moins de 1/100ème de la dose de molécule non radiomarquée nécessaire pour observer un effet pharmacologique avec une dose maximale inférieure à 100 µg. Les principales applications médicales concernent les domaines de la cancérologie, de la neurologie et de la cardiologie. Cette technique permet de déceler et de traiter les maladies plus tôt et avec une exactitude accrue. Elle offre de vastes possibilités dans le développement et l'approbation de nouveaux médicaments en permettant leur évaluation chez l'homme suite à leur administration sous forme radiomarquée rendant possible une imagerie d'organe et/ou d'organisme et des mesures de concentration du médicament dans divers milieux biologiques (sang, urines,...) (Josephs et al. 2009).

B. Techniques d'imagerie moléculaire par émission

Deux techniques d'imagerie sont employées en Médecine nucléaire : la TEMP et la TEP. Leur spécificité réside dans la technique de détection des rayonnements basée sur les caractéristiques physiques des radionucléides utilisés. Aujourd'hui la TEP, mais aussi de plus en plus la TEMP, ne se conçoit que couplée à un scanner (TDM). La fusion des deux images permet une meilleure localisation des fixations et de corriger l'atténuation des photons par le patient. Il en résulte une meilleure sensibilité et une meilleure spécificité de l'image.

1. Tomographie par Emission MonoPhotonique (TEMP)

La TEMP, nécessite d'administrer au patient une molécule radioactive contenant un radionucléide émetteur de rayonnements γ monophotonique comme le technétium-99m (^{99m}Tc) et l'iode-123 (^{123}I). Ces rayonnements sont détectés à l'aide d'une gamma-caméra (Figure 23). La gamma-caméra est constituée de plusieurs éléments qui permettent de transformer le signal photonique en impulsions électriques, puis en image

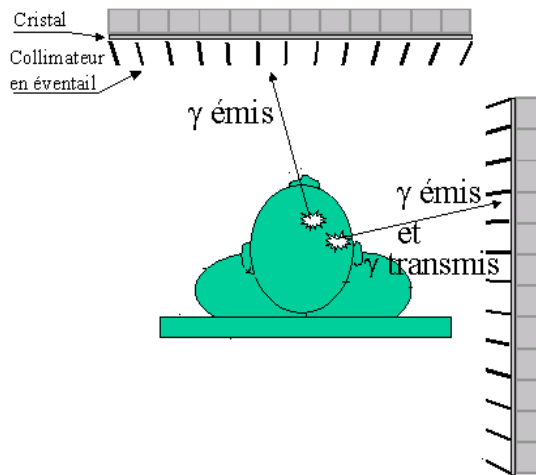


Figure 23 : Schéma du principe de détection des têtes de caméra TEMP

Les photons γ étant émis dans toutes les directions de l'espace, un collimateur, positionné à l'entrée de la tête de détection de la caméra, sélectionne les rayonnements selon leur incidence et leur énergie afin de localiser le lieu de l'émission du rayonnement. Une correction d'atténuation due à l'épaisseur des tissus du patient traversés peut être réalisée par rotation des têtes de caméra, généralement 2 ou 3 têtes par caméra, autour du patient. Les photons collimatés rencontrent un détecteur à scintillation, constitué d'un cristal qui peuvent être de plusieurs natures : soit de l'iodure de sodium boosté au thallium, soit du Germanium ultra-pure, soit par des semi-conducteurs constitués d'un mélange Cadmium-Zinc-Tellure (CZT), et sont convertis en photons lumineux d'énergie inférieure. Ces photons lumineux sont ensuite collectés au niveau d'une photocatode qui émet des électrons en proportion de l'intensité du signal reçu. Les électrons sont accélérés puis entrent dans un photomultiplicateur qui amplifie le signal. L'impulsion électrique finale émise est proportionnelle au nombre d'électrons initiaux et donc aux photons γ incidents. Le signal est alors analysé informatiquement afin de reconstruire une image reproduisant la biodistribution de la radioactivité dans le corps du patient.

2. Tomographie par Emission de Positons (TEP)

La TEP utilise des molécules radioactives contenant un radionucléide émetteur de positons (β^+) comme le carbone-11 (^{11}C) et le fluor-18 (^{18}F). Après un court trajet dans la matière, le positon interagit avec un électron, cette interaction crée l'annihilation électron-positon (Figure 24).

La masse totale électron-positon disparaît et est convertie en énergie. Ainsi, 1022 keV sont produits sous forme de 2 photons γ de 511 keV chacun, émis dans des directions diamétralement opposées.

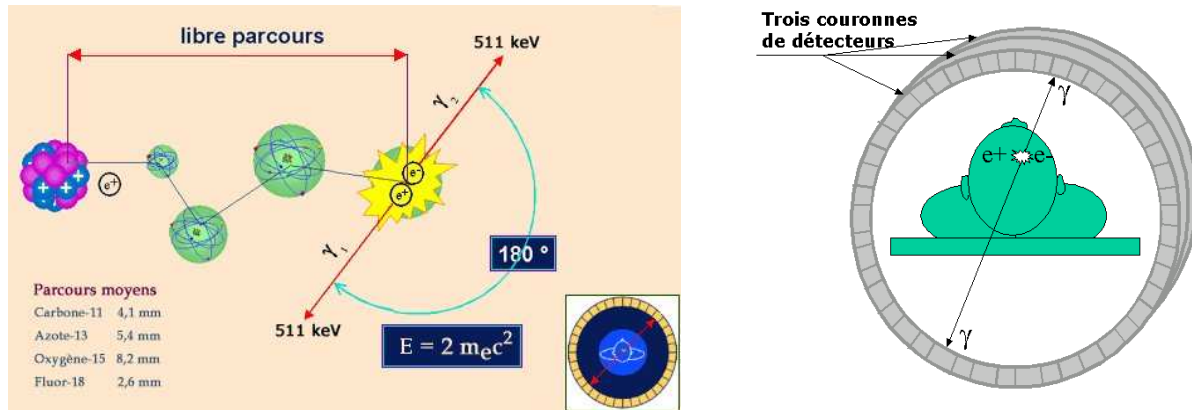


Figure 24 : Schéma du principe de détection des caméras TEP avec le phénomène d'annihilation des positons

Ces 2 photons sont captés par un anneau de détecteurs scintillateurs de la caméra TEP qui peuvent être de plusieurs natures : cristal de NaI, cristal de Silicate de lutetium (LSO) ou de silicate de Bismuth (BGO). La caméra TEP est constituée de plusieurs anneaux juxtaposés de détecteurs qui entourent le patient. Quand 2 photons rencontrent 2 détecteurs positionnés à 180° l'un de l'autre dans une fenêtre temporelle restreinte (~10 nanosecondes), appelée fenêtre de coïncidence, on admet qu'ils résultent de la désintégration du même atome localisé sur la même droite passant par les 2 détecteurs. C'est la superposition de toutes les lignes obtenues par détection simultanée de 2 photons en coïncidence qui aboutit à la reconstruction d'une image scintigraphique en 3 dimensions, représentant la biodistribution du radioélément dans l'organisme. L'utilisation d'un collimateur n'est plus nécessaire, ce qui augmente la sensibilité de la détection et la résolution de l'image par rapport à la TEMP.

3. Place de l'imagerie TEMP relativement à l'imagerie TEP

La technique d'imagerie TEP est devenue la méthode de choix pour le diagnostic des pathologies et le suivi de la réponse aux traitements. Plusieurs facteurs permettent d'expliquer que la TEP puisse apparaître comme devant occuper la plus grande place en imagerie moléculaire dans le futur : - Des performances réputées meilleures à celles de la TEMP en termes de statistique de comptage des rayonnements, de qualité d'images hautement résolues, de quantification de la fixation de la molécule radioactive et de sensibilité permettant la détection de quantités picomolaires du radioligand. - La TEP offre de grandes possibilités dans le développement et l'approbation de médicaments en permettant leur expérimentation de façon

précoce chez de nombreux patients (Josephs et al. 2009). - De nombreux radioligands TEP ont été récemment développés pour des applications en cancérologie (^{18}F -FLT, ^{18}F -Choline, ^{18}F -FET) dans l'évaluation de la réponse au traitement et la stadification des cancers (Margolis et al. 2007) mais également en neurologie dans l'exploration de la MP (^{18}F -Dopa) et de la Maladie d'Alzheimer (^{18}F -AV45) (Clark et al. 2011).

Cependant, l'imagerie TEMP présente des caractéristiques lui permettant de cohabiter avantageusement avec la TEP : - Plusieurs avancées techniques récentes ont donné un nouvel élan au développement de radioligands monophotoniques : 1) l'arrivée des caméras hybrides TEMP-TDM et des détecteurs solides CZT ou semi-conducteurs, présentant une excellente résolution spatiale (infra-millimétrique), une sensibilité de détection accrue d'un facteur 5 à 10, une résolution améliorée d'un facteur 2 (D'Asseler 2009) ; 2) l'amélioration concernant le traitement de l'image en remplaçant les algorithmes analytiques de rétroprojection filtrée (FBP) par ceux de reconstruction itérative de type OSEM (2-D puis 3-D), modélisant les phénomènes perturbateurs (réponse du détecteur), améliorant résolution spatiale, contraste lésionnel, diminuant le bruit de fond et réduisant les phénomènes d'artéfacts (Zeintl et al. 2010). - Les radioéléments utilisés en TEMP possèdent des caractéristiques physiques qui les prédestinent aux études sur plusieurs jours comme pour le suivi de marqueur avec une cinétique d'élimination lente. - D'un point de vue pratique, les techniques de productions et les caractéristiques physiques des radioéléments pour la TEMP offrent une grande disponibilité et une souplesse d'utilisation qu'offrent plus difficilement ceux des radioéléments utilisés en TEP.

C. Imagerie moléculaire en recherche pré-clinique

En recherche pré-clinique, l'imagerie moléculaire nucléaire reprend les techniques utilisées en Médecine nucléaire mais appliqués à l'animal. Elles permettent une imagerie fonctionnelle pour analyser quantitativement les mécanismes physiopathologiques, les conséquences métaboliques des altérations ainsi que leur suivi dans le temps, en vue de comprendre ces mécanismes et d'établir de nouveaux moyens diagnostiques et thérapeutiques (Jacobs et al. 2012). En outre, l'imagerie moléculaire nucléaire représente l'un des outils les plus performants en recherche pré-clinique pour le développement de nouveaux radioligands (Margolis et al. 2007).

1. Techniques d'imagerie in-vivo : micro-TEMP et micro-TEP

La possibilité de faire de l'imagerie TEMP ou TEP chez le petit animal a permis une imagerie anatomo-fonctionnelle avec des performances techniques uniques, semblables à celles obtenues par les mêmes techniques chez l'homme. La micro-TEMP et micro-TEP bénéficient de la multimodalité par le couplage avec la TDM permettant une précision sur la localisation de la fixation des marqueurs utilisés (de Kemp et al. 2010). La micro-TEMP est mieux adaptée à des molécules de haut poids moléculaire avec une cinétique lente. Elle est utilisée avec des radioéléments facilement disponibles ayant des périodes physiques relativement longues (^{99m}Tc , ^{123}I). Elle possède une haute résolution millimétrique, une bonne quantification, une sensibilité satisfaisante mais plus faible que la micro-TEP et la correction d'atténuation chez les gros animaux est moins performante (Massoud et Gambhir 2003). La micro-TEP est mieux adaptée à des molécules de bas poids moléculaire et avec une cinétique rapide. Elle est utilisée avec un petit nombre de radioéléments, émetteurs de positons (^{18}F , ^{11}C), chers à produire et avec des périodes physiques courtes. Elle possède une très bonne sensibilité (fmol) avec une excellente quantification (nmol/ml) (Massoud et Gambhir 2003). La résolution est submillimétrique, cependant elle n'est pas uniforme tout le long de la chambre d'acquisition des images. Elle permet des acquisitions dynamiques en 3D (de Kemp et al. 2010).

2. Technique d'imagerie in-vitro : l'autoradiographie

L'autoradiographie est une technique d'imagerie moléculaire par émission réalisée à partir d'une source radioactive placée au contact d'une émulsion scintillante ou d'un film photographique. Elle diffère des techniques radiographiques classiques qui sont des techniques d'imagerie de transmission (Zanzonico 2012). L'autoradiographie est une technique d'imagerie *in-vitro* ou *ex-vivo* planaire (2D) avec une bonne résolution (15 à 50 μm) basée sur la détection de particules β ou γ/X émises par un radiomarqueur distribué dans des coupes histologiques. La lecture de l'image peut se faire soit par révélation du film photographique soit par l'utilisation d'un micro-imager qui permet d'obtenir une image numérique avec une acquisition en temps réel (Salin et al. 2000). L'autoradiographie est donc une technique d'imagerie utilisée pour connaître la biodistribution du marqueur radioactif sur une coupe histologique.

II. IMAGERIE MOLÉCULAIRE DE LA PERTE NEURONALE DOPAMINERGIQUE : CIBLES POTENTIELLES

On peut affirmer que les signes cliniques moteurs de la MP sont liés à une perte fonctionnelle ou morphologique des neurones dopaminergiques nigro-striés. L'évaluation et le suivi de cette perte neuronale sont aujourd'hui indispensables dans le diagnostic, le suivi et l'évaluation de nouvelles thérapeutiques de la MP. L'imagerie moléculaire peut utiliser différentes cibles permettant l'étude de la neurotransmission dopaminergique. Quatre cibles principales sont aujourd'hui utilisées (Figure 25): - le métabolisme de la dopamine ; - le transporteur vésiculaire de la DA ; - les récepteurs dopaminergiques de type D2 (RD2) ; - le transporteur neuronal de la dopamine (DAT).

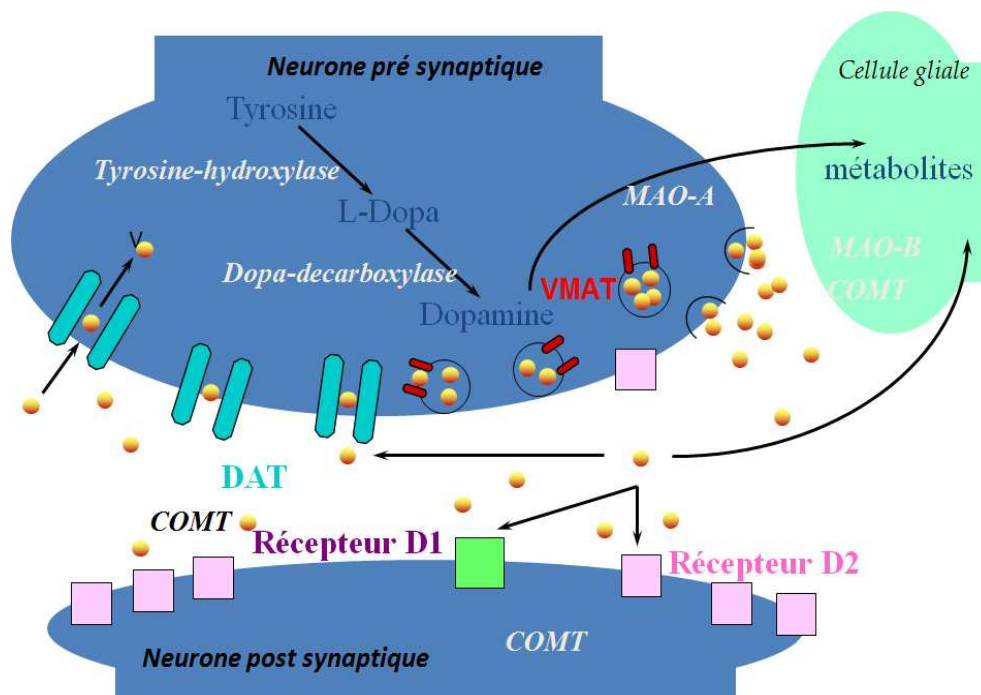


Figure 25 : Schéma de la synapse dopaminergique striatale et des cibles potentielles en imagerie moléculaire.

La différenciation de ces quatre cibles réside sur leur traduction physiologique et sur leur localisation au niveau de la synapse. En effet, les radiologands utilisés sur les cibles liées au métabolisme et au transport vésiculaire de la DA sont des marqueurs morpho-fonctionnels, ils reflètent indirectement la perte neuronale à travers l'état fonctionnel des terminaisons nerveuses. Les radioligands utilisés pour le DAT sont des marqueurs morphologiques, leur baisse de fixation reflète directement la perte neuronale. Les radioligands utilisés sur les RD2 quant à eux, reflètent la densité des récepteurs libres liée à leur taux d'occupation par des agonistes et les antagonistes endogènes ou exogènes. Par ailleurs, l'imagerie moléculaire des

RD2 se distingue de l'imagerie des autres cibles par le fait qu'elle permet de visualiser le versant post-synaptique.

En clinique, ces quatre cibles seront choisies par rapport au but diagnostique fixé et selon plusieurs critères qui sont la disponibilité du radioligand, le stade de la maladie, la prise ou non de traitements par le patient. Elles peuvent se révéler complémentaires notamment dans le diagnostic différentiel entre la MP idiopathique et les autres pathologies neurodégénératives du système extrapyramidal avec des syndrômes associés apparentés à la MP. En effet, ces pathologies apparentées sont toutes dues à une diminution du fonctionnement du système de neurotransmission dopaminergique, suite à une dégénérescence neuronale pré et/ou post-synaptique. Afin de pouvoir faire un diagnostic différentiel entre la MP idiopathique et les autres pathologies neurodégénératives comme la PSP ou l'AMS l'imagerie moléculaire des RD2 en plus de celle du DAT sera nécessaire (Schwarz et al. 1997). En effet, dans la MP, il existe une atteinte du DAT, mais pas des RD2 au niveau du striatum (Sudmeyer et al. 2011), alors que dans les pathologies neurodégénératives apparentées, il existe une atteinte globale et hétérogène des neurones dopaminergiques, donc des DAT et des RD2 (Zijlmans et al. 2007).

Plusieurs radioligands ont été développés et sont aujourd'hui utilisés en TEMP et en TEP afin de visualiser ces quatre cibles principales, marqueurs de la perte fonctionnelle et/ou morphologique neuronale dopaminergique nigro-striée. Ces radioligands sont soit déjà utilisés en routine clinique dans le diagnostic et le suivi de la MP, soit en recherche clinique et pré-clinique dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques, de leur évolution dans le temps ainsi que dans la mise en place et l'évaluation de stratégies thérapeutiques (Figure 26).

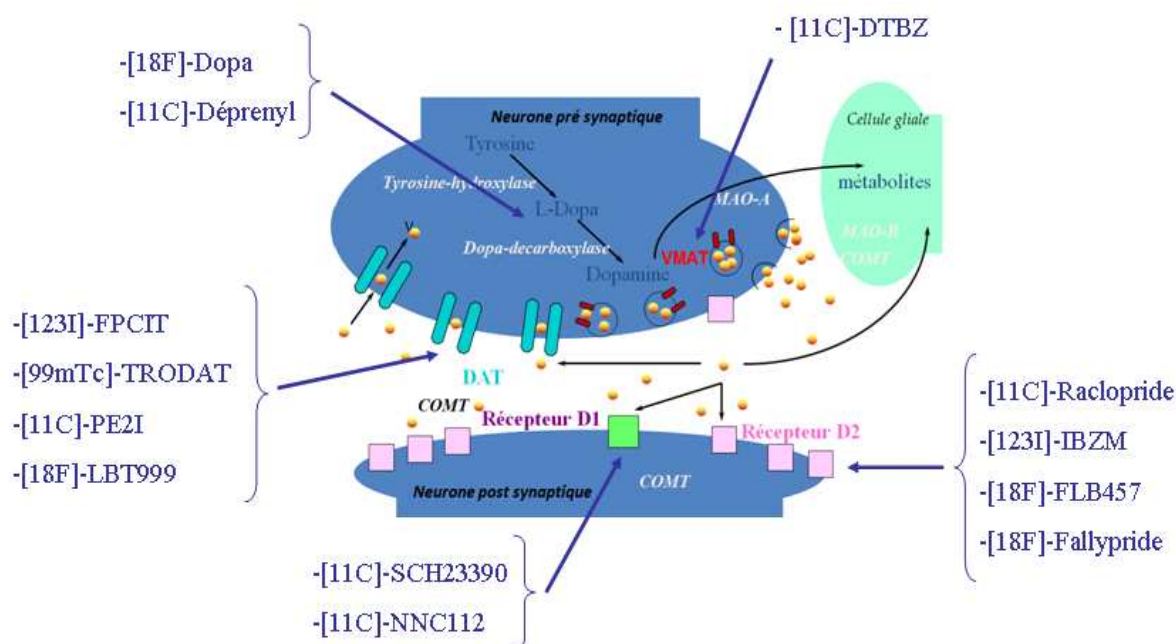


Figure 26 : Liste non exhaustive des radioligands actuellement disponibles dans l'imagerie moléculaire de la terminaison synaptique dopaminergique

A. Le métabolisme et le transport vésiculaire de la Dopamine

Le métabolisme de la DA, qui reflète sa quantité et donc celle des neurones associés, peut être étudié à travers l'imagerie moléculaire de l'activité de la dopa-decarboxylase (DDC). La fluorodopa (F-Dopa), analogue de la L-Dopa, est un ligand qui reflète l'activité enzymatique de la DDC (Firnau et al. 1987). Elle peut être marquée au fluor-18 (de Vries et al. 1999) et est utilisée dans des applications cliniques en TEP depuis plus de 10 ans. Aujourd'hui, la [18F]-Dopa est un médicament radiopharmaceutique utilisé dans la détection des pertes fonctionnelles des terminaisons des neurones dopaminergiques dans le striatum (Figure 27). La [18F]-Dopa peut être utilisée dans le diagnostic de la MP et la distinction entre le Tremblement essentiel et les autres syndromes parkinsoniens. Par ailleurs, elle peut aider au diagnostic différentiel entre la MP, la PSP et l'AMS. En effet, si dans la MP l'imagerie révèle une baisse de fixation de la [18F]-Dopa corrélée à la progression clinique en particulier dans la partie dorsale du putamen, cette baisse de fixation est surtout présente au niveau du noyau caudé dans la PSP et variable dans l'AMS (Morrish et al. 1995 ; Cropley et al. 2006). Si la [18F]-Dopa est un bon radioligand pour la quantification de la perte neuronale dopaminergique, il semble que dans les phases précoces de la MP, la DDC soit surexprimée comme mécanisme compensatoire, induisant des faux négatifs, ce qui en fait un radioligand moins sensible dans le diagnostic précoce de la MP que les radioligands spécifiques du DAT (Ribeiro et al. 2002). Par ailleurs, l'administration aiguë de L-Dopa ou d'agoniste dopaminergique réduit la fixation striatale de la [18F]-Dopa par le biais d'une diminution d'activité de la DDC secondaire à la stimulation des auto-récepteurs dopaminergiques pré-synaptiques (Leviel et al. 2001).

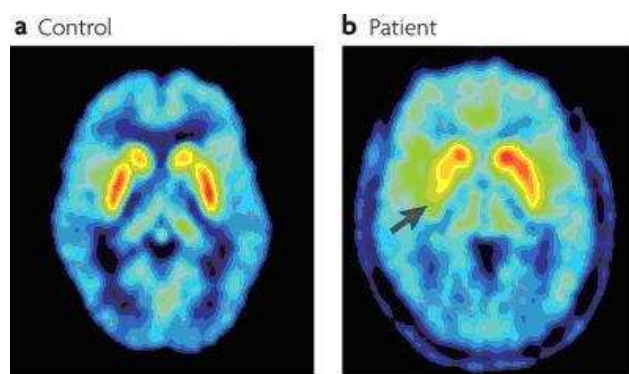


Figure 27 : Image TEP de 18F-Dopa
a) sujet control, b) patient MP,
d'après Redgrave et al. 2010

Après avoir été métabolisée dans le cytoplasme, la DA est chargée dans des vésicules pré-synaptiques par un transporteur, le VMAT-2. Le DTBZ ou dihydrotetrabenazine est un ligand capable de se fixer spécifiquement sur le transporteur VMAT-2 (Koeppel et al. 1996). Sa fixation reflète le nombre de vésicules de stockage lié à la quantité de DA produite et donc au nombre de terminaisons nerveuses pré-synaptiques. Le DTBZ peut être marqué au carbone-11

(Jewett et al. 1997). Chez le sujet parkinsonien, le [11C]-DTBZ a permis de montrer une bonne corrélation entre la baisse de sa fixation au niveau du striatum, l'état d'avancement de la MP et la survenue des symptômes moteurs (Martin et al. 2008). Récemment, le DTBZ a été marqué au fluor-18 (Lin et al. 2010) et a permis de montrer une fixation dans le striatum liée à l'âge de la survenue de la MP, les patients plus jeunes présentent une fixation plus importante avec une évolution plus lente que les patients âgés laissant penser que les mécanismes compensatoires sont plus efficaces chez les sujets atteints jeunes (de la Fuente 2011). Bien qu'ayant des caractéristiques intéressantes, le DTBZ radiomarqué n'est pas utilisé en Europe.

B. Les récepteurs dopaminergiques

La détermination des profils pharmacologiques permet de différencier directement les récepteurs appartenant à chacune des deux familles de récepteurs D1 et D2. Ainsi, l'apomorphine est un agoniste des RD1 et des RD2, les dérivés de l'ergot de seigle (bromocriptine, lisuride, pergolide) sont des agonistes spécifiques des RD2 (Dunlop et al. 2007). En imagerie moléculaire, les ligands les plus utilisés sont pour les RD1 le SCH-23390 et analogues qui sont des prototypes de l'antagoniste spécifique des RD1, et pour les RD2 des dérivés benzamides comme le raclopride, le iodobenzamide (IBZM), l'isomexipride (FLB-457) et le fallypride, analogues du remoxipride, composés de la famille du sulpiride, antagoniste spécifique des RD2 (de Paulis. 2003) (Tableau II). L'imagerie TEMP ou TEP des RD1 ou RD2 ne permet pas de visualiser directement la perte neuronale dopaminergique. La fixation des radioligands reflète la densité des récepteurs libres liée à leur taux d'occupation par la DA ou par d'autres molécules. En aucun cas, elle ne permet à elle seule le diagnostic de la MP. Aujourd'hui, l'imagerie en lien avec la MP ou les syndrômes parkinsoniens ne fait quasiment appel qu'aux RD2. L'imagerie des RD1 en relation avec la MP n'est pas très développée, la raison principale est que les rares radioligands disponibles : le [11C]-SCH-23390 et le [11C]-NNC-112 manquent de spécificité vis-à-vis des RD1. Ils possèdent une affinité non négligeable pour les récepteurs de la sérotonine, et montrent un rapport fixation spécifique / non spécifique faible rendant difficile l'interprétation des images (Ekelund et al. 2007). L'imagerie des RD1 est très utilisée dans l'étude des symptômes cognitifs tels que la schizophrénie ou la dépression liés à l'atteinte des RD1 mais également des récepteurs de la sérotonine (Kosaka et al. 2010). L'imagerie des RD2 du striatum en TEP avec du [11C]-raclopride (Hall et al. 1988) ou en TEMP avec du [123I]-IBZM (Kung et al. 1988), a montré sa capacité à distinguer les patients

atteints de MP précoce et sensibles à la L-Dopa, des patients atteints de pathologie apparentée comme la PSP ou l'AMS non sensibles à la L-Dopa et pour lesquels il existe une atteinte neuronale post-synaptique contrairement à la MP (Van Laere et al. 2010) (Figure 28).

De plus, l'imagerie des RD2, chez les patients MP *de novo* sans traitement, permet de montrer une augmentation de fixation dans le striatum du côté controlatéral aux symptômes (Ouchi et al. 1999), fixation qui devient identique aux témoins au cours de l'évolution de la maladie (Antonini et al. 1995), reflétant le mécanisme de compensation au manque de DA endogène à travers l'augmentation des RD2. Par ailleurs, l'imagerie des RD2 permet de montrer, après traitement et au cours de l'évolution de la MP, une fixation normale par rapport à des témoins (Schwarz et al. 1997) et donc de prédire la sensibilité au traitement par la L-Dopa. Enfin, il a été démontré une baisse de la fixation chez des patients atteints de la MP avec un traitement par des agonistes des RD2 (lisuride ou pergolide) par rapport aux patients naïfs traduisant un phénomène de compétition entre le radioligand et les agonistes au niveau des RD2 (Laruelle et al. 1997 ; Ishibashi et al. 2010). Ainsi, si l'imagerie des RD2 ne permet pas de faire le diagnostic de la MP, elle permet d'éliminer la possibilité d'une MP lorsqu'il existe une baisse de fixation des radioligands associée à l'absence de réponse clinique après traitement par la L-Dopa. Les radioligands utilisés pour l'imagerie des RD2 sont également capables de se lier aux RD2 extra-striataux, surtout le [11C]-FLB-457 (Vandehey et al. 2010 ; Cervenka et al. 2010) et le [18F]-fallypride (Kegeles et al. 2010), ce qui présente un intérêt dans l'exploration des maladies neuropsychiatriques comme la schizophrénie (Olsson et al. 2004).

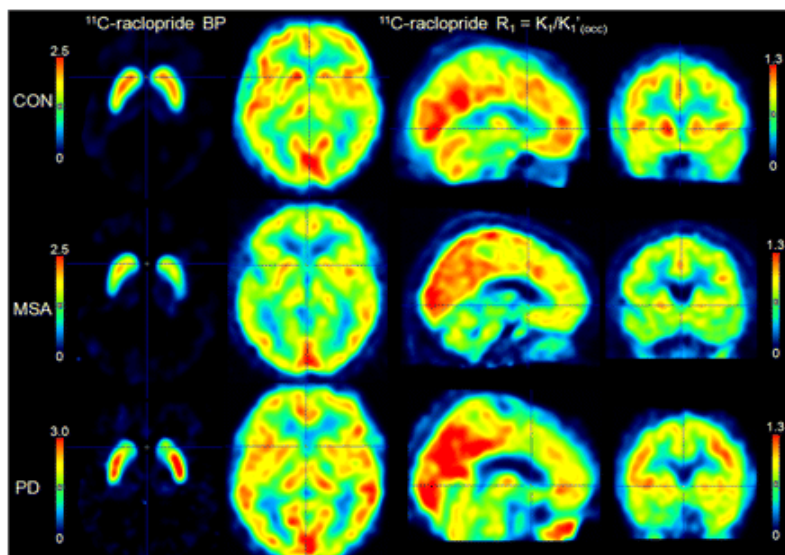


Figure 28 : images comparatives des RD2 avec du [11C]-raclopride chez un sujet contrôlé (CON), un sujet atteint d'AMS (MSA) et un sujet atteint de MP (PD). D'après Van Laere et al. 2010.

Caractéristiques	11C-raclopride	123I-IBZM	18F-FLB457	18F-fallypride
Affinité pour RD2 (Kd)	1 nM (Hall et al. 1988)	0,426 nM (Kung et al. 1988)	0.017 nM (Halldin et al. 1995)	0,030 nM (Mukherjee et al. 1996)
Quantification RD2 extrastriataux	Oui	Non	Oui	Oui
Intervalle IV-pic de fixation striatale	20 – 40 min	40 – 60 min	40 - 60 min	40 - 60 min
Temps d'élimination (washout)	Prolongé	Prolongé	Prolongé	Prolongé
Dosimétrie CE / 185 MBq	1,3 mSv (Ribeiro et al. 2005)	6,3 mSv (Verhoeff et al. 1993)	-	6,8 mSv (Mukherjee et al. 2001)
Rapport fixation striatum/cervelet	4.6 (Rinne et al. 1990)	2.4 (Wenning et al. 1998)	15 (Halldin et al. 1995)	28 (Mukherjee et al. 2002)

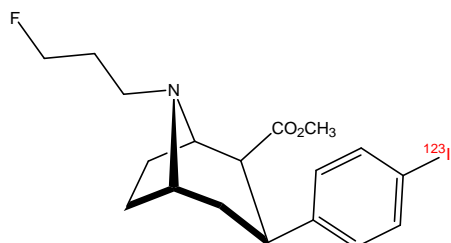
Tableau II : récapitulatif des caractéristiques principales des radioligands marqueurs des RD2 dopaminergiques

D. Les transporteurs de la Dopamine (DAT)

Du point de vue pharmacologique, la cocaïne est un antagoniste des DAT. Elle inhibe de façon compétitive la recapture de la DA par la membrane pré-synaptique en se fixant sur les DAT, augmentant ainsi la quantité et la durée de vie de la DA dans la fente synaptique, ce qui amplifie l'action de la DA sur la membrane post-synaptique (Volkow et al. 1997). En imagerie moléculaire des DAT, les radioligands utilisés actuellement sont des dérivés de la cocaïne. Cette molécule naturelle qui se lie fortement aux DAT ne leur est pas spécifique car elle présente également une grande affinité pour les transporteurs de la sérotonine (Rudnick et Wall 1991). D'autre part, cette molécule est instable *in-vivo* avec un métabolisme hépatique rapide. Dès lors, des études de pharmacomodélisation ont permis de développer des dérivés du tropane, famille chimique à laquelle appartient la cocaïne, beaucoup plus stables *in-vivo* et présentant une affinité et une spécificité plus importantes pour les DAT que la cocaïne. Plusieurs molécules sont aujourd'hui utilisées en imagerie TEMP : le FP-CIT, le TRODAT et le PE2I et en imagerie TEP : le PE2I et le LBT999 (Tableau III), dans des études pré-cliniques et cliniques des maladies neurodégénératives avec syndrome parkinsonien (Varrone et Halldin, 2010). En clinique, lorsqu'il existe un tableau typique des syndromes parkinsoniens, il existe toujours une atteinte anatomique du système dopaminergique pré-synaptique et l'imagerie des DAT permet de confirmer l'examen clinique. L'imagerie des DAT est la seule qui reflète directement la densité des neurones. Une baisse de la fixation des radioligands sur les DAT est proportionnelle à celle des neurones (Benamer et al. 2000). Elle est donc essentielle au diagnostic des pathologies dégénératives avec syndromes parkinsoniens dont la MP. Par ailleurs, elle permet de faire le diagnostic différentiel entre la MP et le Tremblement essentiel pour lequel il n'y a

pas de neurodégénérescence dopaminergique (Benaderette et al. 2006). En revanche, l'imagerie des DAT ne permet pas à elle seule le diagnostic différentiel entre la MP et les autres pathologies dites parkinson-plus (PSP et AMS) (Antonini et al. 2003).

1. Le FP-CIT



Le FP-CIT ou 2-beta-carboxymethoxy-3beta-(4-iodophenyl)-N-(3-fluoropropyl)nortropane présente une bonne affinité ($K_d = 28$ nM), 10 fois supérieure à celle de la cocaïne ($K_d = 316$ nM), avec une meilleure spécificité pour les DAT (Okada et al. 1998). Il est marqué à l'iode-123 (Kiukka et al. 1995). Le [123I]-FP-CIT présente une cinétique intéressante, avec un important passage dans le cerveau, une élimination rapide du compartiment sanguin et un pic de radioactivité au niveau du striatum à environ 60 min post-injection suivi d'un plateau (Booij et al. 1998). Par ailleurs il a montré chez l'homme sain un rapport de fixation striatum/cervelet de 7,7 montrant une bonne spécificité pour les DAT (Kiukka et al. 1995). Les études TEMP avec le [123I]-FP-CIT ont montré que l'importance de la diminution de sa fixation est corrélée à la symptomatologie clinique. Il a montré son intérêt dans le diagnostic de la MP précoce chez des patients naïfs et dans le diagnostic pré-symptomatique de la MP (Brooks 2010) (Figure 29). Néanmoins, le [123I]-FP-CIT conserve une affinité non négligeable pour les transporteurs de la sérotonine, environ dix fois moins importante que celle pour les DAT ce qui reste un inconvénient lors de l'interprétation des images (Ziebell et al. 2011). Le [123I]-FP-CIT a montré une précision supérieure à d'autres radioligands du DAT dans le diagnostic différentiel précoce de la MP et des troubles extrapyramidaux non-dégénératifs (Tremblement essentiel, syndrome neuroleptique ou d'origine vasculaire), ainsi qu'une meilleure sensibilité dans le suivi de ces maladies (Van Laere et al. 2004) Plusieurs études ont permis de définir l'intérêt du [123I]-FP-CIT dans le diagnostic différentiel entre la MP et les autres syndromes parkinsoniens neurodégénératifs (Démence à corps de Lewy et PSP) (Booij et al. 2001 ; Zijlmans et al. 2007). Aujourd'hui, le [123I]-FP-CIT est commercialisé sous le nom de Datscan® et utilisé en clinique dans la détection d'une perte de terminaisons neuronales dopaminergiques fonctionnelles du striatum chez les patients ayant un syndrome parkinsonien cliniquement

douteux. Une étude clinique multicentrique a montré une sensibilité de 78% et une spécificité de 97% du [123I]-FP-CIT dans le diagnostic de la MP (Marschall et al. 2009).

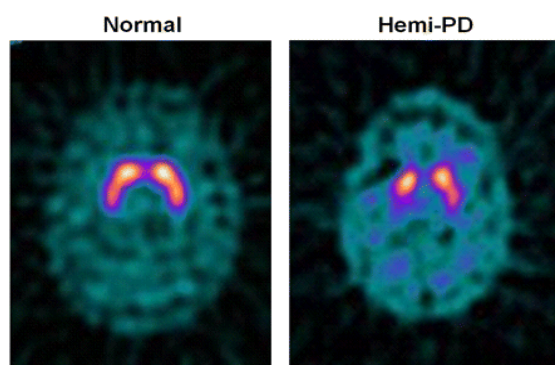
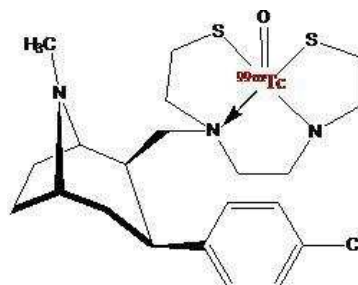


Figure 29 : Images TEMP avec du [123I]-FPCIT. A gauche, chez un sujet sain, à droite chez un sujet parkinsonien à un stade précoce montrant une diminution asymétrique de la fixation. D'après Brooks 2010

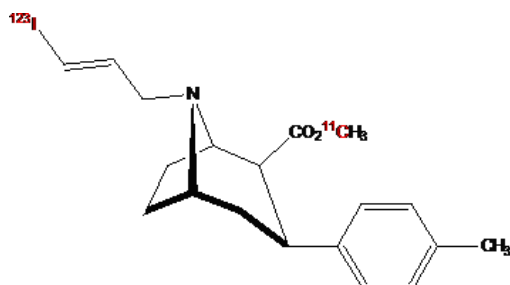
2. Le TRODAT-1



Le TRODAT-1 ou [2-[[2-[[[3-(4-chlorophenyl)-8-méthyl-8-azabicyclo[3.2.1]oct-2-yl]méthyl](2-mercaptoéthyl)amino]éthyl]amino]éthanéthiolato-(3-)-N₂,N₂',S₂,S₂']oxo-[1R-(exo-exo)], dérivé du tropane a la particularité de pouvoir être marqué par du ^{99m}Tc (Kung et al. 1996). Le [^{99m}Tc]-TRODAT-1 possède des caractéristiques intéressantes incluant une bonne affinité (K_d = 8.7 nM) et une bonne spécificité (Kung et al. 1997). Des études *in-vivo* chez le primate non-humain et chez l'homme ont permis de déterminer un rapport de fixation striatum/cervelet maximum de 2,8 à 60 min post injection moins bon que celui du FP-CIT et traduisant une fixation non-spécifique importante (Meegalla et al. 1997) ainsi qu'une affinité non-négligeable pour les transporteurs de la sérotonine. Il possède les mêmes caractéristiques cinétiques que le [123I]-FPCIT avec néanmoins un passage de la BHE moins important. Le [^{99m}Tc]-TRODAT-1 a permis de montrer une différence de fixation au niveau du striatum entre le sujet sain et le sujet parkinsonien avec une bonne sensibilité et spécificité (Mozley et al. 2000). Il a également montré son intérêt dans le diagnostic différentiel entre la MP et les autres syndromes parkinsoniens sans perte neuronale (d'origine vasculaire, Tremblement essentiel) (Wang et al. 2005) ou avec atteinte neuronale (AMS) (Lu et al. 2004). Cependant, le [^{99m}Tc]-TRODAT s'est révélé moins sensible et moins spécifique que le [123I]-FP-CIT dans le diagnostic différentiel entre une MP précoce et les syndromes parkinsoniens frustrés (Felicio

et al. 2010). Aujourd'hui, ce radioligand est surtout utilisé par des équipes asiatiques en recherche clinique dans l'exploration physiopathologique de la MP (Wu et al. 2011).

3. Le PE2I



Le PE2I ou (E)-N-(3-iodoprop-2-enyl)-2beta-carbomethoxy-3beta-(4-methylphenyl)nortropane, dérivé de la cocaïne présente une haute affinité ($K_d = 4$ nM) et spécificité pour les DAT, 10 fois supérieure à celle du FP-CIT et 300 fois supérieur à celle de la cocaïne (Emond et al. 1997 ; Guilloteau et al. 1998). Ce ligand, développé à Tours, peut être marqué par de l'iode-125 pour les études *in vitro* et par l'iode-123 pour les études en TEMP (Guilloteau et al. 1998). Des études de compétition avec du GBR12909 antagoniste des DAT et d'autres ligands des transporteurs de la sérotonine (paroxétine) et de la noradrénaline (nisoxétine), *ex-vivo* chez l'animal et sur des coupes de cerveaux humains *post-mortem*, ont permis de confirmer l'excellente spécificité du [125I]-PE2I vis-à-vis du DAT (Chalon et al. 1999). Les études *in-vivo* chez le primate non-humain ont montré qu'il pénètre rapidement et de façon importante dans le cerveau et se lie en grande proportion au niveau du striatum, le pic de radioactivité est à environ 30 min post-injection suivi par un plateau jusqu'à 80 min avec un rapport fixation striatum/cervelet égal à 9,8 à 60 min après injection (Guilloteau et al. 1998). La dosimétrie du [123I]-PE2I a été étudiée chez l'homme et s'est révélée semblable à celle des autres radioligands utilisés en TEMP (Kiukka et al. 1998). Le [123I]-PE2I a montré un grand intérêt dans le diagnostic de la MP à des stades pré-symptomatiques et chez des patients naïfs (Prunier et al. 2003) avec une sélectivité de 88% et une spécificité de 91% (Figure 30). De plus, son rapport signal/bruit s'est révélé meilleur que celui du [123I]-FP-CIT du à une meilleure spécificité pour le DAT par rapport aux SERT (Ziebell et al. 2010).

Le PE2I a également été marqué au carbone-11 (Dollé et al. 2000) pour des applications en TEP. La fixation du [11C]-PE2I sur les DAT a été évaluée chez le sujet sain (Halldin et al. 2003). Sa dosimétrie chez l'homme s'est révélée acceptable et similaire à d'autres radioligands (Ribeiro et al. 2007). Il a montré chez les patients atteints de la MP (Ribeiro et al. 2009) son efficacité dans la détection de la perte neuronale en général et en particulier chez les patients

atteints d'une MP précoce. La mesure de sa fixation sur les DAT s'est révélée reproductible et fiable (Hirvonen et al. 2008). Cet excellent radioligand, ne peut néanmoins être utilisé en routine clinique. En effet, en TEMP, il souffre de la concurrence du [123I]-FP-CIT qui a déjà une AMM, et en TEP, il souffre de ne pas être marqué par du fluor-18.

Aujourd'hui, le PE2I est surtout utilisé en recherche pré-clinique. Un certain nombre de travaux sur divers modèles animaux de la MP ont démontré le potentiel du PE2I pour le diagnostic précoce et l'évaluation du traitement de cette maladie (Emond et al. 2008). C'est pour cette raison et parce qu'il est facilement disponible au sein de notre laboratoire que nous avons choisi ce radioligand comme marqueur des DAT dans le cadre du travail expérimental de cette thèse.

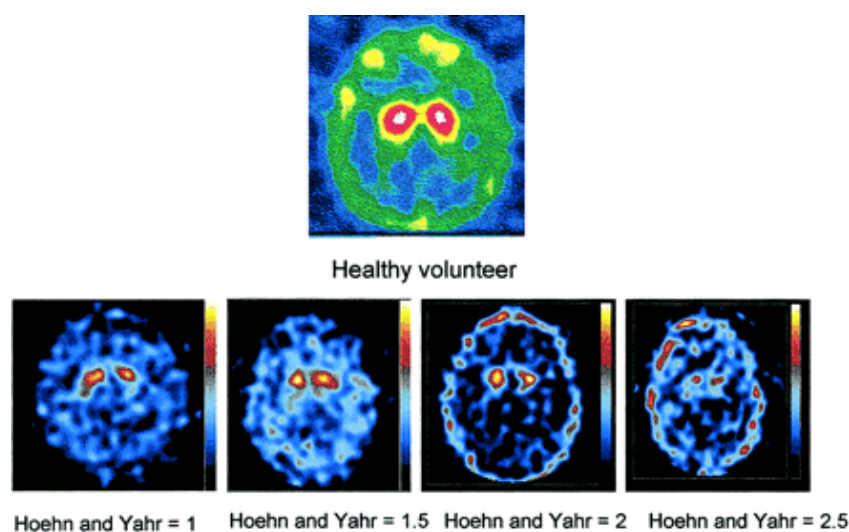
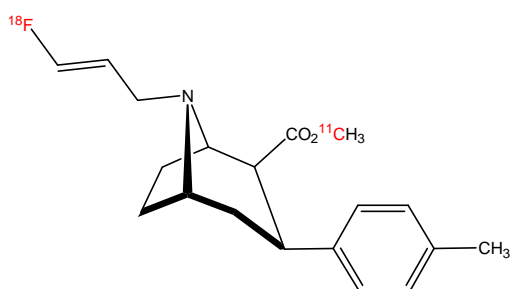


Figure 30 : Images TEMP avec du [123I]-PE2I. En haut, image d'un sujet volontaire sain. En bas, images de 4 sujets parkinsoniens selon leur score clinique Hoehn et Yahr. Ces images montrent une bonne corrélation entre le stade clinique et la fixation du [123I]-PE2I sur les DAT. D'après Prunier et al. 2003

4. Le LBT-999



Le LBT-999 ou (8-((E)-4-fluoro-but-2-enyl)-3beta-p-tolyl-8-aza-bicyclo[3.2.1]octane-2beta-carboxylic acid methyl ester) est un dérivé de la cocaïne directement issu de la structure du PE2I qui présente une haute affinité ($K_d = 9$ nM) et une excellente spécificité pour les DAT (Dollé et al. 2006). Ce composé, récemment développé à Tours, peut être marqué par du carbone-11 mais également par du fluor-18 pour des études TEP ce qui lui procure un avantage par rapport aux autres ligands du DAT (Dollé et al. 2006). Des études de compétition avec du PE2I et d'autres ligands des transporteurs de la sérotonine (paroxétine) et de la noradrenaline

(nisoxétine) *ex-vivo* chez l'animal et sur des coupes de cerveaux humains en *post-mortem* ont permis de confirmer l'excellente spécificité du LBT-999 vis-à-vis des DAT (Chalon et al. 2006). Sa biodistribution chez le primate non-humain *in-vivo* a clairement montré que le [11C]-LBT-999 pénètre rapidement et de façon importante dans le cerveau et se lie avec une forte proportion au niveau du striatum, le pic de radioactivité au niveau du striatum est à environ 40 min post-injection suivi d'un plateau, le rapport de fixation striatum/cervelet égal à 25, 60 min après injection (Dollé et al. 2006 ; Chalon et al. 2006). Ces études ont également montré une faible fixation non-spécifique, moins importante que celle obtenue avec d'autres radioligands comme le [123I]-FP-CIT (Chalon et al. 2006 ; Saba et al. 2007). La dosimétrie du [18F]-LBT-999 a été étudiée chez le primate non-humain et s'est révélée semblable à celle des autres radioligands fluorés (Varrone et al. 2011). Les études de quantification du [18F]-LBT-999 chez le primate non-humain ont montré que le [18F]-LBT-999 semble être un excellent radioligand approprié pour la quantification des DAT (Varrone et al. 2011) (Figure 31). Cependant, des études récentes ont montré l'existence d'un métabolisme plasmatique du [18F]-LBT-999 à prendre en compte dans la quantification en TEP (Peyronneau et al. 2012). Tous ces résultats pré-cliniques donnent beaucoup d'espoirs sur l'utilisation du [18F]-LBT-999 en TEP chez l'homme dans l'étude de pathologies neurodégénératives comme la MP.

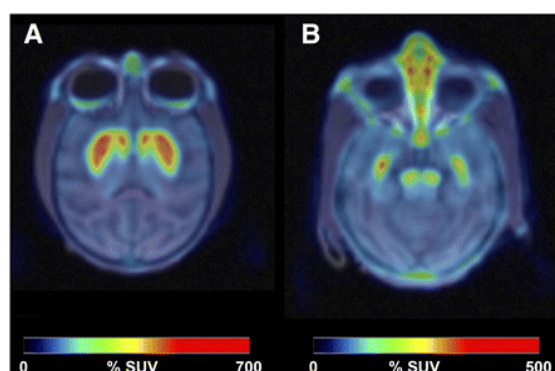


Figure 31 : Images TEP avec du [18F]-LBT999 chez le primate non-humain, d'après Varrone et al. 2011

Caractéristiques	123I-FP-CIT	99mTc-TRODAT	123I-PE2I	18F-LBT999
Affinité pour DAT (Kd)	28 nM (Okada et al. 1998)	8,7 nM (Kung et al. 1997)	4 nM (Guilloteau et al. 1998)	9,15 nM (Dollé et al. 2006)
Sélectivité DAT / SERT	2,8 : 1	< 2,8 : 1	29,4 : 1	> 29,4 : 1
Intervalle IV-pic de fixation striatale	2 – 3 heures	40 – 100 min	20 – 40 min	30 – 60 min
Temps d'élimination (washout)	Prolongé	Prolongé	Rapide	Prolongé
Dosimétrie CE / 185 MBq	4,3 mSv (Booij et al. 1998)	2,8 mSv (Mozley et al. 1998)	5,7 mSv (Ribeiro et al. 2007)	4,1 mSv (Varrone et al. 2011)
Rapport fixation striatum/cervelet	7,7 (Kiukka et al. 1995)	2,8 (Meegalla et al. 1997)	9,8 (Guilloteau et al. 1998)	25 (Chalon et al. 2006)

Tableau III : récapitulatif des caractéristiques principales des radioligands marqueurs du DAT

III. IMAGERIE MOLÉCULAIRE DE LA NEUROINFLAMMATION : CIBLES POTENTIELLES

L'imagerie moléculaire peut utiliser l'altération de plusieurs paramètres physiologiques consécutifs à la neuroinflammation pour la visualiser comme - une variation du débit sanguin cérébral ; - une modification du métabolisme glucidique ; - l'induction de l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) ; - l'activation de la microglie.

Bien que les modifications du débit sanguin cérébral et du métabolisme glucidique aient été exploitées avec succès pour détecter la neuroinflammation cérébrale par la technique TEMP et TEP (Schroeter et al. 2009 ; Drake et al. 2011), il s'agit de paramètres qui ne sont pas spécifiques du processus inflammatoire. Par ailleurs, l'augmentation de la consommation de glucose par les cellules inflammatoires peut être compensée par la perte neuronale, qui mène à une diminution du métabolisme glucidique. Par conséquent, les atteintes neurodégénératives avec une neuroinflammation chronique, comme dans la MP, s'accompagnent d'un hypométabolisme glucidique, dû à la destruction du tissu cérébral (Bohnen et al. 2011). Contrairement au débit sanguin cérébral et au métabolisme glucidique, l'induction de l'enzyme COX-2 et l'activation de la microglie sont spécifiques de la neuroinflammation pour lesquels des radioligands sont en développement.

A. La Cyclooxygénase-2 (COX-2)

Le sous-type 2 de la cyclooxygénase (COX-2) est très faiblement exprimé dans le cerveau sain, mais son expression augmente de façon très importante suite à un stimulus inflammatoire, en particulier dans les cellules de la microglie activée (Tzeng et al. 2005). La surexpression de la COX-2 dans la MP s'accompagne d'une augmentation du taux de prostaglandine E2 impliquée dans la neuroinflammation en induisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et en provoquant ainsi la mort neuronale par excitotoxicité (Ikeda-Matsuo et al. 2010). Par ailleurs, les radicaux libres libérés lors de la neuroinflammation augmente l'expression des gènes codant pour la COX-2 qui amplifie l'inflammation à son tour. L'imagerie de la COX-2 peut donc permettre d'explorer le processus neuroinflammatoire (de Vries, 2006).

Le celecoxib, inhibiteur sélectif de la COX-2 a été marqué au ^{99m}Tc (Yang et al. 2004). Ce radioligand a montré une accumulation dans les cellules exprimant fortement la COX-2, mais sa spécificité de liaison n'a pas été démontrée par des expériences de compétition avec du celecoxib non marqué. Le celecoxib a récemment été marqué au carbone-11 ainsi que son métabolite principal le [11C]-62807 (Takashima-Hirano et al. 2011). Cependant, bien qu'ayant une biodisponibilité intéressante, le [11C]-62807 n'a été évalué qu'en oncologie.

Deux autres inhibiteurs sélectifs de la COX-2 ont été marqués par du carbone-11, le [11C]-etorixib et le [11C]-rofecoxib (Majo et al. 2005). Néanmoins, l'évaluation de ces molécules pour l'imagerie TEP dans les modèles animaux de neuroinflammation s'est révélée décevante (de Vries et al. 2008). Récemment, un nouvel inhibiteur sélectif de la COX-2, le lumiracoxib (FIMA) marqué par l'iode-125 a été évalué *in-vitro* sur des cultures de cellules macrophagiques surexprimant la COX-2 (Kuge et al. 2009). Les premiers résultats encourageant doivent être confirmés *in-vivo* dans des modèles animaux de neuroinflammation.

B. La protéine de translocation 18kDa (TSPO)

La détection de la microglie activée est principalement restreinte à des techniques d'anatomopathologie sur du tissu cérébral en *post-mortem*. Des méthodes d'imagerie comme le scanner ou l'IRM ne sont pas assez sensibles pour détecter les modifications fonctionnelles comme l'activation microgliale. Le phénotype activé des cellules microgliales exprime intensément une protéine mitochondriale, la protéine translocatrice (TSPO). Elle représente donc une cible intéressante pour la visualisation et la quantification de l'activation microgliale et par conséquent de la neuroinflammation en imagerie moléculaire TEMP ou TEP.

1. Découverte et caractérisation pharmacologique de la TSPO

Chez l'homme, les récepteurs aux benzodiazépines existent sous 2 formes : les récepteurs centraux aux benzodiazépines (CBR) et les récepteurs périphériques aux benzodiazépines (PBR). Les CBR sont localisés exclusivement dans les neurones GABAergiques où ils participent à la régulation de leur activité (Johnston et al. 2006). L'effet thérapeutique des benzodiazépines (BDZ) est lié à leur fixation sur les CBR. Paradoxalement, c'est l'utilisation de tissus périphériques comme témoins de la liaison non-spécifique du diazépam, qui a permis la découverte d'une seconde classe de récepteurs aux benzodiazépines, les PBR (Braestrup et

Squires, 1977). Plus récemment, le terme de protéine translocatrice (TSPO) a été proposé (Papadopoulos et al. 2006), en référence au rôle joué par cette protéine dans le transport du cholestérol et de la porphyrine, au niveau de la membrane mitochondriale externe.

Les principaux ligands de la TSPO et CBR présentent des affinités différentes pour les deux types de récepteurs. Le diazepam présente une forte affinité à la fois pour la TSPO et les CBR. Les autres BDZ comme le Ro5-4864 et le clonazepam possèdent une forte affinité pour les CBR et une faible affinité pour la TSPO. Plusieurs années après la caractérisation pharmacologique des PBR par les BDZ, une série de composés ayant une affinité très supérieure aux BDZ, les carboxamides d'isoquinolines a été décrite (le Fur et al. 1983). Parmi ces composés, le PK11195 est le ligand le plus couramment utilisé en recherche (Tableau IV).

	Type périphérique (TSPO)	Type central (CBR)
Distribution tissulaire	Ubiquitaire (tissus périphériques et cellules gliales)	Neuronale
Localisation cellulaire	Membrane mitochondriale externe (membrane plasmique)	Membrane plasmique
Ligands synthétiques	PK11195, benzodiazépines (diazepam, Ro5-4864)	Benzodiazépines (diazepam, clonazepam)
Ligands endogènes	Diazepam Binding Inhibitor	Diazepam Binding Inhibitor
Composition moléculaire	Protéine 18 kDa, VDAC, ANT	Hétérogène (sous-unités α et γ du récepteur au GABA)
Mécanisme effecteur	Transport de cholestérol / prolifération cellulaire / physiologie mitochondriale	Règle le flux de Cl ⁻ en modulant la fixation de GABA sur son récepteur

Tableau IV : Principales caractéristiques des récepteurs des benzodiazépines de type central et périphérique, d'après Zisterer et Williams, 1997

2. Structure et Distribution de la TSPO

La TSPO est une protéine de 18 kDa constituée de 169 acides aminés organisés en 5 hélices α transmembranaires dont la localisation principale est la membrane externe de la mitochondrie (Korkhov et al. 2010). L'analyse de fractions mitochondriales a permis de démontrer qu'un canal anionique voltage dépendant (VDAC) de 32 kDa, impliqué dans le transport d'ions et de métabolites, ainsi qu'une adénine nucléotide translocase (ANT) de 30 kDa, sont associés à la TSPO. D'autres protéines associées aux PBR, PRAX-1 et PAP7, ont été décrites et agiraient comme adaptateurs conformationnels permettant de recruter un large spectre de ligands (Papadopoulos 2006). (Figure 32) La TSPO est ubiquitaire dans les tissus périphériques et principalement localisée dans les mitochondries (Papadopoulos, 1993). Bien qu'elle soit présente dans pratiquement tous les tissus, son taux d'expression varie d'un tissu à l'autre

(Hirvonen et al. 2010). Les glandes endocrines (surrénales, testicules) sont particulièrement riches en TSPO, cependant sa distribution intra-tissulaire n'est pas homogène. Ainsi, la TSPO représente un site de fixation alternatif aux BDZ, par lequel ils pourraient exercer des actions pharmacologiques à l'origine de leurs effets indésirables (Rupprecht et al. 2009).

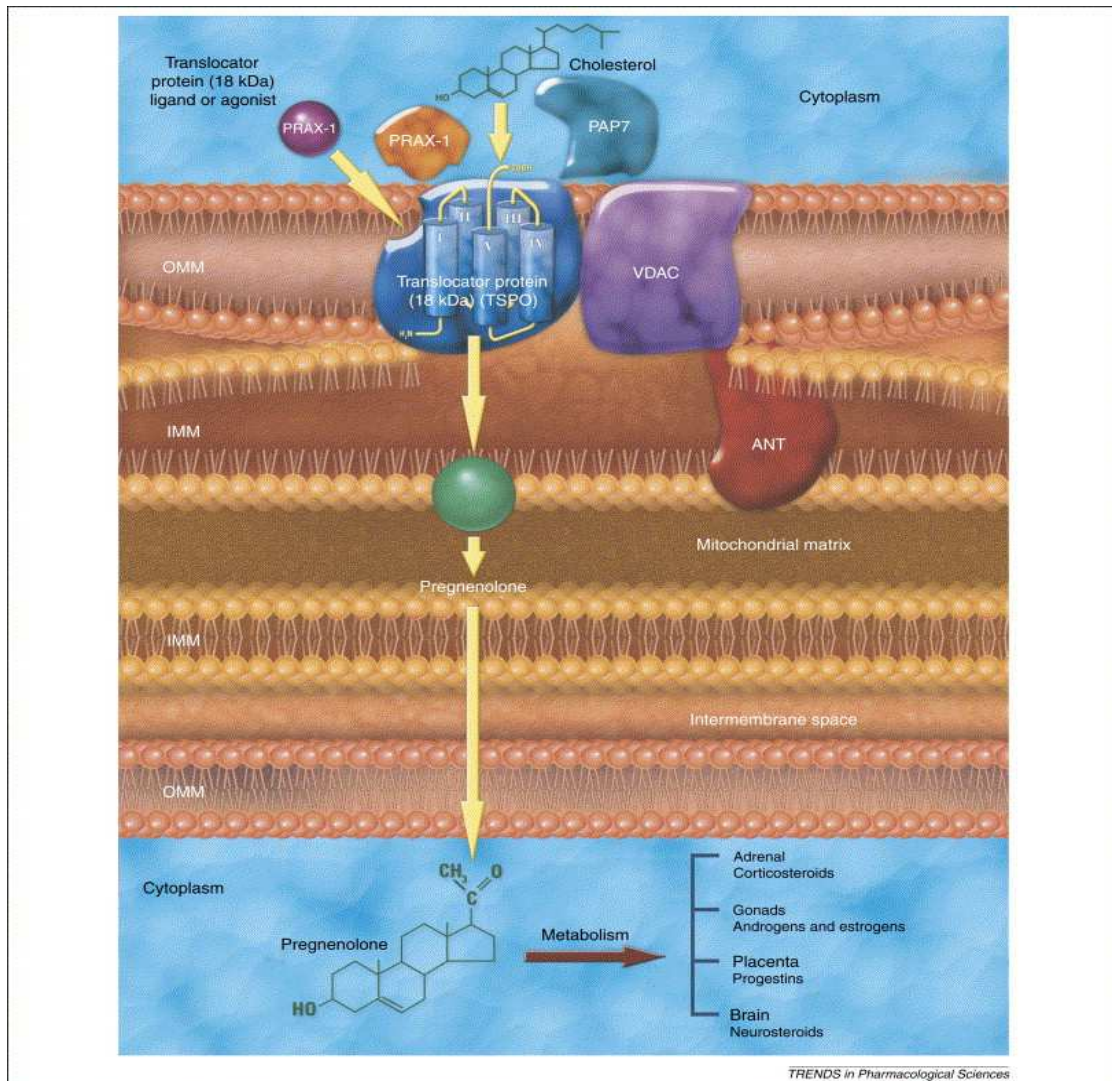


Figure 32 : Structure du complexe multimérique mitochondrial de la protéine translocatrice (TSPO) et son rôle dans la synthèse des stéroïdes, d'après Papadopoulos et al. 2006.

3. Fonctions de la TSPO

De nombreux rôles ont été attribués à la TSPO (Papadopoulos, 1993). Cette diversité de fonction pourrait être liée à des interactions avec d'autres protéines mitochondriales.

L'implication de la TSPO dans le transport du cholestérol de la membrane externe vers l'intérieur de la mitochondrie, étape limitante dans la biosynthèse des stéroïdes a été étudiée (Jamin et al. 2005). Le mécanisme de transport du cholestérol n'est pas encore clairement

élucidé mais impliquerait une activation du récepteur par des ligands spécifiques comme le DBI (diazepam binding inhibitor), ligand endogène de la TSPO (Veenman et Gavish 2012).

La localisation de la TSPO dans la membrane externe des mitochondries suggère un rôle potentiel dans la phosphorylation oxydative et la respiration mitochondriale (Batarseh et Papadopoulos 2010). L'association de la TSPO et du VDAC au sein du même complexe protéique pourrait expliquer le rôle de la TSPO sur la respiration mitochondriale en intervenant dans le transport de métabolites vers la matrice mitochondriale (Veenman et al. 2008)

Parmi les protéines décrites pour interagir avec la TSPO, le VDAC semble particulièrement important dans l'homéostasie calcique et pourrait être la clé de l'implication de la TSPO dans des processus de régulation de l'apoptose (Shoshan-Barmatz et al. 2003 ; Veenman et al. 2008).

4. Expression de la TSPO cerveau sain / neuroinflammation

En l'absence de pathologie inflammatoire, la TSPO est essentiellement localisée dans les cellules qui tapissent les ventricules cérébraux, dans le bulbe olfactif et le plexus choroïde. Au niveau central, la TSPO semble être impliquée dans la synthèse des neuro-stéroïdes (Papadopoulos et al. 2006), et dans la régulation de l'activation microgliale (Veiga et al. 2007).

L'expression de la TSPO en réponse à une atteinte cérébrale est augmentée dans les cellules microgliales et les astrocytes (Venetti et al. 2006 ; Chen et Guilarte 2008). Il a été montré que la surexpression de la TSPO lors d'atteintes neurologiques était essentiellement, voire exclusivement due à la présence de cellules de la microgale activée, et qu'elle caractérisait bien la transition de la forme quiescente à la forme activée des cellules (Cosenza-Nashat et al. 2009). Le mécanisme potentiel de la surexpression de la TSPO n'est pas encore clairement défini. Il a été montré que la sécrétion de cytokines lors de l'activation microgliale augmente la densité de la TSPO dans différentes populations cellulaires (Trincavelli et al. 2002). Il a également été suggéré que les changements morphologiques des cellules microgliales soient à l'origine des modifications structurales des mitochondries (Banati et al. 2004). Ainsi, l'augmentation de la taille des cellules dans leur forme amiboïde pourrait entraîner une augmentation du nombre de mitochondries par cellule microgliale, sans que le nombre de TSPO par mitochondrie soit modifié. A l'opposé, il a été suggéré que ce soit la densité en TSPO par mitochondrie qui augmente lors de l'activation microgliale. Aujourd'hui, l'hypothèse dominante est une augmentation à la fois du nombre de mitochondries dans la cellule microgliale et du nombre de TSPO par mitochondrie (Veiga et al. 2007).

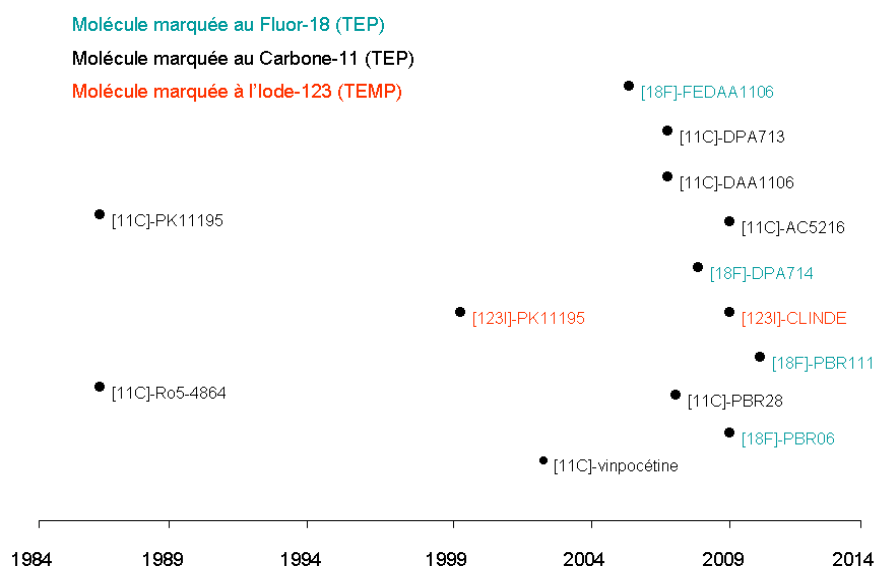
5. Variabilité interindividuelle de l'expression de la TSPO

Récemment, il a été découvert l'existence d'une variabilité interindividuelle de l'expression de la TSPO. Deux études ayant pour but la caractérisation chez l'homme *in-vivo* d'un nouveau radioligand de la TSPO, le [11C]-PBR28, ont observé une baisse très importante de fixation dans les organes périphériques chez certains sujets, comme-ci ces derniers n'exprimaient pas de TSPO (Brown et al. 2007 ; Fujita et al. 2008). Ces premières observations ont permis d'introduire la notion de sujets « binder » et « non-binder » à la TSPO. Peu après, d'autres études ont montré que cette variabilité n'était pas due à un manque de TSPO chez les sujets « non-binder » mais à l'existence de différences de fixation à la TSPO entre les différents radioligands existants chez les sujets « non-binder » (Owen et al. 2011). Par exemple, le [11C]-PBR28 possède une affinité à la TSPO 10 fois inférieure à celle du [11C]-PK11195 chez les « non-binder » (Keisl et al. 2010). D'autres études ont permis d'affiner la caractérisation de cette variabilité et de définir trois groupes phénotypiques de liaison à la TSPO : Les binder de haute affinité (HAB), les binder d'affinité mixte (MAB) et les binder de faible affinité (LAB) (Owen et al. 2011). Elles ont également permis de classer les différents radioligands existants selon leur affinité à la TSPO vis-à-vis des trois phénotypes. Ainsi 3 populations de radioligands ont été définies, ceux ayant une grande différence existe dans l'affinité entre les HAB et LAB (PBR28), ceux ayant une différence d'affinité intermédiaire entre les HAB et LAB (DAA1106) et ceux ayant une différence d'affinité moindre mais réelle entre les HAB et LAB (DPA713 ; PBR111). Dans la population générale, 70% des sujets sont HAB ou MAB et 30% sont LAB (Owen et al. 2011). Très récemment, la différence d'affinité des radioligands a été expliquée par l'existence d'un polymorphisme génétique (rs6971) situé dans l'exon 4 du gène codant pour la TSPO, (Owen et al. 2012). La découverte du polymorphisme rs6971 permet d'envisager un test génétique préalable à l'imagerie moléculaire, afin de connaître le profil des sujets et ainsi avoir une interprétation quantitative exacte de fixation des radioligands sur la TSPO.

C. Radioligands pour l'imagerie moléculaire de la TSPO

Les premières études en imagerie médicale ont été menée avec le [11C]-PK11195 en TEP il y a plus de 25 ans (Charboneau et al. 1986). Ces 10 dernières années l'engouement pour cette cible moléculaire a entraîné l'émergence d'une dizaine de nouveaux radioligands spécifiques potentiellement utilisables en imagerie moléculaire TEP et TEMP (Figure 33).

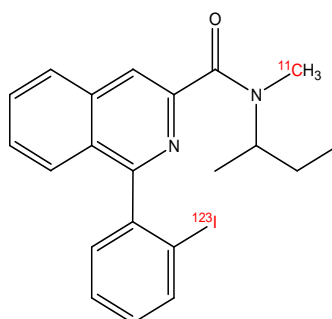
Figure 33 : Echelle chronologique de l'utilisation des radioligands marqueurs spécifiques de la TSPO utilisables en imagerie moléculaire TEMP ou TEP (selon l'année de la première injection à l'homme). Inspirée de la thèse de science de Nicolas Arlicot, 2010.



A l'heure actuelle, quatre classes chimiques principales de composés de haute affinité pour la TSPO peuvent être distinguées (Tableau VI) :

- Les dérivés carboxamides d'isoquinoline, dont le représentant est le PK11195. Il peut être marqué par du carbone-11
- Les dérivés phénoxyphényl-acétamide, dont les chefs de file sont le DAA1106 marqué au carbone-11 et le FEDAA1106 marqué au fluor-18, et plus récemment le PBR28 marqué au carbone-11 et le PBR06 marqué au fluor-18.
- Les dérivés pyrazolopyrimidine, dont les principaux représentants sont le DPA-713 et le DPA-714, respectivement marqués au carbone-11 et au fluor-18.
- Les dérivés imidazopyridine acétamide, comme le PBR111 marqué au fluor-18, et le CLINDE composé marqué à l'iode-123.

1. Les dérivés carboxamides d'isoquinoline : Le PK-11195



Le [11C]-PK11195 a été utilisé en imagerie TEP pour explorer la neuroinflammation dans diverses pathologies du SNC (Tableau VI). Sa distribution a montré une bonne corrélation avec les aires cérébrales atteintes spécifiquement dans chacune de ces pathologies (Figure 34).

Dans la MP, l'activation de la microglie a pu être caractérisée *in-vivo* à l'aide du [11C]-PK11195. Il a été trouvé une corrélation positive entre la fixation du [11C]-PK11195 et la sévérité de l'atteinte motrice chez des patients atteints d'une MP débutante (Ouchi et al. 2005). En revanche, chez des patients atteints d'une MP à un stade plus évolué, l'intensité de l'activation microgliale n'est pas forcément fonction de la sévérité de la maladie (Gerhard et al. 2006). Ces deux résultats semblent refléter l'évolution de la neuroinflammation au cours de la MP qui se traduirait par un pic correspondant au stade débutant voire pré-clinique, puis un plateau d'activation correspondant à une activation microgliale chronique. Récemment, le [11C]-PK11195 a été utilisé dans l'évaluation de stratégie thérapeutique anti-inflammatoire, comme l'inhibition de la COX-2 par du célécoxib, chez des patients parkinsoniens (Bartels et al. 2010). Le [11C]-PK11195 a également été utilisé pour étudier la neuroinflammation dans d'autres syndromes extra-pyramidaux neurodégénératifs apparentés à la MP comme l'AMS (Gerhard et al. 2003) ou la PSP (Gerhard et al. 2006).

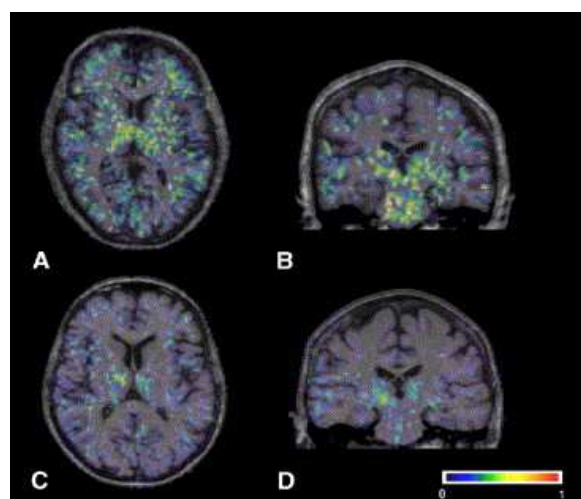


Figure 34 : Images de coupes transversales et coronales avec du [11C]-PK11195. Chez le patient atteint de la MP (A et B), la fixation est augmentée dans les noyaux gris centraux et les régions frontales par rapport au sujet témoin sain (C et D). D'après Gerhard et al. 2006

Bien que le [11C]-PK11195 ait été utilisé avec succès pour visualiser la neuroinflammation dans diverses pathologies cérébrales, il présente plusieurs inconvénients qui empêchent son utilisation en routine clinique : - sa lipophilie (Lockhart et al. 2003), et un rapport « signal spécifique de la TSPO / signal non-spécifique » faible (Kropholler et al. 2005) ; - un métabolisme hépatique aboutissant à la formation de dérivé radiomarqués suffisamment lipophiles pour passer la BHE et qui peuvent perturber le signal mesuré (Greuter et al. 2005) ; - une captation cérébrale chez l'homme relativement faible (Debruyne et al. 2002), en raison d'une fixation aux protéines plasmatiques élevée et variable d'un individu à l'autre.

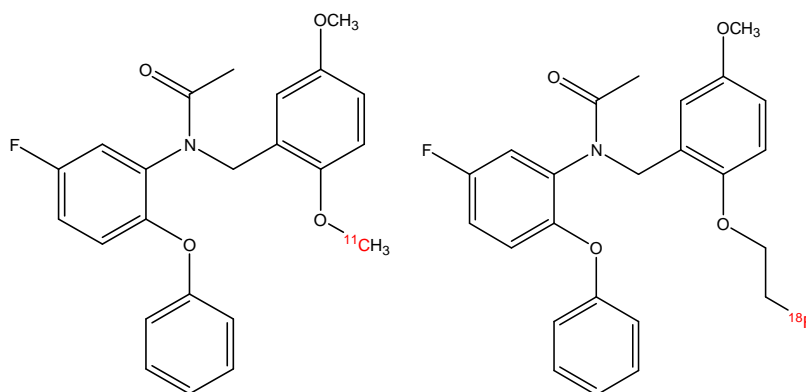
Tous ces paramètres rendent difficiles une quantification précise des variations de densité en TSPO chez l'homme à l'aide du [11C]-PK11195 (Tomasi et al. 2009).

Un autre inconvénient majeur du PK11195 vient du fait que l'on ne dispose pas d'analogue radiomarqué au fluor-18. En effet, la période physique du carbone-11 (20 min) ne permet pas

son utilisation en routine clinique. Le fluor-18 (période de 110 min) permet d'augmenter le temps d'acquisition des images et ainsi de mesurer plus précisément certains paramètres pharmacodynamiques comme la clairance effective ou la fixation non-spécifique des radioligands. C'est pour palier ce manque qu'un dérivé fluoré du PK11195 a été récemment synthétisé (Yu et al. 2008) et est en cours d'évaluation *in-vivo* chez le primate non-humain. Le développement de meilleurs radiotraceurs est donc nécessaire pour permettre une quantification précise et fiable de la neuroinflammation et des effets de traitement anti-inflammatoires chez les patients (Bartels et al. 2010).

2. Les dérivés phénoxyphényl-acétamide

a) Le DAA1106 et FEDAA1106



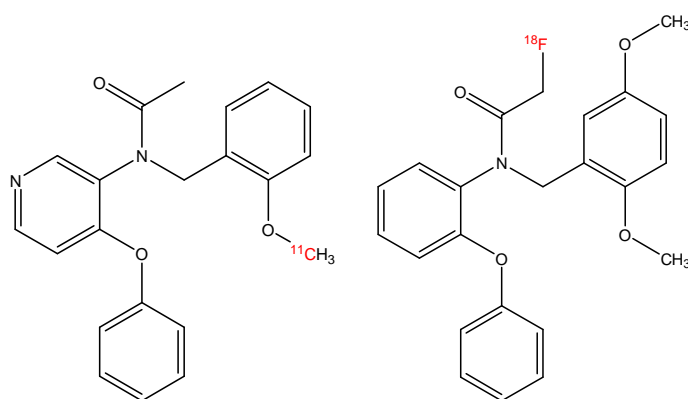
Le DAA1106, ou N-(2,5-diméthoxybenzyl)-N-(5-fluoro-2-phénoxyphényl)acétamide, antagoniste de la TSPO, possède une bonne sélectivité et une meilleure affinité que le PK11195. Le [11C]-DAA1106 a montré une fixation supérieure à celle du [11C]-PK11195 chez plusieurs modèles animaux (Zhang et al. 2003 ; Maeda et al. 2004). Il a également montré qu'il pouvait détecter l'activation microgliale dans différents modèles animaux de la MP (Venneti et al. 2007). Il a été évalué sur des cerveaux humains en *post-mortem* atteints de différentes maladies neurologiques comme l'AVC, la Maladie d'Alzheimer et la Sclérose latérale amyotrophique, (Venneti et al. 2008 ; Yasuno et al. 2008). Ces études ont montré une fixation significativement plus élevée dans les cerveaux de patients atteints que chez les individus sains, reflétant une activation microgliale. Le principal inconvénient du [11C]-DAA1106 est son métabolisme plasmatique intense et rapide.

Le dérivé fluoro-éthyl du DAA1106 (FEDAA1106) permet un marquage au fluor-18 (Zhang et al. 2004). Ce composé possède une bonne affinité pour la TSPO. Le [18F]-FEDAA1106 subit un fort métabolisme plasmatique mais moindre que le [11C]-DAA1106. Sa capacité à visualiser

la microglie activée a été validée chez l'homme sain dans des études de quantification de fixation sur la TSPO (Fujimura et al. 2006) et de dosimétrie (Takano et al. 2011).

Ces deux radioligands ont une fixation cérébrale très rapide et quasi irréversible à l'échelle de la durée d'un examen TEP, ce qui complique la quantification du signal recueilli car on mesure d'avantage leur distribution cérébrale que leur liaison spécifique à la TSPO (Briard et al. 2008).

b) Le PBR28 et PBR06



Le PBR28 ou N-acétyl-N-(2-méthoxybenzyl)-2-phénoxy-5-pyridinamine, analogue proche du DAA1106, possède une grande affinité pour la TSPO et un bon passage de la BHE (Imaizumi et al. 2008). Le [¹¹C]-PBR28 a permis de visualiser l'activation microgliale dans des modèles d'ischémie cérébrale chez le rat (Imaizumi et al. 2007) et chez des patients atteints de scléroses multiples (Oh et al. 2011) ou épileptiques (Hirvonen et al. 2012) (Figure 35). Par ailleurs, c'est avec ce radioligand que la variabilité d'expression inter-individuelle de la TSPO due à un polymorphisme génétique de la protéine a été découverte et étudiée (Keisl et al. 2010 ; Owen et al. 2011). Néanmoins, il a été montré que le [¹¹C]-PBR28 possède un métabolisme cérébral non négligeable et qu'une part significative du signal détecté provient de métabolites radiomarqués, ce qui limite la quantification de la TSPO en TEP (Briard et al. 2008).

Le PBR06, ou N-fluoroacétyl-N-(2,5-diméthoxybenzyl)-2-phénoxyaniline est un dérivé fluoré du DAA1106 (Imaizumi et al. 2007 ; Fujimura et al. 2009). Il a été évalué chez le sujet sain humain avec des études de biodistribution et de dosimétrie (Fujimura et al. 2010). Cependant, à ce jour il n'a pas encore été évalué *in vivo* dans des modèles animaux de neuroinflammation ou chez l'homme atteint de maladies neuroinflammatoires. Le [¹⁸F]-PBR06 possède les mêmes caractéristiques que le [¹¹C]-PBR28 en termes de précision, de sensibilité de fixation à la TSPO mais également concernant le métabolisme cérébral important et l'accumulation de radiometabolites (Dickstein et al. 2011).

Les dérivés phénoxyaryl-acétamide présentent donc une forte affinité pour la TSPO avec une fixation cérébrale non spécifique diminuée. Cependant, ces composés présentent un certain nombre d'inconvénients pour la quantification en imagerie TEP (fixation spécifique

irréversible, fixation non spécifique variable, métabolisme plasmatique important), qui n'ont pas été encore résolus par le développement de nouveaux dérivés.

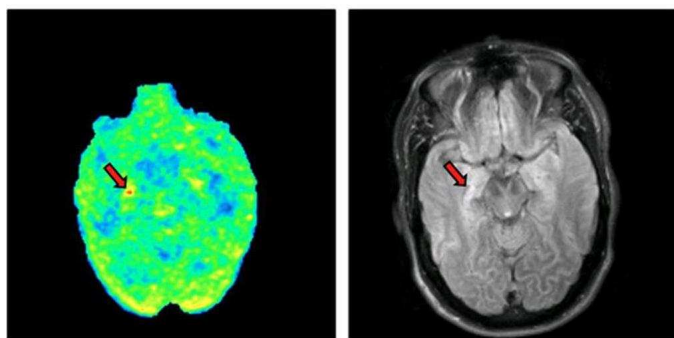
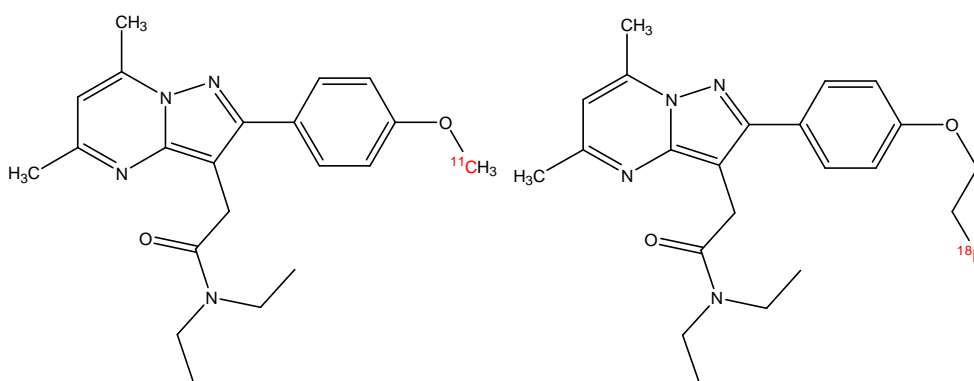


Figure 35 : Imagerie TEP avec du [11C]-PBR28 de coupes axiales de cerveau chez un sujet atteint d'une Epilepsie du lobe temporal en ictal. Nous observons une fixation accrue du radioligand au niveau du foyer épileptogène compatible avec l'augmentation de l'expression de la TSPO. D'après Hirvonen et al. 2012

3. Les dérivés pyrazolopyrimidine : DPA-713 et DPA-714



Le DPA-713 ou N,N-diéthyl-2-[2-(4-méthoxyphényl)-5,7-diméthyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]-acétamide présente un caractère lipophile plus faible que le PK11195, et une bonne affinité *in vitro* pour la TSPO (James et al. 2005). Chez le primate non-humain, une pré-injection de PK11195 bloque environ 70% de la fixation cérébrale du [11C]-DPA-713, indiquant une bonne spécificité de liaison sur la TSPO. La cinétique relativement lente du [11C]-DPA-713 avec un pic de fixation maximale 20 min post-injection, autorise une quantification précise du signal mesuré. Il a été évalué dans un modèle excitotoxique d'inflammation aiguë chez le rat, où il a montré son aptitude à visualiser la microglie activée avec un signal spécifique de la TSPO, un potentiel de liaison supérieur et une fixation non spécifique beaucoup plus faible que ceux du [11C]-PK11195 (Boutin et al. 2007). Il a également été comparé au [11C]-PK11195 dans un modèle d'encéphalite virale chez le rat montrant une fixation non spécifique plus faible et donc une meilleure sensibilité dans la détection de la neuroinflammation (Doorduyn et al. 2009). La biodistribution et la dosimétrie du [11C]-DPA-713 ont été évaluées chez l'homme sain montrant une bonne stabilité permettant une quantification précise de une fixation cérébrale spécifique (Endres et al. 2009 ; 2012).

Le DPA-714 ou N,N-diéthyl-2-(2-[4-(2-fluoroéthoxy)phényl]-5,7-diméthyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)-acétamide, a l'avantage de pouvoir être marqué au fluo-18. Il possède un caractère lipophile modéré identique au DPA-713, il présente une bonne affinité et une bonne sélectivité *in-vitro* pour la TSPO (James et al. 2008). Le [18F]-DPA714 a été évalué dans plusieurs modèles de lésion excitotoxique et d'ischémie cérébrale chez le rat où il a permis de visualiser la microglie activée par liaison spécifique à la TSPO (James et al. 2008 ; Martin et al. 2010). Des tests de compétition par pré-traitement avec du PK11195 ou de DPA-714 chez le primate non-humain ont démontré sa spécificité (James et al. 2008). Le [18F]-DPA-714 a également été évalué en comparaison avec le [11C]-PK11195 dans un modèle de lésion excitotoxique (Chauveau et al. 2009) et un modèle d'encéphalite hépétique (Doorduyn et al. 2009). Ces deux études ont montré un meilleur rapport signal/bruit avec le [18F]-DPA714. Récemment, la biodistribution et la dosimétrie du [18F]-DPA-714 ont été évaluées chez l'homme sain ce qui a permis de montrer une bonne stabilité du radioligand (Arlicot et al. 2011). Ces premiers résultats soulèvent un réel intérêt pour le [18F]-DPA-714 comme radioligand pour l'imagerie TEP de la neuroinflammation. Le [18F]-DPA-714 est l'une des molécules les plus prometteuses pour l'imagerie TEP de la neuroinflammation, actuellement il est évalué chez des sujets atteints de Sclérose latérale amyotrophique (Figure 36). Sa validation chez l'homme requiert encore des travaux complémentaires de modélisation cinétique et de quantification.

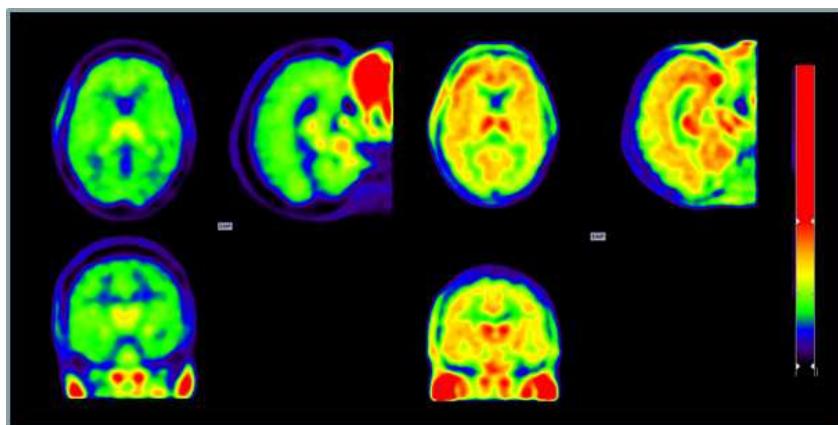
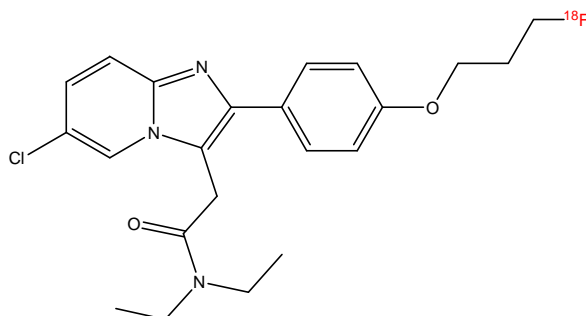


Figure 36 : Images TEP avec du 18F-DPA714. A gauche, image chez un sujet contrôle, à droite image chez un sujet atteint de SLA. Service de Médecine nucléaire du CHRU de Tours (Pr Santiago-Ribeiro)

4. Les dérivés imidazopyridine acétamide

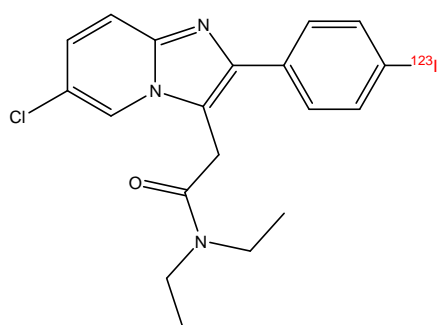
Les composés de cette famille dérivent de l'alpidem, anxiolytique qui se lie au CBR et à la TSPO avec une affinité nanomolaire. Des travaux de pharmacomodulation de la structure chimique de l'alpidem ont permis de développer des ligands qui présentent une sélectivité augmentée pour la TSPO par rapport au CBR (Trapani et al. 1997).

a) *Le PBR111*



Le PBR111 ou fluoropropoxy-2-(6-chloro-2-phényl)imidazol[1,2-a]pyridin-3-yl)-N,N-diéthylacétamide, possède une bonne affinité pour la TSPO, une bonne sélectivité par rapport au CBR et un caractère lipophile modéré (Fookes et al. 2008). La fixation du [18F]-PBR111 est spécifique de la TSPO car bloquée par une pré-injection de PK11195 et de PBR111 (Van Camp et al. 2010). Ce radioligand a été évalué dans un modèle de lésion excitotoxique chez le rat en comparaison avec le [11C]-PK11195 (Van Camp et al. 2010), il a permis de visualiser la microglie activée avec une meilleure spécificité. En outre, il a montré une très bonne stabilité *in-vivo* chez le primate non-humain (Katsifis et al. 2011). Par ailleurs, il a été montré que le [18F]-PBR111 était moins sensible aux variations interindividuelles de l'expression de la TSPO que d'autres radioligands (Owen et al. 2011). Enfin, la dosimétrie de ce radioligand a été évalué chez le primate non-humain et s'est avérée favorable (Verschuer et al. 2012). Ainsi, le [18F]-PBR111 semble être un composé de grand intérêt, son avantage le plus sérieux étant de pouvoir être marqué au 18F. Sa validation chez l'homme est d'ailleurs en cours.

b) *Le CLINDE*



Le CLINDE ou 6-chloro-2-(4'iodophényl)-3-(N,N-diéthyl)-imidazol[1,2-a]pyridine-3-acétamide à la particularité d'être marqué par l'iode-125 pour des études *in vitro* et *ex vivo* et par l'iode-123 pour les études en imagerie TEMP (Katsifis et al. 2000). Il possède une haute affinité pour la TSPO une bonne sélectivité par rapport au CBR et un caractère lipophile

modéré (Mattner et al. 2008). Un prétraitement au PK11195 ou CLINDE bloque la fixation du [123I]-CLINDE à hauteur de 70% montrant une grande spécificité pour la TSPO (Mattner et al. 2008). Ce radioligand a été évalué *ex-vivo* dans des modèles d'excitotoxicité chez le rat et d'ischémie cérébrale chez la souris (Arlicot et al. 2008 et 2010). Il a également été évalué *in vivo* dans un modèle de neuroinflammation induit par la cuprizone chez la souris (Mattner et al. 2011). Dans ces études, il a permis de visualiser la microglie activée avec une grande spécificité pour la TSPO. La biodistribution du [123I]-CLINDE indique une fixation préférentielle dans les organes périphériques exprimant fortement la TSPO et dans le SNC au niveau des bulbes olfactifs (Mattner et al. 2008 et 2011). Par ailleurs, le CLINDE présente une excellente stabilité, il ne subit pas de métabolisme cérébral (Mattner et al. 2008). Ainsi, le [123I]-CLINDE semble être un composé de grand intérêt. Sa validation chez l'homme est d'ailleurs en cours.

Le CLINDE a été développé par l'ANSTO centre de recherche australien en partenariat avec l'université de Tours. C'est parce qu'il présente des caractéristiques intéressantes et qu'il est disponible au sein de notre laboratoire que ce radioligand a été choisi comme marqueur de la TSPO dans le cadre du travail expérimental de cette thèse.

Caractéristiques	11C-PK11195	11C-PBR28	18F-DPA714	18F-PBR111	123I-CLINDE
Affinité pour TSPO cortex (Kd)	1,4 nM (Le Fur et al. 1983)	3,4 nM (groupe HAB) (Owen et al. 2011)	7 nM (James et al. 2008)	3,7 nM (Fookes et al. 2008)	1,7 nM (Mattner et al. 2007)
Sélectivité TSPO/CBR	> 1000 : 1	> 1000 : 1	> 1000 : 1	250 : 1	200 : 1
Intervalle IV-pic de fixation / Washout	5-10 min / 30-40 min	20-40 min / 90-120 min	5 min / 30-40 min	5 min / 60 min	5-10 min / Prolongé
Métabolisme (plasmatique et/ou cerebral)	Important (plasmatique)	Important (cerebral)	Faible	Important (plasmatique)	Faible
Dosimétrie CE / 185 MBq	8,8 mSv (Hirvonen et al. 2010)	12,2 mSv (Brown et al. 2007)	3,2 mSv (Arlicot et al. 2011)	3,9 mSv (Verschuer et al. 2012)	-
Potentiel de liaison	1,6 +/- 0,5 (Jucaite et al. 2012)	4,98 +/- 0,6 (Imaizumi et al. 2008)	3,1 +/- 0,7 (James et al. 2008)	2,5 +/- 0,7 (Fookes et al. 2008)	-
Rapport signal spécifique/non spécifique	Faible	Faible	Important	Important	Important

Tableau V : récapitulatif des caractéristiques principales des radioligands marqueurs de la TSPO

Classe chimique	Radio-ligand	Radio-synthèse	Biodistribution ; Imagerie in-vivo chez l'animal et le primate non-humain	Modèles animaux utilisés (neuroinflammation et autres)	Etudes cliniques chez l'homme sain	Etudes cliniques / pathologies humaines avec composante neuroinflammatoire
Quinoline carboxamide	[11C]-PK11195	Shah et al. 1993	Cagnin et al. 2002 ; Veneti et al. 2006	Cagnin et al. 2002 ; Veneti et al. 2006 ; Porc, MPTP (Cumming et al. 2006) Rat, LPS, 6-OHDA (Veneti et al. 2007) Rat, LPS (Ito et al. 2010) Rat, ischémie (Hughes et al. 2012)	Charbonneau et al. 1986 ; Veneti et al. 2006	<u>Scélrose en plaques</u> : (Banati et al. 2000 ; Vas et al. 2008 ; Owen et al. 2011) ; <u>Scélrose latérale amyotrophique</u> : (Turner et al. 2004) ; <u>Encéphalite virale</u> : (Banati et al. 1999 ; Kumar et al. 2008) ; <u>Schizophrénie</u> : (Van Berckel et al. 2008 ; Doorduyn et al. 2009) ; <u>Chorée de Huntington</u> : (Pavese et al. 2006) <u>AVC</u> : (Gerhard et al. 2005 ; Thiel et al. 2010 ; Gulyas et al. 2012) ; <u>Maladie d'Alzheimer</u> : (Cagnin et al. 2001 ; Tomasi et al. 2008 ; Wiley et al. 2009) ; Maladie de Parkinson : (Ouchi et al. 2005 ; Gerhard et al. 2006 ; Bartels et al. 2010)
Phenoxyaryl acétamide	[11C]-DAA1106	Zhang et al. 2003a	Maeda et al. 2004 ; Probst et al. 2007 ; Veneti et al. 2007	Rat, AK (Maeda et al. 2004) ; Rat, traumatisme crânien (Veneti et al. 2007a) ; Rat, LPS ; 6-OHDA (Veneti et al. 2007b) Rat, encéphalite herpétique (Doorduyn et al. 2010)	Ikoma et al. 2007	Maladie d'Alzheimer (Yasuno et al. 2008) Scélrose en plaques (Owen et al. 2011)
	[18F]-FEDAA1106	Zhang et al. 2003b	Zhang et al. 2003b ; Maeda et al. 2007	Souris transgénique de MA (Maeda et al. 2007)	Fujimura et al. 2006 ; Shidahara et al. 2008 Takano et al. 2011	
	[11C]-PBR28	Briard et al. 2008 ; Wang et al. 2009	Briard et al. 2008 ; Brown et al. 2007 ; Imaizumi et al. 2008 ; Imaizumi et al. 2007	Rat, ischémie (Imaizumi et al. 2007)	Brown et al. 2007 ; Fujita et al. 2008 ; Owen et al. 2011	Scélrose en plaques (Owen et al. 2011 ; Oh et al. 2011) Epilepsie (Hirvonen et al. 2012)
	[18F]-PBR06	Imaizumi et al. 2007	Imaizumi et al. 2007		Fujimura et al. 2009	
Pyrazolo-pyridine	[11C]-DPA713	James et al. 2005 ; Thominaux et al. 2006	James et al. 2005 ; Boutin et al. 2007 ; Chauveau et al. 2009 ; Doorduyn et al. 2009	Rat, AMPA (Boutin et al. 2007 ; Chauveau et al. 2009) ; Rat, encéphalite herpétique (Doorduyn et al. 2009)	Endres et al. 2009 ; 2012	Scélrose en plaques (Owen et al. 2011)
	[18F]-DPA714	James et al. 2008	James et al. 2008 ; Chauveau et al. 2009 ; Doorduyn et al. 2009 ; Martin et al. 2009	Rat, AQ (James et al. 2008) ; Rat, AMPA (Chauveau et al. 2009) ; Rat, encéphalite herpétique (Doorduyn et al. 2009) ; Rat, ischémie (Martin et al. 2009) Rat, tumeur (gliome) (Winkler et al. 2012)	Arlicot et al. 2011	Scélrose Latérale Amyotrophique (Le Pogam et al. 2008)
Imidazo-pyridine	[18F]-PBR111	Fookes et al. 2008	Fookes et al. 2008 ; Van Camp et al. 2010 ; Verschuer et al. 2012	Rat, AMPA (Van Camp et al. 2010)		Scélrose en plaques (Owen et al. 2011)
	[123I]-CLINDE	Katsifis et al. 2000	Mattner et al. 2005 ; Arlicot et al. 2008 ; 2010 Mattner et al. 2008	Rat, EAE (Mattner et al. 2005) ; Rat, AQ (Arlicot et al. 2008) ; Souris, cuprizone (Mattner et al. 2011) Rat, 6-OHDA (Maia et al. 2012)	Tamagnan et al. 2008	

Tableau VI : récapitulatif de l'état de développement des principaux radioligands marqueurs de la TSPO : Radiosynthèse, études pré-cliniques in-vivo, modèles de neuroinflammation, études chez l'homme sain et études cliniques / pathologies neuroinflammatoires.

**CHAPITRE V: SUIVI LONGITUDINAL ET PARALLELE
DE L'ACTIVATION MICROGLIALE ET DE LA PERTE
NEURONALE DOPAMINERGIQUE DANS UN MODELE
ANIMAL DE MP CHEZ LE RAT**

I. OBJECTIFS DU TRAVAIL EXPERIMENTAL

Nous avons vu que la neuroinflammation et la dégénérescence dopaminergique dans la MP sont liées. L'étude approfondie des mécanismes qui lient ces deux phénomènes au cours de cette maladie, afin d'améliorer la compréhension des processus physiopathologiques, est possible grâce à l'utilisation des modèles animaux de la MP. Ces derniers permettent également, de par l'évolution rapide des processus induits par rapport à ce qui se passe chez l'homme, d'effectuer un suivi dans le temps des processus physiopathologiques.

L'objectif principal du travail présenté ici est de faire un suivi longitudinal en parallèle des processus de neuroinflammation et de neurodégénérescence dopaminergique dans un modèle animal de rat lésé à la 6-OHDA afin de définir la cinétique de survenue et d'évolution de ces deux phénomènes physiopathologiques l'un par rapport à l'autre.

En pratique, le suivi du processus de neuroinflammation a été effectué par imagerie moléculaire de la densité de la TSPO en utilisant le CLINDE comme ligand à différents temps après une lésion unilatérale à la 6-OHDA dans le striatum de rats. Comme il est connu que le cerveau des rongeurs, à l'exception des bulbes olfactifs et le plexus choroïde, exprime physiologiquement des niveaux indétectables de TSPO même en l'absence de neuroinflammation (Benavides et al. 1983), les niveaux de TSPO du côté lésé du cerveau ont été comparés à ceux du côté intact du même animal, et au côté lésé de rats Sham, c'est-à-dire lésés sans toxine. Dans des expériences complémentaires, la densité de la TSPO a également été étudiée en utilisant une méthode de référence par autoradiographie *in-vitro* avec du PK11195, « gold standard » des ligands de la TSPO utilisé en recherche, ce qui a permis de comparer et d'évaluer les caractéristiques du CLINDE comme nouveau ligand de la TSPO dans ce modèle animal de la MP. Par ailleurs, le suivi du processus de la perte neuronale dopaminergique nigro-striée a été effectué quant à lui à l'aide de deux marqueurs, l'immunoréactivité à la TH (TH-i) et l'imagerie moléculaire de la densité des DAT en utilisant le PE2I comme ligand.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

A. Modèle animal

1. Les animaux

Toutes les procédures expérimentales ont été menées dans le respect des exigences du Conseil de la Communauté de l'Union européenne en matière d'éthique en expérimentation sur les animaux de laboratoire 86/609/CEE et après l'approbation du Comité régional d'éthique (INSERM37-002). Les expériences ont été effectuées sur des rats adultes mâles de souche Wistar (CERJ, Le Genest-Saint-Isle, France) pesant entre 250 et 300 g au moment de la lésion. Les animaux sont maintenus à l'animalerie du laboratoire dans des groupes de trois par cage avec une température et une humidité environnementales contrôlées (température de 22 ± 1 ° C; hygrométrie de $40 \pm 7\%$), un cycle nyctéméral d'alternance lumière / obscurité de 12 heures, et de la nourriture et de l'eau disponibles ad libitum.

2. Lésion intrastriatale unilatérale à la 6-OHDA

Vingt minutes avant l'intervention, les animaux sont injectés en intra-péritonéal avec de la pargyline (50 mg / kg) et de la désipramine (25mg / kg) (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). Avant la chirurgie, les rats sont anesthésiés avec de l'isoflurane à 4% (500 mL/min pour l'induction de l'anesthésie) et placés sur un appareil de stéréotaxie (Stoelting, Phymep, Paris, France) avec une barre d'incisive réglée à - 3,3 mm. Les rats sont maintenus sous isoflurane à 2,5% pendant la chirurgie. La température corporelle de l'animal ($36,9 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$) est contrôlée tout au long de la chirurgie à l'aide d'une sonde rectale. Après incision de la peau, le crâne est exposé et percé à l'aide d'une fraise de dentiste. La lésion est réalisée de façon unilatérale en intra-striatal par injection de chlorhydrate de 6-OHDA. Un total de 10 µg d'une solution de 6-OHDA à pH 4,5 dans un tampon phosphate est administré en deux points du striatum droit (2 mg / ml dans l'acide ascorbique 0,01%) à raison de 5 µg dans 5 µL pour chaque point avec une seringue Hamilton 702RN (de calibre 26 gauges, Hamilton, Massy, France) à un débit de 1 µL / min. Les coordonnées stéréotaxiques utilisés par rapport au bregma sont : Antéropostérité = 0,5 mm, Latéralité = -2,5 mm, Profondeur = -5 mm, et Antéropostérité

= 0,5 mm, Latéralité = -4,2 mm, Profondeur = -5 mm (Paxinos et Watson, 1986) (Figure 37). Après chaque injection, la seringue est laissée en place pendant 4 min, puis retirée lentement afin d'éviter la diffusion de la toxine. La brèche osseuse est comblée avec de la cire de Horsley (Bonewax), la plaie est ensuite suturée, et le rat remis dans sa cage, sous surveillance quotidienne jusqu'à son sacrifice. Les animaux Sham reçoivent le tampon phosphate sans 6-OHDA et sont pris en charge dans les mêmes conditions expérimentales.

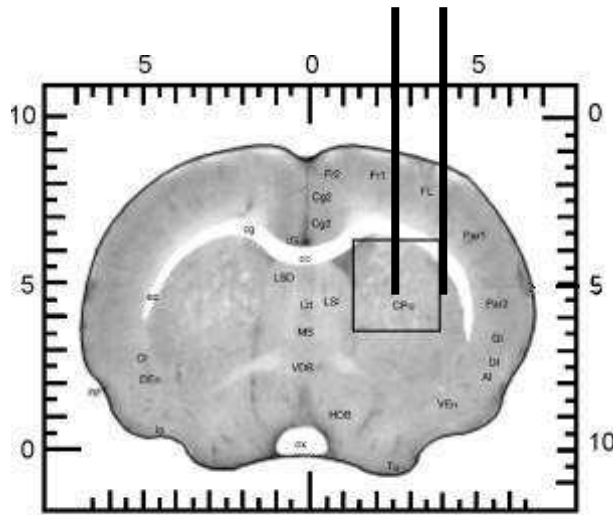


Figure 37 : Schéma représentant les coordonnées stéréotaxiques utilisées pour l'injection de la 6-OHDA dans le striatum (coupe coronale, bregma +0.5 selon Atlas Paxinos et Watson, 1986)

B. Radioligands utilisés

1. Le [3H]-PK11195

Le [3H]-PK11195 est acheté déjà radiomarké et prêt à l'emploi chez un fournisseur industriel (Perkin Elmer, USA). Il est livré avec une activité spécifique de 3,14 GBq / μmol sous forme de solution à 37 MBq/mL. La pureté radiochimique du radioligand est supérieure à 97%.

2. Le [125I]-PE2I

La synthèse chimique du précurseur stannique du PE2I a été réalisée dans notre laboratoire, selon la méthode décrite dans la littérature (Emond et al. 1997) en partant de la cocaïne et en faisant réagir du 1-Chlorure-3-(tributylétain)-prop-(2E)-ényl afin d'obtenir un nortropane N-alkylé (Figure 38).

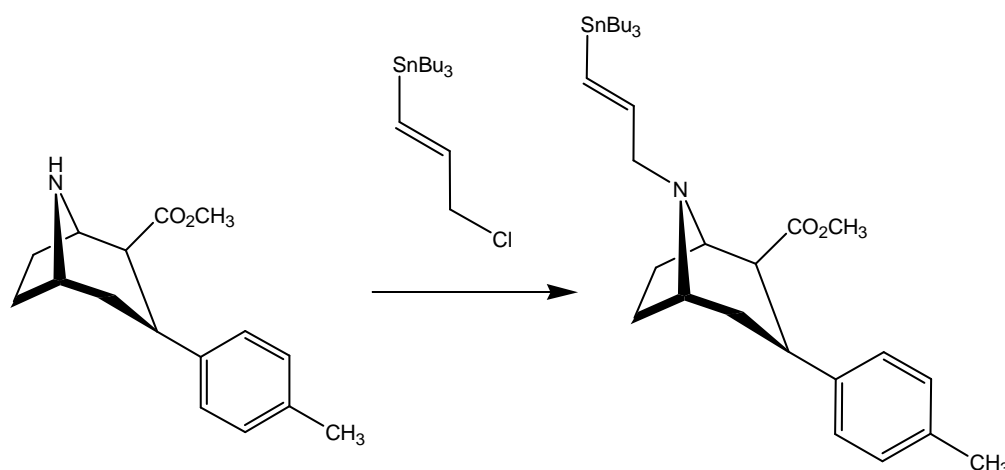


Figure 38 : Schéma de synthèse du précurseur stannique du PE2I

La synthèse radiochimique du [125I]-PE2I est réalisée par iododéstannylation, c'est à dire par substitution électrophile régiospécifique du groupement tributylétain par un atome d'iode-125 (Figure 39). Il s'agit d'un marquage à l'iode par voie directe, l'iode étant fixé directement par liaison covalente sur le précurseur. Le mode opératoire est décrit dans la littérature (Guilloteau et al. 1998). Le précurseur stannique (50 µg), repris dans 100 µL d'éthanol absolu, est mélangé avec une solution de Na125I (activité spécifique 81,4 GBq/µmol ; Perkin Elmer, France) suivi d'un ajout de 100 µL d'une solution de chloramine T à 10 mg/mL (tampon phosphate 0,5 M / pH = 7.2). La chloramine T oxyde le 125I- en 125I+, capable de réagir avec le précurseur stannique du PE2I. La réaction se produit pendant 30 minutes à température ambiante. Le produit est ensuite purifié par CLHP en phase inverse (Colonne semi-préparative C18 5x250 mm, Luna, Phenomenex), à débit constant de 1,5 mL / minute (méthanol / eau / ammoniacque ; 80 / 20 / 0,1%). Grâce à un système de double détection UV/radioactivité (détecteur de radioactivité Bioscan Miniscan 3200, détecteur UV Vis Gilson), le PE2I absorbe en UV à 254

nm, le pic radioactif correspondant au [125I]-PE2I est collecté et passé sur SepPack (C18, Waters), puis élué dans de l'éthanol absolu pour éliminer les solvants de la phase mobile de la CLHP de purification. Un échantillon de 20 µl est analysé en CLHP en phase inverse (colonne analytique C18 5x250 mm, Luna, Phenomenex), à débit constant de 1,0 mL / minute (méthanol / eau / ammoniacque ; 80 / 20 / 0,1%) avec co-injection de PE2I froid (50 µL de solution à 1 mg/mL) afin de vérifier la pureté radiochimique et chimique du radioligand obtenu.

Le temps de rétention lors de la purification est de 23 minutes dans les conditions expérimentales utilisées. Le produit radiomarqué a été obtenu avec des rendements de marquage supérieurs à 90 %, une activité spécifique d'environ 80 GBq / µmol et une pureté radiochimique supérieure à 95% (contrôle par co-injection) (Figure 40).

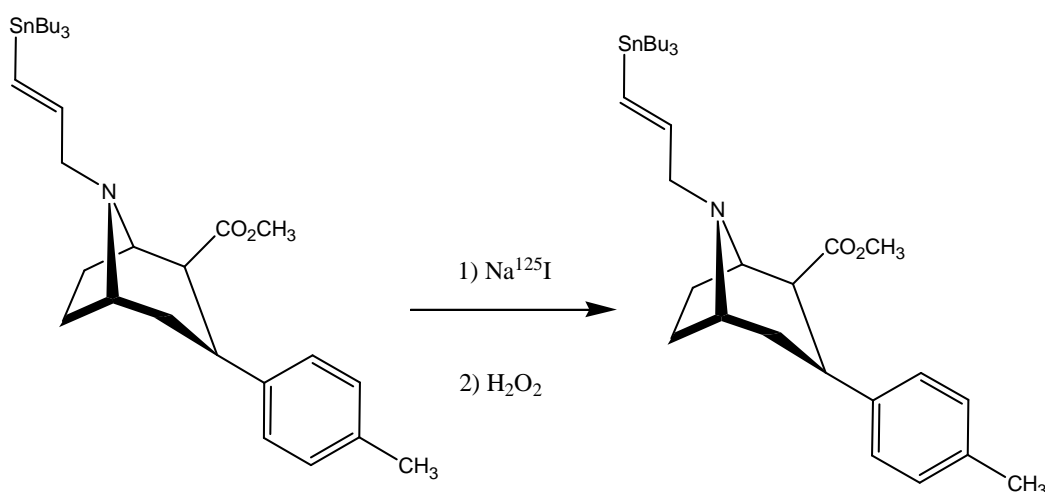
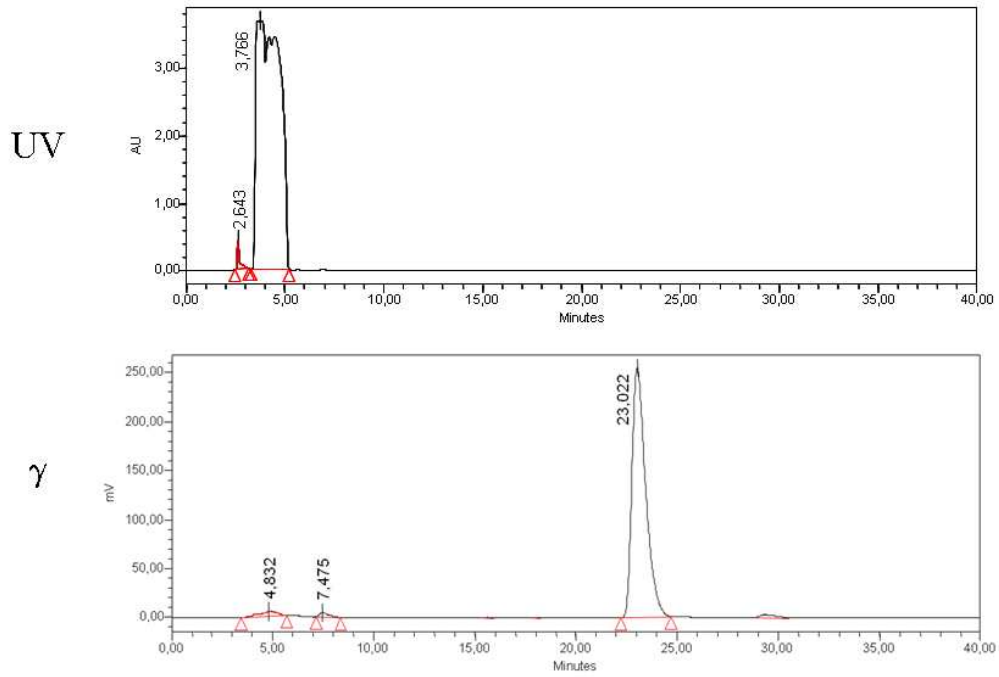


Figure 39 : Schéma de radiosynthèse du [125I]-PE2I

purification PE2I



Coinjection PE2I

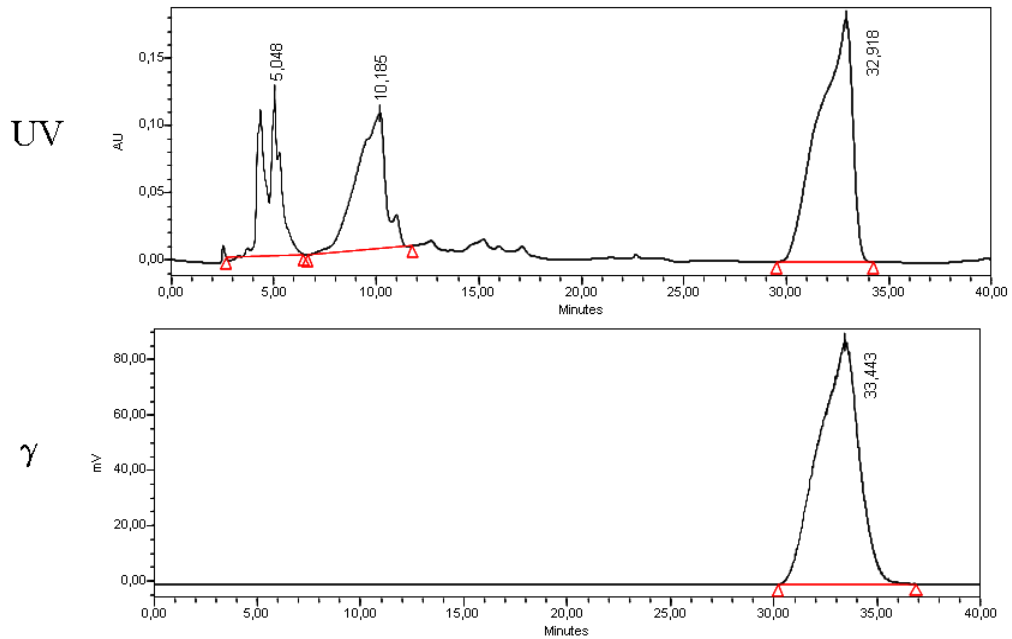


Figure 40 : Chromatogrammes CLHP UV/radioactivité de purification du [125I]-PE2I (en haut).
Chromatogrammes CLHP UV/radioactivité lors d'un contrôle de pureté radiochimique du [125I]-PE2I par co-
injection avec du PE2I froid (en bas)

3. Le [125I]-CLINDE

Le précurseur stannique du CLINDE a été fourni par l'ANSTO, centre de recherche national australien avec qui l'unité INSERM U930 de Tours est en collaboration. La synthèse chimique du précurseur stannique est réalisée selon la méthode décrite dans la littérature en partant d'un dérivé bromé (Katsifis et al. 1997) (Figure 41).

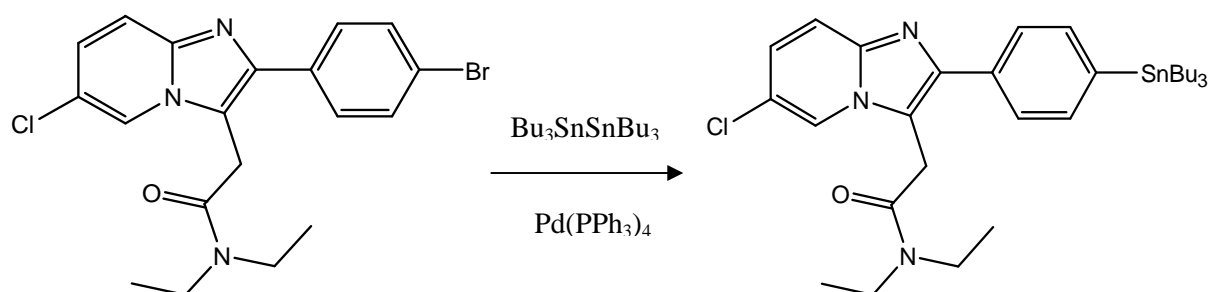


Figure 41 : Schéma de synthèse du précurseur stannique du CLINDE

La synthèse radiochimique du [125I]-CLINDE est réalisée par iododestannylation, c'est-à-dire par substitution électrophile régiospécifique du groupement tributylétain par un atome d'iode-125 (Figure 42). Il s'agit d'un marquage à l'iode par voie directe, l'iode étant fixé directement par liaison covalente sur le précurseur. Le mode opératoire est décrit dans la littérature (Katsifis et al. 2000 ; Arlicot et al. 2008). Le précurseur stannique (100 μg), repris dans 200 μL d'acide acétique, est traité par une solution de Na^{125}I (activité spécifique 81,4 $\text{GBq}/\mu\text{mol}$; Perkin Elmer, France) suivi d'un ajout d'acide péraétique (1-3%, 100 μL) préparé extemporanément. L'acide péraétique oxyde le $^{125}\text{I}^-$ en $^{125}\text{I}^+$, capable de réagir avec le précurseur stannique du CLINDE. Après 5 minutes, la réaction est arrêtée par l'ajout de 200 μL de bisulfite de sodium (50 mg/mL) et de 200 μL de bicarbonate de sodium (50 mg/mL). Le produit est ensuite purifié par CLHP en phase inverse (Colonne semi-préparative C18 10x250 mm, Phenomenex), à débit constant de 4 mL/minute (acétonitrile / acétate d'ammonium 0,1 M ; 60 / 40 %). Grâce à un système de double détection UV/radioactivité (détecteur de radioactivité Bioscan Miniscan

3200, détecteur UV Vis Gilson), le CLINDE absorbe en UV à 254 nm, le pic radioactif correspondant au [125I]-CLINDE est collecté et passé sur SepPack (C18, Waters), puis élué dans de l'éthanol absolu pour éliminer les solvants de la phase mobile de la CLHP de purification. Un échantillon de 20 µl est analysé en CLHP en phase inverse (colonne analytique C18 4,1 x 250 mm PRP1, Cluzeau), à débit constant de 1,5 mL / minute (acétonitrile – acétate d'ammonium 0,1M ; 60 / 40 %) avec co-injection de CLINDE froid (50 µL de solution à 1 mg/mL) afin de vérifier la pureté radiochimique du radioligand obtenu.

Le temps de rétention obtenu lors de la CLHP de purification est de 15 minutes dans les conditions expérimentales utilisées. Le produit radiomarqué a été obtenu avec des rendements de marquage compris entre 71 et 88% équivalents à ceux retrouvés dans la littérature (Katsifis et al. 2000), une activité spécifique de 80 GBq / µmol et une pureté radiochimique supérieure à 95% (Figure 43).

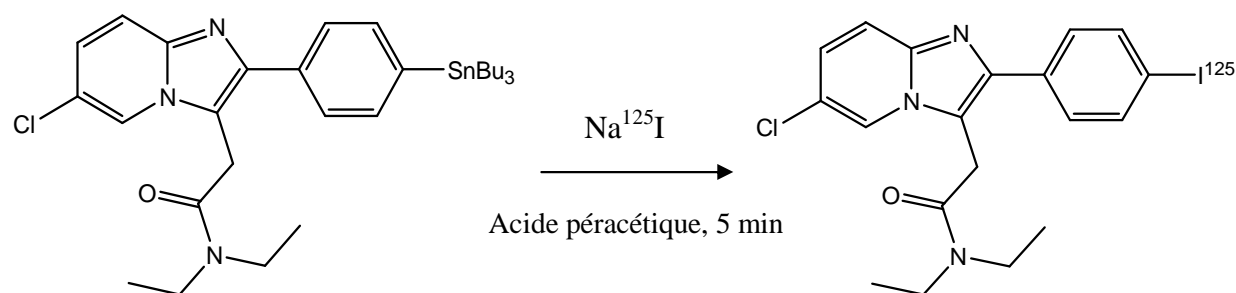


Figure 42 : Schéma de radiosynthèse du [125I]-CLINDE

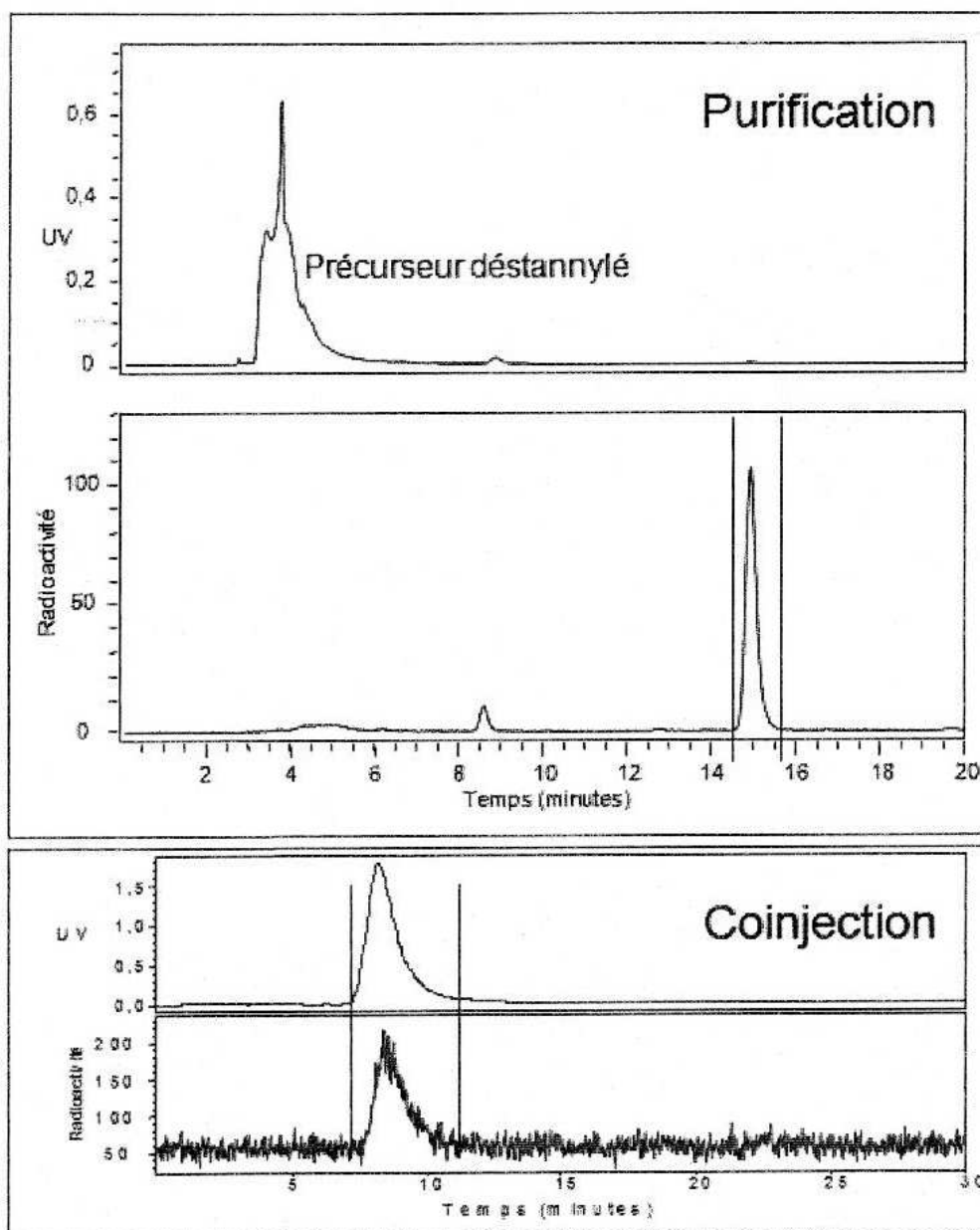


Figure 43 : Chromatogrammes CLHP UV/radioactivité de purification du [125I]-CLINDE (en haut). Chromatogrammes CLHP UV/radioactivité lors d'un contrôle de pureté radiochimique du [125I]-CLINDE par co-injection avec du CLINDE froid (en bas)

C. Protocole expérimental

Un total de 96 animaux a été utilisé dans ce travail expérimental, 72 animaux ont été lésés à la 6-OHDA et 24 animaux (Sham) ont reçu un tampon phosphate. Ils ont été divisés en 6 groupes de 16 animaux selon le temps de sacrifice, soit 3, 7, 14, 21, 28 ou 56 jours post-lésion (jpl). Dans le premier ensemble d'expériences *in-vitro*, dans lequel chaque groupe est composé de n = 6 rats 6-OHDA et n = 4 rats Sham, les effets de la lésion à la 6-OHDA ont été évalués à travers les densités de TH-i, de DAT et de TSPO en utilisant des anticorps anti-TH, du [125I]-PE2I et du [3H]-PK11195 comme marqueurs respectifs. Dans la seconde série d'expériences, dans laquelle chaque groupe est composé n = 6 rats 6-OHDA, l'expression de la microglie activée a été évaluée par autoradiographie quantitative *ex vivo* du cerveau à l'aide du [125I]-CLINDE comme radioligand TSPO (Figure 44).

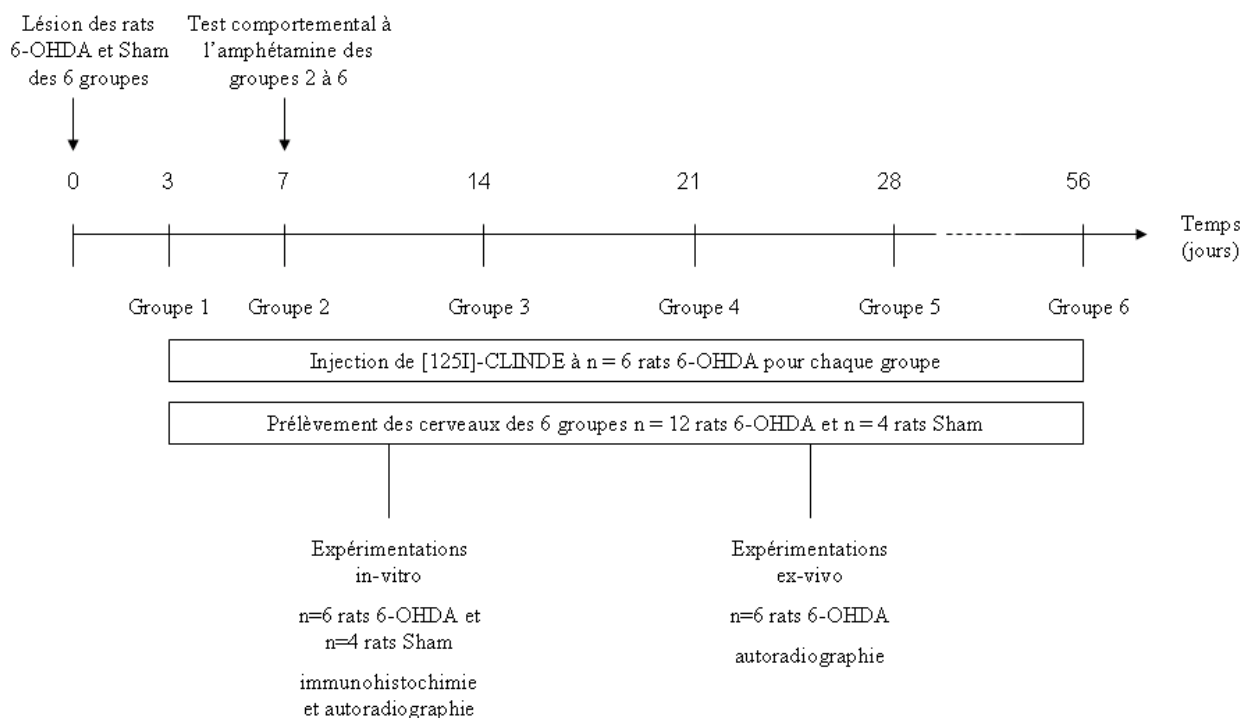


Figure 44 : Schéma du protocole expérimental de l'étude

D. Le test comportemental

Une semaine après la lésion, le comportement rotatoire en réponse à l'amphétamine (d-amphétamine sulfate, Sigma), des animaux lésés (6-OHDA et sham) a été testé pour apprécier le degré de la lésion pour chaque animal et l'homogénéité des lésions entre les animaux de chaque groupe. Ce test n'a donc pas été effectué pour le groupe des animaux sacrifiés à 3 jours post-lésion. La d-amphétamine sulfate poudre est diluée dans une solution de NaCl 0.9% afin de pouvoir être injectée. Quinze minutes avant le début du test, les animaux sont injectés en intra-péritonéal avec 3 mg / kg d'amphétamine, puis sont placés dans des enceintes circulaires du rotomètre automatisé (Imetronic, Pessac, France). Le nombre de rotations effectuées dans les sens ipsilatéral et controlatéral durant 90 minutes est enregistré grâce au logiciel « Turning » (Imétronic, Pessac, France) qui est directement relié au rotomètre automatisé. Les animaux lésés par la 6-OHDA présentant un nombre supérieur à 5 tours/min en ipsilatéral ont été retenus pour l'étude.

E. Etudes in-vitro sur coupes de cerveaux

Après le sacrifice des rats par étourdissement et décapitation, les cerveaux ont été prélevés et congelés instantanément dans un mélange d'isopentane et de carboglace à -35 °C. Des coupes coronales de 20 µm d'épaisseur ont ensuite été réalisées à l'aide d'un microtome cryostat à -20°C (Jung CM 3000, Leica). Les coupes ont été montées sur lames SuperFrostPlus® (CML, Nemours, France) à raison de 3 coupes / lame. Les lames ont été conservées au congélateur à -80 °C jusqu'à leur utilisation. Les expérimentations d'immunohistochimie et d'autoradiographie ont été réalisées sur des sections consécutives de chaque cerveau, que ce soit pour les groupes de rats lésés à la 6-OHDA ou les groupes de rats Sham. Les coordonnées stéréotaxiques utilisées par rapport au bregma ont été comprises entre +0,5 et -0,5 en AP pour le striatum et entre 5 et -6 en AP pour la SNc (Paxinos et Watson, 1986). Pour chaque animal, le côté ipsilatéral = lésé du cerveau dans la région du striatum ou de la SNc a été comparé au côté controlatéral = intact.

1. Immunohistochimie anti-TH

Les coupes de cerveaux préalablement séchées à l'air libre ont été fixées avec du PFA 4% (Merck, Fontenay-sous-Bois, France) pendant 30 min à température ambiante puis lavées dans un bain de PBS 0,1 M. L'activité de la peroxydase endogène a été bloquée avec du H₂O₂ (110 volumes 0,5% dans du PBS 0,1M) (100 µl / coupe, 5 min). Après lavage avec du PBS 0.1 M, les sites antigéniques non-spécifiques ont été saturés avec 100 µL / coupe de sérum de chèvre (Sigma) dilué au 1/10^{ème} dans du PBS 0,1 M contenant 0,1% de tween et 2% de gélatine, pendant 30 min. Après deux rinçages successifs avec du PBS 0.1 M, les coupes ont été incubées dans une solution d'anticorps anti-TH (anticorps polyclonal anti-TH de lapin, Euromedex, Mundolsheim, France) dilué au 1/400^{ème} dans du PBS 0,1 M contenant 2% de gélatine, pendant 3 h. Les coupes de contrôle ont été incubées en parallèle avec la solution de sérum de chèvre précédemment utilisée. Puis les coupes ont été lavées et incubées en présence d'anticorps secondaire anti-lapin biotinylé et de la peroxydase marquée à la streptavidine (Kit ABC, Abcys, Paris, France), avant d'être révélées avec du 3-3 'diaminobenzidine tétrachlorure de carbone (DAB) (Sigma) (Figure 45). Après un temps de contact de 30 minutes, les coupes ont été lavées deux fois avec du PBS 0,1 M et séchées au moins 1 heure à température ambiante. Les coupes ont ensuite été fixées avec de l'Histoclear (National Diagnostics, USA). Les coupes ont été finalement montées entre lame et lamelle avec du milieu de montage Pertex® (Histolab, Suède).

Trois sections de chaque région cérébrale ont été quantifiées pour chaque animal et la moyenne a été calculée. La quantification des fibres TH immunoréactives a été réalisée indirectement dans le striatum par quantification du taux d'absorption de la lumière blanche à travers le tissu en utilisant un système d'analyse d'image informatisée (Sony) couplé avec le logiciel Histolab (Microvision Instruments, Evry, Paris). Dans la SNc, le nombre de neurones TH+ a été compté du côté ipsilatéral et controlatéral à l'aide du logiciel Histolab.

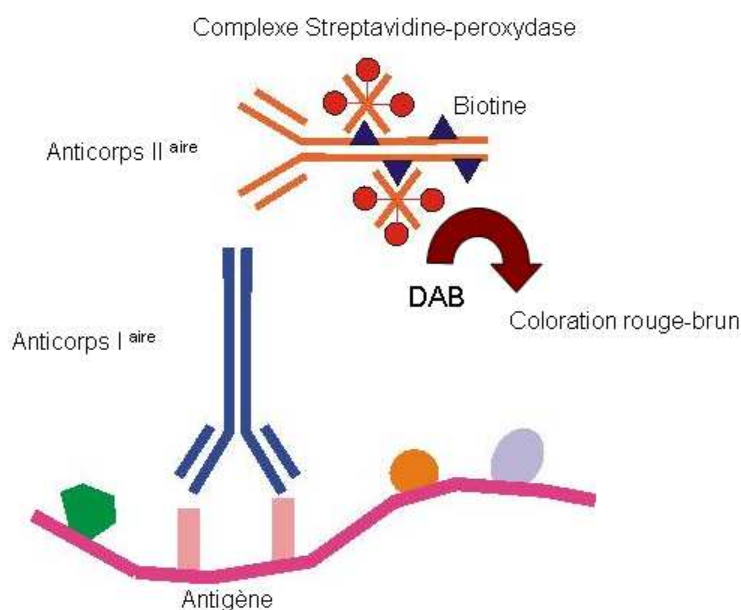


Figure 45 : Principe de détection immunohistochimique de la perte neuronale dopaminergique à l'aide de l'anticorps primaire anti-TH.

2. Autoradiographies *in-vitro* du DAT et de la TSPO

Les études *in-vitro* par autoradiographique de la densité du DAT et de la TSPO spécifiques du cerveau ont été réalisées en utilisant respectivement du [125I]-PE2I et du [3H]-PK11195. Les conditions expérimentales sont résumées dans le tableau ci-dessous (Tableau VII).

Radioligand	[125I]-PE2I	[3H]-PK11195
Concentration (nM)	0,1	1
Activité spécifique (GBq / μ mol)	80	3,14
Solution tampon	Tampon PBS (0.1 M, pH 7.4) contenant 137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 10.14 mM de Na ₂ HPO ₄ , 1.76 mM de KH ₂ PO ₄ et 109 g/l de saccharose	Tampon Tris / HCl (50 mM, pH 7.4)
Temps d'incubation (min)	120	30
Température d'incubation (°C)	Température ambiante (20°C)	Température ambiante (20°C)
Molécule compétitrice pour l'étude de la fixation non-spécifique	Cocaine 100 μ M (Cooper, France)	PK11195 1 μ M (Sigma, France)

Tableau VII : Conditions expérimentales des études *in-vitro* par autoradiographie pour l'étude du DAT avec du [125I]-PE2I et pour l'étude de la TSPO avec du [3H]-PK11195

Les coupes coronales de cerveau ont été incubées dans une solution tampon avec le radioligand. La liaison non-spécifique des radioligands a été évaluée par l'incubation de coupes adjacentes, en présence d'une molécule compétitrice en excès (Cocaïne pour le [125I]-PE2I ou PK11195 froid pour le [3H]-PK11195). Les lames ont ensuite été rincées deux fois 20 min dans de la solution tampon glacée, puis plongées dans de l'eau distillée à 4 °C et enfin séchées à température ambiante.

Pour chaque radioligand, les coupes de cerveaux de chaque groupe de lésion ont été exposées ensembles sur des films photographiques sensibles aux rayonnements X et β (Biomax MRTM Kodak, VWR, France), accompagnées des échelles de radioactivité calibrées pour l'iode-125 ou pour le tritium, pendant 24 h pour le [125I]-PE2I et pendant 10 semaines pour le [3H]-PK11195, les films ont ensuite été développés (développeur Kodak L24), fixés (fixateur Kodak 3000) et séchés.

Les films autoradiographiques ont ensuite été scannés (scanner Epson Perfection 4870 Photo) et analysés. La quantification de chaque image autoradiographique a été réalisée à l'aide d'un logiciel bêta-vision+ (Biospace, Paris, France). Les valeurs de la liaison totale (CT) et de la liaison non spécifique (NSB) des radioligands ont été mesurées sur au moins 3 coupes pour chaque animal. La valeur de liaison spécifique (SB) a été déterminée de la façon suivante : $SB = TB - NSB$. L'expression du DAT ou de la TSPO dans le striatum et la SNc, identifiée par une inspection visuelle du signal radioactif, a été utilisée pour délimiter les régions d'intérêt (ROIs). Les ROIs ont été définies manuellement pour le côté non-lésé (controlatéral) et le côté lésé (ipsilatéral) respectivement pour le [125I]-PE2I et le [3H]-PK11195. Les ROIs miroir ont été établies de façon symétrique dans la région homologue ipsilatéral. Les résultats sont exprimés comme le pourcentage de liaison des radioligands du côté ipsilatérale par rapport au côté controlatéral.

F. Etude *ex-vivo* de la TSPO par autoradiographie avec du [125I]-CLINDE

Il s'agit d'étudier par autoradiographie *ex-vivo* l'expression de la TSPO à travers la biodistribution cérébrale du [125I]-CLINDE. Pour cela, six rats par groupe (3, 7, 14, 21, 28 et 56 jpl) ont été lésés à la 6-OHDA et injectés en intraveineuse (veine de la queue) avec 2 à 2,5 MBq de [125I]-CLINDE dans 300 à 400 μ L de NaCl 0.9%. Les animaux ont été sacrifiés par étourdissement et décapitation 30 min après l'injection du [125I]-CLINDE. Les cerveaux ont

été prélevés immédiatement et congelés dans l'isopentane refroidi à -35 °C puis conservés à -80°C. Des coupes coronales (20 µm d'épaisseur) ont été ensuite réalisées dans la région du striatum et de la SNc, avec le même mode opératoire que celui décrit pour les études *in-vitro* et avec les mêmes coordonnées stéréotaxiques. Les lames obtenues, contenant 3 coupes chacune ont été exposées à des films photographiques pendant 10 jours et les films révélés comme décrit pour les études *in-vitro*. L'analyse quantitative des images sur les films a été réalisée comme décrit précédemment pour les études *in-vitro*.

G. Traitement statistique des données

Le traitement statistique des données a été réalisé en utilisant la version du logiciel R 2.12.2 (R Project pour windows, 2011). Toutes les valeurs ont été exprimées sous forme de moyennes \pm erreur standard sur la moyenne (SEM).

- Les comparaisons entre les pourcentages de liaison des marqueurs et radioligands sur les côtés lésés par rapport aux côtés non-lésés ainsi que des rapports entre les côtés lésés et les valeurs théoriques ont été réalisées en utilisant le test des rangs signé Wilcoxon.
- Les comparaisons du comportement rotatoire entre les groupes shams et entre les groupes 6-OHDA ; ainsi que les comparaisons des pourcentages de liaison entre les groupes 6-OHDA et entre les groupes Sham (3, 7, 14, 21, 28 et 56 jpl), ont été réalisées en utilisant le test des rangs de Kruskal-Wallis. Puis, selon la valeur du « p » obtenue, des comparaisons par paires ont été effectuées en utilisant le test des rangs de Mann-Whitney.

L'ensemble des tests appliqués était bilatéraux. Le niveau de signification des différences a été fixé à $p < 0,05$.

III. RÉSULTATS

A. Le test comportemental

L'intensité du comportement rotatoire évaluée 7 jours après la lésion pendant 90 min suite à l'injection intrapéritonéale de d-amphétamine était similaire pour tous les groupes de lésion à la 6-OHDA testés ($p = 0,593$). L'intensité du comportement rotatoire était également semblable pour tous les groupes de lésion Sham testés ($p = 0,117$). De plus, l'intensité du comportement rotatoire était significativement différente ($p < 0,05$) pour chaque groupe testé, entre les animaux lésés à la 6-OHDA et les animaux Sham (Tableau VIII).

Nombre de tours / min	Groupe 2 (7 jpl)	Groupe 3 (14 jpl)	Groupe 4 (21 jpl)	Groupe 5 (28 jpl)	Groupe 6 (56 jpl)
Lésion 6-OHDA	9,5 ± 1,2	10,6 ± 1,6	8,3 ± 1,1	11,2 ± 1,5	12,0 ± 1,8
Lésion Sham	2,0 ± 0,6	2,4 ± 0,5	1,6 ± 0,4	0,8 ± 0,4	0,9 ± 0,4

Tableau VIII : Intensités du comportement rotatoire pour les groupes de lésion 6-OHDA et pour les groupes Sham exprimées en nombre de tours / min moyen ± SEM

B. Etudes in-vitro sur coupes de cerveaux

Les résultats obtenus lors des différentes expérimentations dans les groupes Sham ont montré que quel que soit le marqueur étudié, à savoir la TH-i, le DAT ou la TSPO, il n'y avait aucune différence significative dans le pourcentage de liaison entre le côté lésé (ipsilatéral) et le côté non-lésé (controlatéral). C'est pourquoi, dans la représentation graphique de ces résultats, tous les groupes Sham ont été regroupés en une seule barre "Sham" sur les histogrammes.

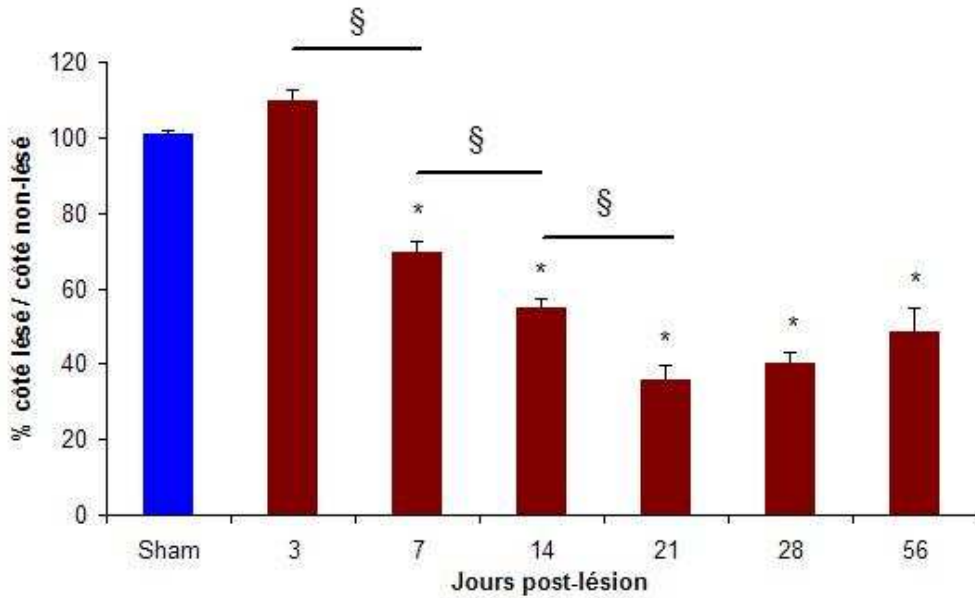
1. Immunohistochimie anti-TH

L'immunoréactivité anti-TH a été évaluée par la quantification de la densité de fibres TH+ dans le striatum et par la quantification du nombre de corps cellulaires neuronaux TH+ dans la SNc et a été exprimée en pourcentage de coloration du côté lésé (ipsilatéral) par rapport au côté non-lésé (controlatéral) (Figure 46). Concernant les groupes Sham, ce pourcentage n'était pas significativement différent de la valeur théorique de 100% pour ($p = 0,195$ et $0,683$) respectivement dans le striatum et la SNc.

Dans le striatum (Figure 46a), l'immunoréactivité (TH-i) a été augmentée à 3 jpl, ($110,0 \pm 2,9\%$, $p < 0,05$ par rapport à la valeur des groupes Sham de $101,1 \pm 0,7\%$). De 7 à 56 jpl, le pourcentage de coloration a été diminué de façon significative dans chaque groupe de rats 6-OHDA ($p < 0,05$ par rapport aux Sham). Une réduction significative ($p < 0,05$) a été observée entre 3 et 7 jpl, 7 et 14 jpl et entre 14 et 21 jpl ($69,6 \pm 3,3\%$, $54,9 \pm 2,9\%$ et $35,8 \pm 3,9\%$, respectivement pour les groupes 7, 14 et 21 jpl). Puis la réduction a semblé se stabiliser, en effet aucune différence significative n'a été mise en évidence entre 21, 28 et 56 jpl (respectivement $35,8 \pm 3,9$, $40,0 \pm 3,0$ et $48,1 \pm 6,6\%$).

Dans la SNc (Figure 46b), la TH-i était non significativement diminuée à 3 jpl ($92,9 \pm 5,9\%$, $p > 0,05$ par rapport à la valeur des groupes Sham de $98,4 \pm 1,3\%$). De 7 à 56 jpl, le pourcentage de coloration a été diminué de façon significative dans chaque groupe de rats 6-OHDA ($p < 0,05$ par rapport aux groupes Sham). Entre 3 et 7 jpl, la valeur du pourcentage de coloration obtenue a été significativement réduite (respectivement $92,9 \pm 5,9\%$ et $75,5 \pm 3,6\%$ $p < 0,05$). Cette réduction a été encore suivie par une baisse significative entre 7 et 14 jpl ($p < 0,05$) suivie d'une stabilisation du niveau de coloration ($44,1 \pm 4,0$, $31,6 \pm 2,9$, $35,7 \pm 4,0$ et $45,6 \pm 6,1\%$, respectivement pour les groupes 14, 21, 28 et 56 jpl).

a) Striatum



3 jpl

21 jpl

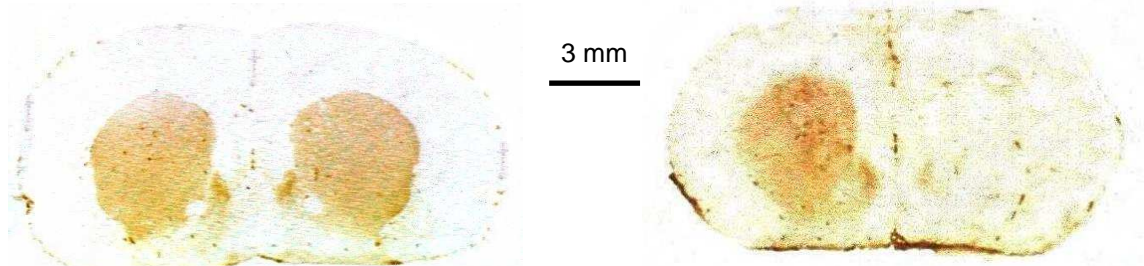
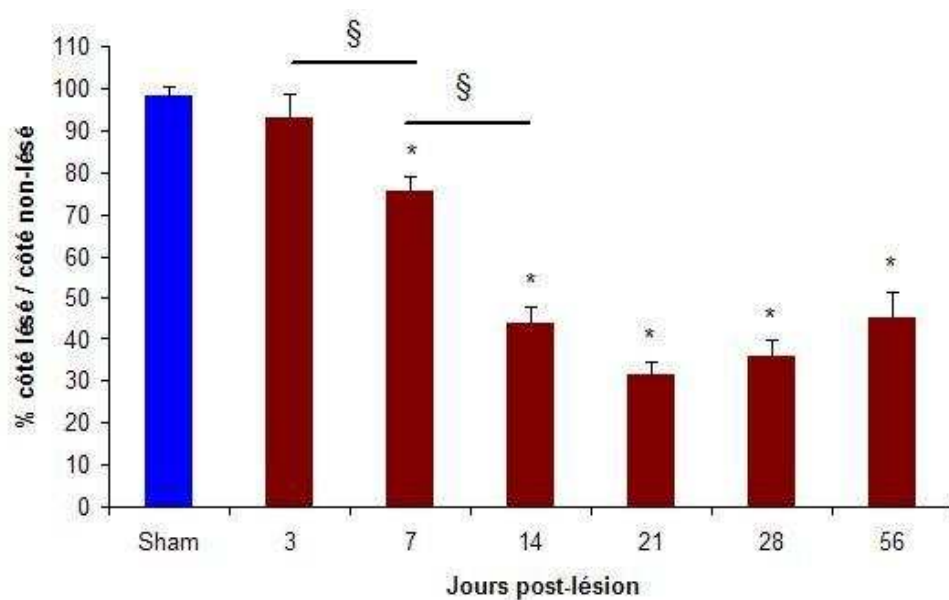


Figure 46(a) : **Immunoréactivité anti-TH (TH-i) dans le striatum.** L'immunomarquage a été évalué dans le striatum par la quantification de la densité des fibres TH+. Les résultats sont exprimés comme le pourcentage de TH-i dans le côté ipsilatéral (lésé) par rapport au côté controlatéral (non-lésé). Chaque valeur est exprimée sous forme de moyenne \pm SEM; $n = 5-6$ rats pour les différents groupes de sacrifice en fonction du temps. Le niveau de significativité a été fixé à $p < 0,05$; *: significativement différent de la valeur Sham (test des rangs de Mann-Whitney), §: significativement différent du groupe précédent (test des rangs de Mann-Whitney). Les images sont représentatives de l'immunomarquage à 3 et 21 jours post-lésion (jpl) dans le striatum.

b) Substance noire compacte



3 jpl

21 jpl

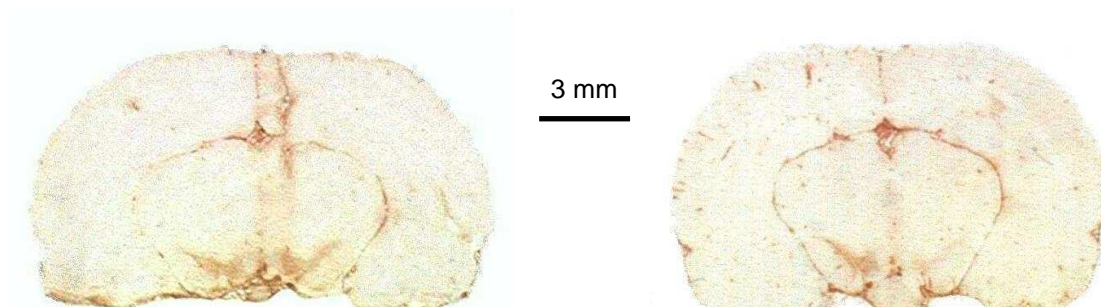


Figure 46(b) : **Immunoréactivité anti-TH (TH-i) dans la SNc.** L'immunomarquage a été évalué dans la SNc en comptant le nombre de corps cellulaires neuronaux TH+. Les résultats sont exprimés comme le pourcentage de TH-i dans le côté ipsilatéral (lésé) par rapport au côté controlatéral (non-lésé). Chaque valeur est exprimée sous forme de moyenne \pm SEM; $n = 5-6$ rats pour les différents groupes de sacrifice en fonction du temps. Le niveau de significativité a été fixé à $p < 0,05$; *: significativement différent de la valeur Sham (test des rangs de Mann-Whitney), §: significativement différent du groupe précédent (test des rangs de Mann-Whitney). Les images sont représentatives de l'immunomarquage à 3 et 21 jours post-lésion (jpl) dans la SNc (b).

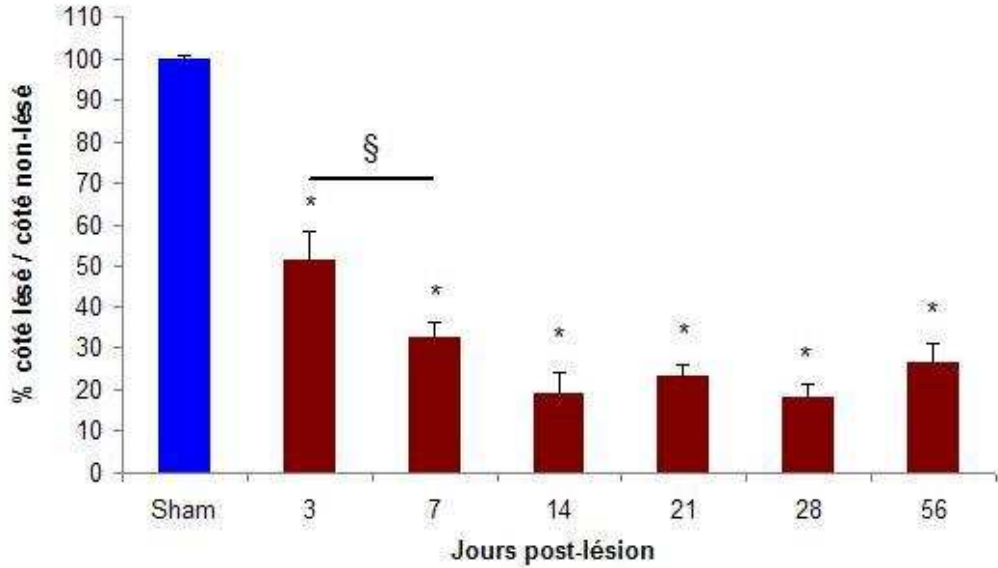
2. Autoradiographie du DAT au [125I]-PE2I

La densité du DAT a été évaluée *in-vitro* à travers la liaison du [125I]-PE2I sur des coupes de cerveau et a été exprimée en pourcentage de marquage dans le côté lésé (ipsilatéral) par rapport au côté non-lésé (controlatéral) (Figure 47). Concernant les groupes Sham, ce pourcentage n'était pas significativement différent de la valeur théorique de 100% ($p = 0,952$ et $0,094$) respectivement pour le striatum et la SNc.

Dans le striatum (Figure 47a), le marquage par le [125I]-PE2I a montré une perte précoce du nombre de DAT du côté ipsilatéral. En effet, il existe une différence significative entre le pourcentage de marquage à 3 jpl ($51,5 \pm 7,1\%$ par rapport à la valeur des groupes Sham de $99,8 \pm 0,8\%$, $p < 0,05$). L'intensité de marquage a ensuite été encore diminuée de manière significative entre 3 et 7 jpl (respectivement $51,5 \pm 7,1\%$ et $31,8 \pm 4,1\%$, $p < 0,05$). Les valeurs obtenues à 14, 21, 28 et 56 jpl ont ensuite été significativement inférieures à celle obtenue à 3 jpl (respectivement, $18,8 \pm 5,3$, $23,3 \pm 2,8$, $18,2 \pm 3,0$ et $26,6 \pm 4,6\%$, $p < 0,05$), mais n'étaient pas significativement différentes de la valeur obtenue à 7 jpl.

Dans la SNc (Figure 47b), le pourcentage de marquage par le [125I]-PE2I a été légèrement augmenté du côté ipsilatéral à 3 jpl ($114,8 \pm 4,0\%$ par rapport à la valeur des groupes Sham de $102,4 \pm 1,1\%$, $p < 0,05$). Ce niveau de marquage a été ensuite diminué de manière significative entre 3 et 7 jpl ($82,0 \pm 6,5\%$, $p < 0,05$). Les valeurs obtenues à 14, 21, 28 et 56 jpl ont ensuite été significativement plus faibles que celle obtenue à 3 jpl (respectivement $65,6 \pm 5,7$, $52,3 \pm 8,0$, $53,8 \pm 5,0$ et $52,6 \pm 2,1\%$, $p < 0,05$) mais n'étaient pas significativement différentes entre elles.

a) Striatum



3 jpl

21 jpl

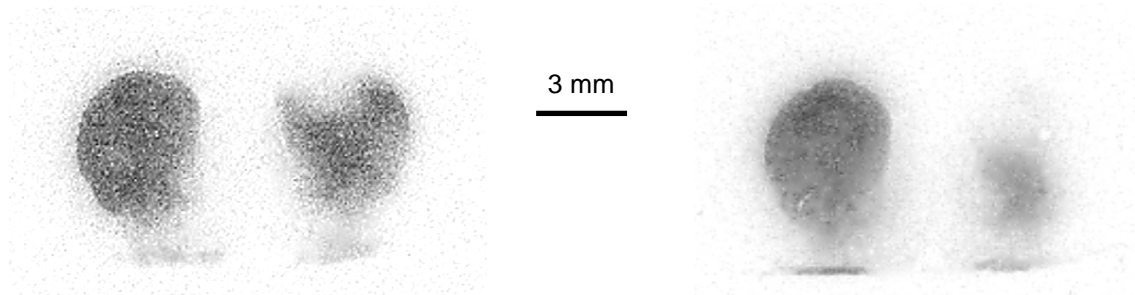


Figure 47(a) : **Etude *in-vitro* par autoradiographie de la densité du DAT avec du [125I]-PE2I dans le striatum.** Les résultats sont exprimés en pourcentage de liaison dans le côté ipsilatéral (lésé) par rapport au côté controlatéral (non-lésé). Chaque valeur est exprimée sous forme de moyenne \pm SEM, $n = 5-6$ rats pour les différents groupes de sacrifice en fonction du temps. Le niveau de significativité a été fixé à $p < 0,05$; *: significativement différent de la valeur Sham (test des rangs de Mann-Whitney), §: significativement différent du groupe précédent (test des rangs de Mann-Whitney). Les images sont représentatives de la liaison à 3 et 21 jours post-lésion (jpl) dans le striatum.

b) Substance noire compacte

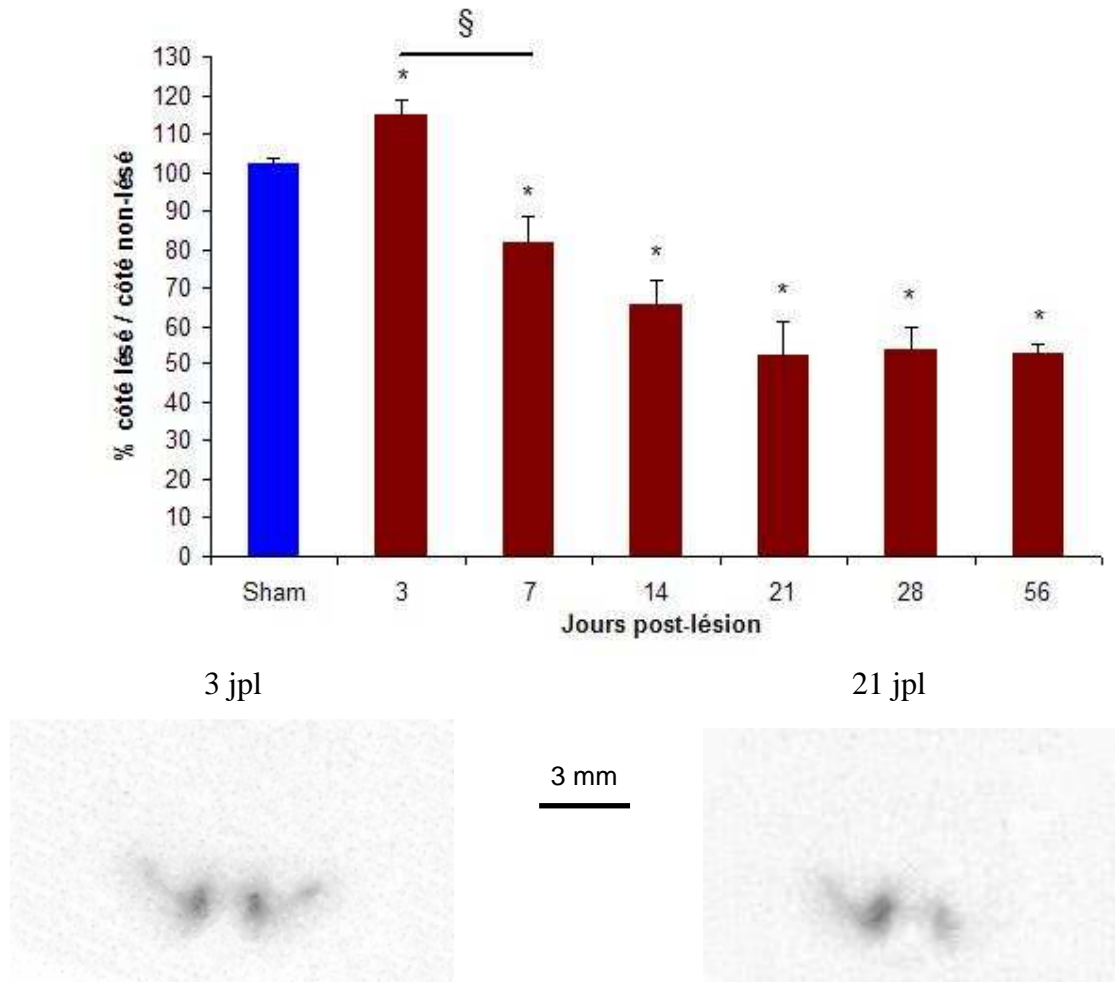


Figure 47(b) : **Etude *in-vitro* par autoradiographie de la densité du DAT avec du [125I]-PE2I dans la SNc.** Les résultats sont exprimés en pourcentage de liaison dans le côté ipsilatéral (lésé) par rapport au côté controlatéral (non-lésé). Chaque valeur est exprimée sous forme de moyenne \pm SEM, $n = 5-6$ rats pour les différents groupes de sacrifice en fonction du temps. Le niveau de significativité a été fixé à $p < 0,05$; *: significativement différent de la valeur Sham (test des rangs de Mann-Whitney), §: significativement différent du groupe précédent (test des rangs de Mann-Whitney). Les images sont représentatives de la liaison à 3 et 21 jours post-lésion (jpl) et la SNc.

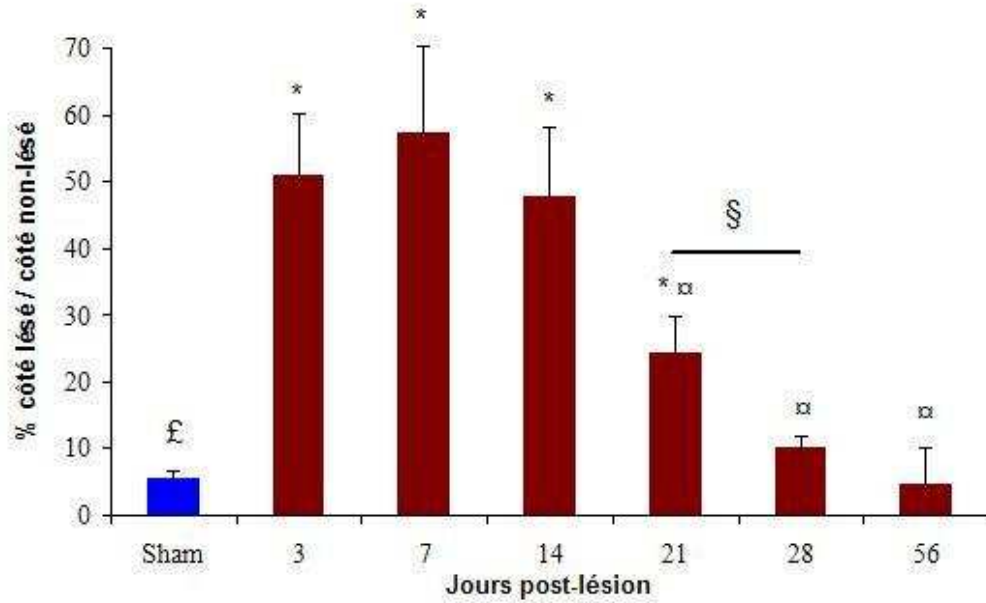
3. Autoradiographie de la TSPO au [3H]-PK11195

La densité de la TSPO a été déterminée sur des coupes de cerveau en utilisant du [3H]-PK11195 (Figure 48). Les résultats sont exprimés en pourcentage de liaison du radioligand dans le côté ipsilatéral par rapport au côté controlatéral. Pour les groupes Sham, ce pourcentage de marquage était légèrement supérieur à la valeur théorique de 0% dans le striatum ($p < 0,05$), alors qu'aucune différence significative n'était retrouvée dans la SNc ($p = 0,301$).

Dans le striatum (Figure 48a), le marquage a été significativement augmentée à 3 jpl ($50,9 \pm 9,4\%$ par rapport à la valeur des groupes Sham de $5,4 \pm 1,1\%$, $p < 0,05$). Cette augmentation était du même ordre de grandeur entre le groupe 3 jpl et les groupes 7 et 14 jpl ($57,4 \pm 13,0$ et $47,8 \pm 10,4\%$). A partir de 21 jpl, le marquage a été significativement réduite par rapport à la valeur obtenue à 3 jpl ($24,1 \pm 5,6$, $10,0 \pm 1,8$ et $4,7 \pm 5,5\%$, respectivement à 21, 28 et 56 jpl, $p < 0,05$). En outre, le marquage a également été diminué de manière significative entre 21 et 28 jpl ($p < 0,05$).

Dans la SNc (Figure 48b), nous avons observé une modification non significative du marquage à 3 et 7 jpl par rapport à la valeur des groupes Sham ($1,5 \pm 1,3\%$) ($p > 0,05$). À partir de 14 jpl, la liaison était significativement augmentée par rapport à celle obtenues à 3 et 7 jpl (respectivement $39,2 \pm 4,6$, $-1,3 \pm 5,7$ et $10,4 \pm 7,0\%$, $p < 0,05$). Le marquage était encore significativement élevée à 21 et 28 jpl ($27,9 \pm 3,0$ et $17,3 \pm 3,1\%$) par rapport à 3 jpl, ($p < 0,05$), cependant une diminution significative du marquage avait lieu entre 21 et 28 jpl ($p < 0,05$). Ensuite, à 56 jpl le marquage retrouve une valeur similaire à celle des groupes Sham.

a) Striatum



3 jpl

21 jpl

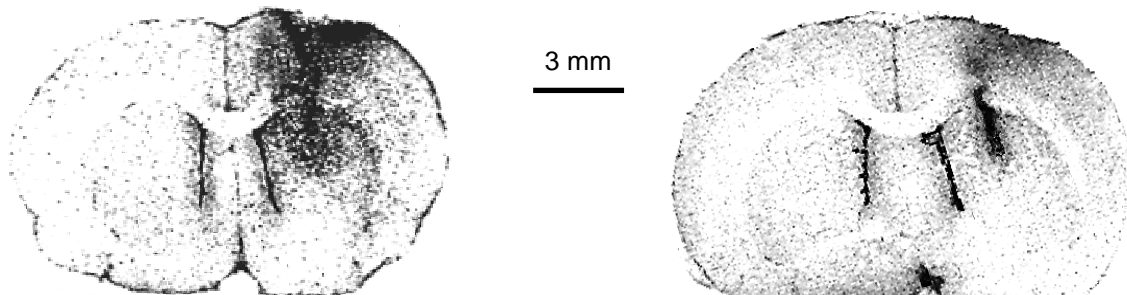


Figure 48(a) : **Etude *in-vitro* par autoradiographie de la densité de la TSPO avec du [3H] PK-11195 dans le striatum.** Les résultats sont exprimés en pourcentage de liaison dans le côté ipsilatéral (lésé) par rapport au côté controlatéral (non-lésé). Chaque valeur est exprimée sous forme de moyenne \pm SEM, n = 5-6 rats pour chaque groupe de sacrifice en fonction du temps. Le niveau de significativité a été fixé à $p < 0,05$; £: significativement différent de la valeur théorique de 0% (test de Wilcoxon), *: significativement différent de la valeur Sham (Test des rangs de Mann-Whitney), ¶: significativement différent de la valeur à 3 jpl (test des rangs de Mann-Whitney), §: significativement différent du groupe précédent (test des rangs de Mann-Whitney). Les images sont représentatives de la liaison à 3 et 21 jours post-lésion (jpl) dans le striatum.

b) Substance noire compacte

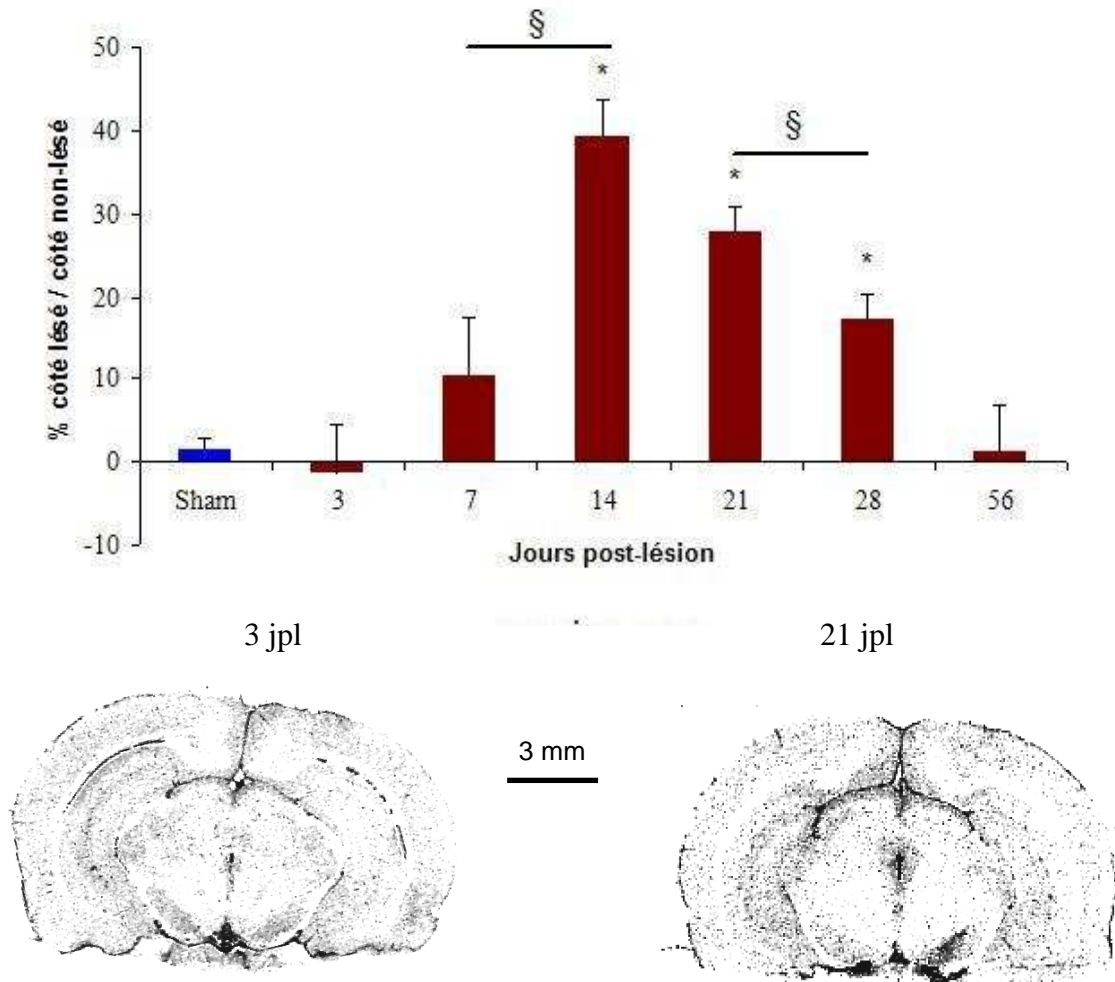


Figure 48(b) : Etude *in-vitro* par autoradiographie de la densité de la TSPO avec du [3H] PK-11195 dans la SNc. Les résultats sont exprimés en pourcentage de liaison dans le côté ipsilatéral (lésé) par rapport au côté controlatéral (non-lésé). Chaque valeur est exprimée sous forme de moyenne \pm SEM, n = 5-6 rats pour chaque groupe de sacrifice en fonction du temps. Le niveau de significativité a été fixé à $p < 0,05$, *: significativement différent de la valeur Sham (Test des rangs de Mann-Whitney), §: significativement différente du groupe précédent (test des rangs de Mann-Whitney). Les images sont représentatives de la liaison à 3 et 21 jours post-lésion (jpl) dans la SNc.

C. Etude ex-vivo de la TSPO par autoradiographie avec du [125I]-CLINDE

L'expression des résultats est la même que celle des études de la densité de la TSPO *in-vitro*.

Dans le striatum (figure 49a), la liaison de [125I]-CLINDE dans le côté lésé (ipsilatéral), 30 minutes après injection, a été augmentée de façon significative à partir de 3 jpl par rapport à la valeur théorique de 0% ($105,0 \pm 5,4\%$, $p < 0,05$). Cette augmentation était similaire pour les groupes 7 et 14 jpl (respectivement, $106,8 \pm 3,3$ et $116,7 \pm 10,3\%$). Le marquage a ensuite significativement diminué entre 14 et 21 jpl ($116,7 \pm 10,3$ et $88,5 \pm 3,5\%$, $p < 0,05$) et entre 28 et 56 jpl ($63,4 \pm 12,7$ et $19,0 \pm 2,2\%$, $p < 0,05$) pour atteindre un niveau faible dans ce dernier groupe.

Dans la SNc (Figure 49b), le marquage de [125I]-CLINDE a été augmentée de façon significative à 3 jpl par rapport à la valeur théorique de 0% ($8,8 \pm 2,0\%$, $p < 0,05$), puis cette valeur a été encore augmentée de manière significative entre 3 et 7 jpl ($20,5 \pm 2,7\%$, $p < 0,05$), mais également entre 7 et 14 jpl ($60,1 \pm 5,1\%$, $p < 0,05$). Après une stabilisation entre 14 et 21 jpl ($51,9 \pm 9,0\%$), la valeur a diminué progressivement entre 21 et 28 jpl ($30,3 \pm 6,6\%$) et de manière significative entre 28 et 56 jpl ($5,0 \pm 1,0\%$, $p < 0,05$) pour atteindre un niveau faible dans ce dernier groupe.

a) Striatum

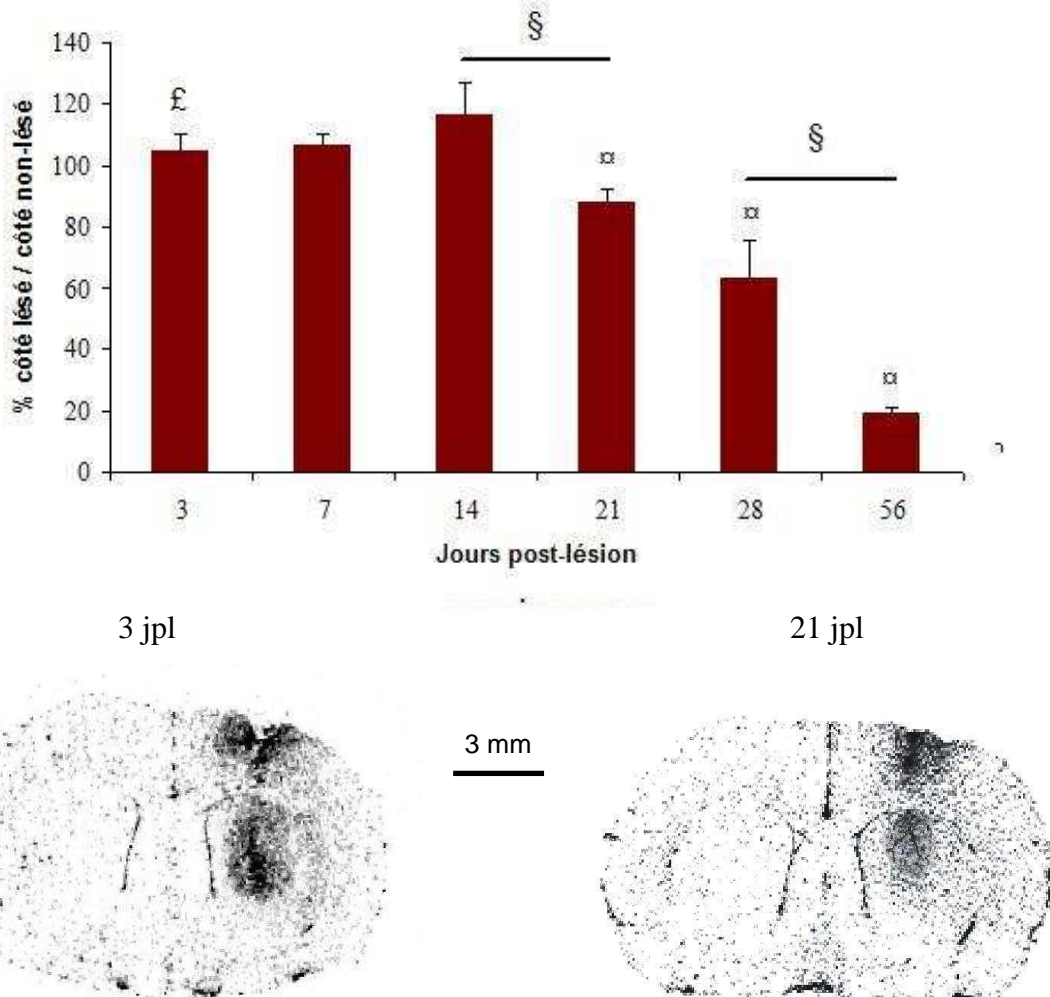


Figure 49(a) : **Etude *ex-vivo* par autoradiographie de la densité de la TSPO avec du [125I]-CLINDE dans le striatum.** Les résultats sont exprimés en pourcentage de liaison dans le côté ipsilatéral (lésé) par rapport au côté controlatéral (non-lésé). Chaque valeur est exprimée sous forme de moyenne \pm SEM, n = 6 rats pour chaque groupe de sacrifice en fonction du temps. Le niveau de significativité a été fixé à $p < 0,05$; £: significativement différent de la valeur théorique de 0% (test de Wilcoxon), ⌘: significativement différent de la valeur à 3 jpl (test des rangs de Mann-Whitney), §: significativement différente du groupe précédent (test des rangs de Mann-Whitney). Les images sont représentatives de la liaison à 3 et 21 jours post-lésion (jpl) dans le striatum.

b) Substance noire compacte

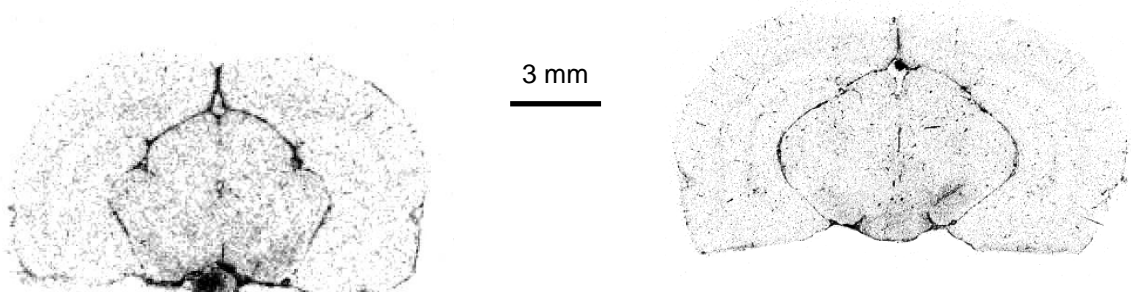
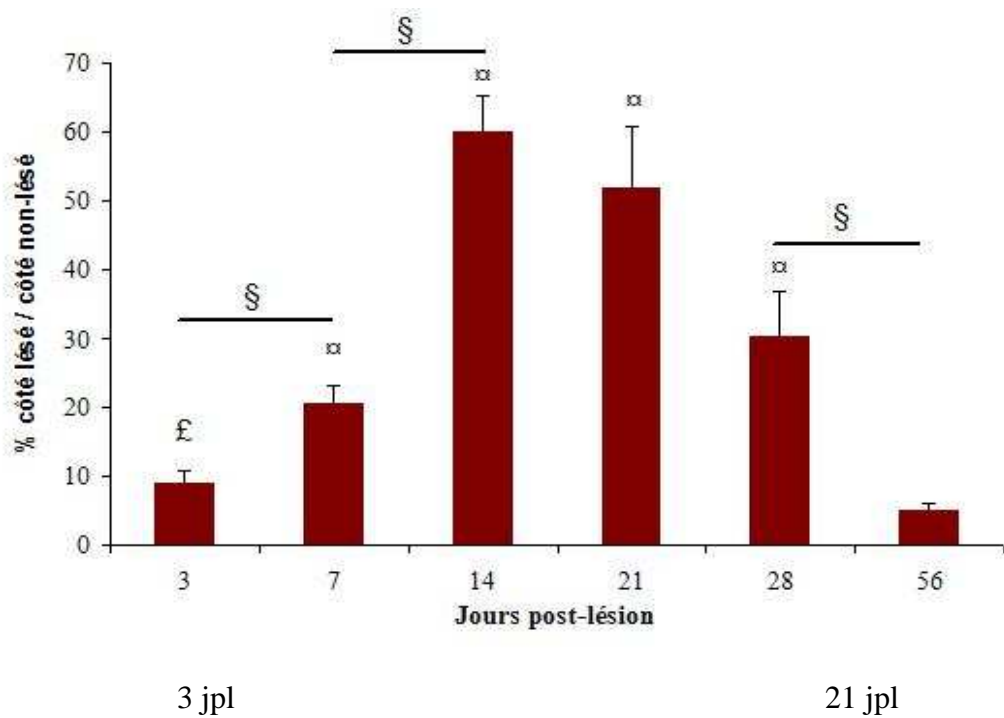


Figure 49(b) : **Etude *ex-vivo* par autoradiographie de la densité de la TSPO avec du [125I]-CLINDE dans la SNc.** Les résultats sont exprimés en pourcentage de liaison dans le côté ipsilatéral (lésé) par rapport au côté controlatéral (non-lésé). Chaque valeur est exprimée sous forme de moyenne \pm SEM, n = 6 rats pour chaque groupe de sacrifice en fonction du temps. Le niveau de significativité a été fixé à $p < 0,05$; £: significativement différent de la valeur théorique de 0% (test de Wilcoxon), ¶: significativement différent de la valeur à 3 jpl (test des rangs de Mann-Whitney), §: significativement différente du groupe précédent (test des rangs de Mann-Whitney). Les images sont représentatives de la liaison à 3 et 21 jours post-lésion (jpl) dans la SNc.

IV. DISCUSSION

Les facteurs étiologiques et les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la perte sélective des neurones dopaminergiques nigro-striés dans la MP sont complexes. Néanmoins, un certain nombre d'études précliniques et cliniques suggèrent que la neuroinflammation pourrait contribuer à l'initiation et / ou à la progression de la maladie. Dans le travail expérimental présenté ici, nous avons suivi en parallèle un biomarqueur de la neuroinflammation, la TSPO, qui est connu pour être surexprimé par les microglies activées, et des biomarqueurs de la neurodégénérescence des neurones dopaminergiques nigro-striés sur une longue période de temps (de 3 à 56 jours post-lésion) dans un modèle de MP chez le rat induit par une lésion striatale partielle à la 6-OHDA.

A. Choix du modèle animal utilisé

L'étude des mécanismes physiopathologiques de la MP repose sur l'utilisation de modèles animaux reproduisant les caractéristiques pathologiques et comportementales de la maladie. Nous avons utilisé un modèle de lésion partielle chez le rat après injection de 2 x 5 µg de 6-OHDA en intra-striatal. Malgré l'apparition récente de nouveaux modèles animaux de la MP comme les modèles transgéniques, le modèle de lésion intracérébrale à la 6-OHDA chez le rat reste l'outil le plus largement utilisé pour induire une lésion nigrostriatale ciblée chez l'animal et ceci pour 4 raisons principales :

1) Il s'agit d'un modèle techniquement facile à obtenir avec un coût relativement faible. En effet, d'un point de vue technique l'injection intra-striatale de 6-OHDA par stéréotaxie est simple à mettre en œuvre chez le rat, contrairement aux injections dans des structures plus petites comme la SNc utilisées également dans des modèles de lésion à la 6-OHDA (Dantresangle et al. 2001) ou dans les modèles d'intoxication au LPS (Gao et al. 2002). Par

ailleurs, la lésion partielle peut être obtenue après une simple injection de 6-OHDA, alors qu'il faut des injections répétées parfois sur plusieurs jours dans d'autres modèles de lésion MPTP (Przedborski et Vila 2003) ou roténone (Betarbet et al. 2000).

2) L'injection intra-striatale unilatérale de 6-OHDA induit un syndrome hémiparkinsonien avec des déficits sensorimoteurs, ce qui permet l'utilisation du test comportemental de rotation, afin de vérifier l'étendue de la lésion, contrairement à d'autres modèles de lésion MPTP qui se révèlent peu fiables aux tests comportementaux (Luchtman et al. 2009). Un autre avantage est la possibilité d'utiliser l'hémisphère intact comme contrôle interne par rapport à l'hémisphère lésé ce qui n'est pas possible dans les autres modèles de MP par injection systémique, comme le modèle MPTP, LPS et les modèles transgéniques.

3) La lésion obtenue par injection de 6-OHDA, soit dans la SNc ou dans le striatum, est hautement reproductible, contrairement à d'autres modèles de lésion MPTP chez le primate non-humain (Elsworth et al. 2000) ou des modèles transgéniques plus récents (Koprach et al. 2010), qui sont touchés par une importante variabilité inter-individuelle. Par ailleurs, une double injection de 6-OHDA permet d'obtenir une lésion contrôlée et stable (Blandini et al. 2008), et induit une très faible mortalité contrairement à d'autres modèles de lésion MPTP par injection systémique (Gerlach et al. 1993) ou les modèles transgéniques (Dawson et al. 2010). Ceci représente une valeur ajoutée considérable du modèle 6-OHDA surtout pour un suivi longitudinal de la lésion et de l'évolution des phénomènes physiopathologiques sur plusieurs semaines ou dans l'évaluation au long cours de nouvelles stratégies thérapeutiques neuroprotectrices.

4) La polyvalence des procédures de lésion à la 6-OHDA, et la diversité des modèles de rats obtenus permet de choisir approximativement les différents stades de la MP humaine que nous désirons imiter, selon le site, la dose et le nombre d'injections de 6-OHDA effectuées. Le modèle de lésion 6-OHDA utilisé ici, induit une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques et de façon rétrograde vers la SNc. La lésion obtenue peut être définie comme modérée (perte de 65-70% du nombre de neurones TH+ dans la SNc et de l'innervation TH+ dans le striatum) ce qui représente un stade précoce de la MP (Bjorklund et al. 1997 ; Kirik et al. 1998). Ce modèle est pertinent si des stratégies thérapeutiques visant à interférer avec le processus neurodégénératif sont à tester, car une lésion à évolution lente au niveau de la SNc sera nécessaire (Armentero et al. 2006). En revanche, les modèles d'injection dans la SNc ou

dans le MBF donneront une lésion complète et immédiate et, par conséquent, une fenêtre thérapeutique pratiquement inaccessible (Henry et al. 2009).

C'est pour ces raisons et par l'expérience que nous en avons au sein de notre laboratoire que le modèle animal de lésion intra-striatal à la 6-OHDA a été choisi dans le cadre du travail expérimental de cette thèse.

B. Profil cinétique de la perte neuronale et de la neuroinflammation

Le travail expérimental de cette thèse a permis de définir, en parallèle, dans un modèle animal de rat lésé à la 6-OHDA, les profils cinétiques des deux phénomènes physiopathologiques que sont la dégénérescence neuronale dopaminergique et la neuroinflammation à travers la quantification de biomarqueurs de la perte neuronale (TH-i et DAT) et de l'activation microgliale (TSPO).

1. Profil cinétique de la perte neuronale

Concernant les biomarqueurs de la perte neuronale, dans le striatum, nous observons une réduction significative de l'immunoréactivité anti-TH (TH-i) dès 7 jpl avec une diminution de 31% en comparaison avec les valeurs du groupe Sham. Cette réduction reste significative entre 7 jpl et 21 jpl où elle atteint -64%. A partir de 21 jpl et jusqu'à 56 jpl cette réduction est stabilisée. Concernant l'évolution de la densité du DAT, nous observons une réduction significative précoce, dès 3 jpl avec une diminution de 48% en comparaison avec les valeurs du groupe Sham. Cette réduction reste significative entre 3 jpl et 7 jpl où elle atteint -68%. A partir de 7 jpl et jusqu'à 56 jpl cette réduction semble stabilisée. Un des premiers résultats qu'il est intéressant de relever est le décalage dans le temps entre la réduction significative de la TH-i et du DAT. En effet, la réduction de la densité du DAT dans le striatum, c'est à dire le site de la lésion, est plus importante et survient plus tôt par rapport à la réduction de TH-i, montrant ainsi une moindre vulnérabilité apparente de la TH-i par rapport à la densité du DAT. Cela peut s'expliquer si une fraction des neurones nigro-striés exprime seulement partiellement un

phénotype dopaminergique mais pas le DAT, comme ce qui est déjà décrit dans d'autres régions cérébrales (Ugrumov, 2009). Les neurones dopaminergiques présentant un défaut d'expression du DAT deviendraient ainsi moins vulnérables aux effets neurotoxiques de la 6-OHDA qui pénètre à l'intérieur des neurones par l'intermédiaire de ce transporteur. De plus, il est important de rappeler que la TH est également exprimée dans les autres neurones catécholaminergiques et n'est donc pas un marqueur spécifique des neurones dopaminergiques contrairement au DAT (Ciliax et al. 1995). Par ailleurs, il a été observé dans le modèle animal de lésion à la 6-OHDA que la dégénérescence initiale des neurones dopaminergiques activerait dans le striatum un métabolisme compensatoire de la DA par les neurones survivants au niveau présynaptique, se traduisant par une augmentation de l'expression des enzymes du métabolisme de la DA comme la TH. (Altar et al. 1989 ; Snyder et al. 1990). Ce phénomène pourrait expliquer la légère augmentation de la TH-i à 3 jpl.

Il est par ailleurs intéressant de relever que la TH-i est un marqueur du métabolisme de la DA (Goldstein et Lieberman 1992) alors que la densité du DAT est un biomarqueur qui reflète directement l'intégrité des neurones dopaminergiques (Benamer et al. 2000). Ceci peut expliquer que nous ayons pu observer dans le striatum une légère augmentation de la TH-i à 3 jpl mais pas de la densité du DAT. Ce résultat pourrait sembler en contradiction avec les conclusions de plusieurs études décrivant une réduction de la TH-i aux temps précoces après une lésion à la 6-OHDA (Blandini et al, 2007 ; Sanchez-Iglesias et al, 2009). Cependant, notre résultat est en accord avec d'autres données montrant une augmentation de la TH-i dans des parties spécifiques du striatum de rats qui ont subi une lésion partielle et très focalisée de la voie nigro-striée, ce qui suggère que cette activité enzymatique accrue pourrait être un mécanisme de compensation de la lésion comme ce qui existe dans les stades précoces de la MP humaine (Dentresangle et al, 2001 ; Dzahini et al, 2010). De plus, dans le modèle de lésion utilisé ici, nous avons évalué la TH-i dans l'ensemble du striatum sans aucune distinction entre les zones lésées et celles potentiellement non lésées qui sont de façon transitoire des zones "hyperactives" de métabolisme dopaminergique à travers le mécanisme de compensation neuronale, ce qui vient en appui d'une telle observation.

Au niveau de la SNc, à 3 jpl, la TH-i n'est pas diminuée et nous observons une augmentation légère mais significative de la densité du DAT. Une réduction significative d'environ 23% pour la TH-i et de 20% pour la densité du DAT est ensuite observée à partir de 7 jpl. D'autre part, les profils cinétiques des deux biomarqueurs dans la SNc, de 14 jpl à 56 jpl, sont très similaires avec une diminution stabilisée d'environ 60% pour la TH-i et de 50% pour la densité du DAT. L'augmentation de la densité du DAT à 3 jpl pourrait être expliquée par l'activation de la

libération compensatoire de la DA par les neurones survivants qui serait liée en partie à l'activation du mécanisme de transport inverse induisant une augmentation de la densité du DAT (Middleton et al. 2007 ; Leviel 2011).

Par ailleurs, l'ensemble de nos résultats est en accord avec un retard d'apparition de la dégénérescence des corps cellulaires des neurones dopaminergiques par rapport à celle des terminaisons striatales qui se produit normalement dans les modèles rétrogrades de lésion à la 6-OHDA (Blandini et al. 2007; Ichitani. et al, 1994 ; Sauer et Oertel, 1994 ; Walsh et al. 2011). Enfin, le degré de la lésion au niveau de la SNc obtenu ici dans le modèle animal utilisé est en accord avec d'autres données de la littérature. En effet, l'injection en intrastriatal de la 6-OHDA induit une lésion au niveau de la SNc moins marquée, restant confinée entre 50 et 70%, que lors d'injections de la neurotoxine directement dans la SNc (Deumens et al. 2002 ; Blandini et al. 2008).

Nos résultats soulignent par ailleurs que la technique d'imagerie moléculaire par autoradiographie utilisant des radioligands sélectifs combinée avec la technique d'immunohistochimie fournit des informations complémentaires concernant l'atteinte neuronale et permet de suivre la progression de maladies neurodégénératives telles que la MP, en préclinique, dans des modèles animaux.

2. Profil cinétique de la neuroinflammation

Nous avons, en parallèle de la perte neuronale dopaminergique, évalué la densité de la TSPO comme biomarqueur de l'activation microgliale *in-vitro* en utilisant le [3H]-PK11195 comme radioligand sur des coupes de cerveau adjacentes à celles utilisées pour la détermination de la TH-i et de la densité du DAT. Au niveau du striatum, nous avons observé une augmentation précoce de 51 % à 3 jpl, 57 % à 7 jpl et 48 % à 14 jpl de la fixation du radioligand par rapport à la valeur des groupes Sham, suivie d'un retour progressif à des niveaux de base entre 21 jpl et 56 jpl où nous observons un marquage quasi similaire des côtés lésés et non-lésés, du même ordre de grandeur que pour les groupes Sham.

Le profil de fixation du [3H]-PK11195 dans la SNc est différent de celui du striatum, avec une augmentation plus progressive commençant à 3 jpl et culminant à 14 jpl, avec une augmentation de 40% du côté lésé par rapport au côté non-lésé, suivie d'une diminution

également progressive jusqu'à un niveau de base à 56 jpl comme dans le striatum. La légère mais significative augmentation de la fixation du [3H]-PK11195 dans le striatum pour les groupes Sham reflète probablement la présence de la lésion mécanique due au passage de l'aiguille dans les tissus neuronaux des animaux lors de l'injection de la 6-OHDA. Cette hypothèse est corroborée par la présence d'un marquage du [3H]-PK11195 au niveau du cortex du côté lésé, ce marquage diminue lorsque le nombre de jour post-lésion augmente.

Pour élargir les résultats obtenus *in-vitro*, nous avons mesuré la densité de la TSPO par l'accumulation cérébrale *ex-vivo* d'un autre radioligand, le [125I]-CLINDE. Il s'agit d'une méthode qui permet d'établir, chez les animaux vivants, la répartition des cellules microgliales activées dans l'ensemble des structures cérébrales à travers la fixation du radioligand. Nous avons obtenu un profil de fixation dans le temps similaire à celui obtenu avec les études expérimentales *in-vitro*, à la fois dans le striatum et dans la SNc. Cependant, l'intensité du signal de fixation était deux fois plus élevée avec le [125I]-CLINDE en *ex-vivo* par rapport au [3H]-PK11195 en *in-vitro* dans les deux régions d'intérêt, avec une augmentation de fixation du [125I]-CLINDE d'environ 100% dans le striatum à 3 jpl et 7 jpl et de 60 % dans la SNc à 14 jpl.

Cet écart entre la fixation du CLINDE en *ex-vivo* et du PK11195 en *in-vitro* peut être expliqué par le fait que le mécanisme de la fixation du CLINDE à la TSPO, qui n'est pas encore exactement décrit, pourrait être différent de celui du PK11195 (Doble et al. 1987). Cette hypothèse a été récemment renforcée depuis la caractérisation de l'existence d'un polymorphisme (Ala147Thr) de la TSPO induisant une variabilité interindividuelle de la fixation des radioligands de la TSPO existants (Owen et al. 2011). Cette donnée récente a permis de classer les différents ligands existants selon leur affinité à la TSPO dépendant du phénotype de liaison. Si cette variabilité et ce polymorphisme est transposable à l'animal, ils pourraient expliquer en partie la différence de fixation du [3H]-PK11195 et du [125I]-CLINDE, la famille des dérivés imidazopyridines à laquelle appartient le CLINDE étant plus sensibles que celle des dérivés carboxamides d'isoquinoline à laquelle appartient le PK11195 à la variabilité génétique de la TSPO (Owen et al. 2011).

Par ailleurs, un autre facteur peut expliquer l'écart de fixation des deux radioligands, il s'agit de la différence de distribution du radioligand entre l'expérimentation *in-vitro* et *ex-vivo*. En effet, en *ex-vivo* la distribution est plus localisée et spécifique car elle se fait directement sur le site de fixation par la circulation sanguine minimisant le risque de fixation non-spécifique, alors que en *in-vitro* la distribution est faite sur l'ensemble de la coupe ce qui entraîne un risque de marquage non-spécifique du côté non-lésé et donc par conséquent une fixation relative côté lésé

/ côté non-lésé moins importante. En outre, l'expérimentation *ex-vivo* avec du [125I]-CLINDE a montré que l'augmentation de la densité de la TSPO s'est produite principalement dans le striatum et la SNc, avec également une réponse neuroinflammatoire dans l'aire corticale adjacente au striatum lésé comme ce qui est observé avec le [3H]-PK11195.

Par conséquent, la combinaison des techniques expérimentales *in-vitro* et *ex-vivo* a abouti à des informations complémentaires qui ont permis d'avoir une meilleure compréhension de l'évolution temporelle de la neuroinflammation et des changements neuropathologiques observés après l'administration de 6-OHDA.

3. Profil cinétique de la neuroinflammation / perte neuronale

Du point de vue cinétique, le profil du phénomène neuroinflammatoire que nous avons obtenu durant la longue période de suivi étudiée (de 3 à 56 jpl) a montré qu'il s'agit d'un processus transitoire, à la fois au niveau des terminaisons nerveuses dopaminergiques du striatum ainsi qu'au niveau des corps cellulaires dans la SNc. Par ailleurs, la surexpression de la TSPO est décalée dans le temps au niveau de la SNc par rapport au striatum. En effet, le processus est déjà présent à un niveau maximum dès 3 jpl dans le striatum tandis que son intensité augmente plus progressivement jusqu'à 14 jpl dans la SNc. Ainsi, il existe un retard d'apparition de la neuroinflammation au niveau des corps cellulaires des neurones de la SNc par rapport aux terminaisons nerveuses du striatum, comme ce qui se produit dans les modèles rétrogrades de lésion à la 6-OHDA pour la diminution de la densité des marqueurs des neurones dopaminergiques (TH-i et DAT).

L'apparition d'une neuroinflammation transitoire, observée dans notre travail, a été récemment décrite dans la SNc accompagnée d'une diminution progressive de la TH-i, mais en utilisant un modèle différent du notre dans lequel la 6-OHDA était administrée dans le MBF qui induit une lésion moins progressive que dans notre modèle (Henry et al. 2009). Contrairement à cette dernière étude, un autre travail a permis de décrire la survenue d'un processus neuroinflammatoire dans la SNc dès le 1er jour après une lésion à la 6-OHDA dans le MBF (Marinova-Mutafchieva et al. 2009). Cependant, il n'a pas pu être démontré dans cette étude que cette neuroinflammation était transitoire ou non puisque le suivi cinétique n'a pas dépassé 15 jours après la lésion, or nous avons pu observer dans notre modèle de lésion que la neuroinflammation était fortement exprimée jusqu'à 21 jpl avant une phase de ralentissement.

Par ailleurs, dans une étude plus récente, il a été démontré qu'une diminution significative de la TH-i était observée après une forte lésion striatale à la 6-OHDA (28 µg versus 10 µg dans notre protocole) dès 6 h post-lésion dans le striatum et entre 72 h et 2 semaines post-lésion dans la SNc, alors que l'activation microgliale évaluée par immunohistochimie à l'OX42, anticorps anti-CD11b qui est surexprimé par la microglie lors de la neuroinflammation (Iravani et al. 2005), a eu lieu à 72 h post-lésion dans les deux régions étudiées. Cependant aucune donnée n'a pu être fournie au delà de 2 semaines post-lésion (Walsh et al, 2011).

Par ailleurs, nous avons pu montrer, dans le modèle animal de lésion à la 6-OHDA utilisé, que l'activation de la microglie revient à un état basal à 56 jpl, tandis qu'à ce stade la perte neuronale dopaminergique, à travers les marqueurs TH-i et DAT, est stabilisée depuis 14 jpl avec une réduction de marquage d'environ 50 à 80% au niveau du striatum comme au niveau de la SNc. L'apparition précoce de la neuroinflammation et de la neurodégénérescence observée est certainement la conséquence de l'action neurotoxique de la 6-OHDA qui est connue pour induire un stress oxydatif puissant à travers l'activation microgliale, la production d'espèces oxydatives (ROS), de médiateurs pro-inflammatoires (TNF- α ; IL1- β) et un déficit fonctionnel de la chaîne respiratoire mitochondriale (Blum et al. 2001). Il est suggéré que cette forte activation initiale de la microglie pourrait durer jusqu'à l'installation à long terme de la perte neuronale.

Cette relation en deux phases entre la neuroinflammation et la neurodégénérescence a d'ailleurs été suggérée dans plusieurs études (Tansey et al. 2007 ; Marinova-Mutafchieva et al. 2009). La microglie activée pourrait persister en raison d'une rétro-activation positive de la part des neurones qui dégèrent et qui induisent une réponse immunitaire adaptative contribuant à un cycle d'auto-amplification de l'activation microgliale qui aboutit à la surproduction de médiateurs pro-inflammatoires même lorsque l'agression initiale a cessé. Cette hypothèse a été avancée suite à plusieurs travaux explorant *in-vitro* et *in-vivo* la neuroinflammation en relation avec la MP (Kim et al. 2007 ; Goa et Hong 2008; long-Smith et al. 2009). Certains travaux ont d'ailleurs montré que les neurones endommagés nécrotiques peuvent également activer la microglie environnante ce qui entretiendrait l'activation microgliale et la dégénérescence neuronale (Pais et al. 2008).

Notre travail expérimental a donc permis de mettre en évidence certaines caractéristiques importantes concernant l'évolution dans le temps de la neuroinflammation et de la neurodégénérescence dopaminergique l'une par rapport à l'autre dans un modèle animal de lésion intrastriatale à la 6-OHDA. En particulier la concomitance de l'apparition de ces deux

processus physiopathologiques dans les deux structures neuronales étudiées, le décalage de leur apparition dans la SNc par rapport au striatum, ainsi que la nature transitoire de la neuroinflammation et la persistance de la neurodégénérescence. Ces deux profils cinétiques confirment la pertinence de l'utilisation de ce modèle animal dans l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à interférer avec le processus neurodégénératif, pour lesquelles une lésion à évolution lente au niveau de la SNc est nécessaire, comme par exemple l'administration de facteurs capables de bloquer ou de réduire le processus de la neuroinflammation.

4. Contribution microglie / astroglie dans l'expression de la TSPO

L'étude de la microglie activée à travers la surexpression de la TSPO est un marqueur de la neuroinflammation, cependant la contribution relative de la microglie et de l'astroglie dans l'expression de la TSPO dans le SNC au cours de la neuroinflammation reste un sujet de débat. Un grand nombre de travaux suggère que la densité de la TSPO est augmentée dans la microglie lors des troubles du SNC, avec une contribution secondaire des astrocytes (Venneti et al. 2006 ; Cosenza-Nashat et al ; 2009). Toutefois, cette répartition peut aussi dépendre du modèle animal utilisé (espèce et souche), et de l'évolution dans le temps du processus neuroinflammatoire. Afin de clarifier ce dernier point, plusieurs études ont combiné l'autoradiographie *in-vitro* avec du [3H]-PK11195 ou de l'imagerie TEP avec d'autres radioligands de la TSPO et de l'immunohistochimie sur les astrocytes et la microglie (Chen et al. 2004 ; Màrtin et al. 2010), et ont permis de montrer une fixation précoce uniquement sur les cellules microgliales et plus tardive de façon combinée sur la microglie et les astrocytes, ce qui corrobore l'hypothèse d'une réaction astrocytaire suite au stress oxydatif créé par l'activation microgliale (Hirsch et Hunot, 2009). Néanmoins, Nous n'avons pas investigué ce point dans le travail présenté ici, car ce n'était pas l'un des objectif du travail, mais également pour des raisons techniques, car il aurait fallu pour chaque groupe de lésion dans le temps une autre série d'animaux afin d'effectuer l'immunohistochimie pour les microglies et les astrocytes avec la technique de fixation du tissu cérébral par perfusion.

C. Évaluation du [125I]-CLINDE dans un modèle de lésion à la 6-OHDA

L'imagerie moléculaire semble essentielle pour l'évaluation, le suivi des maladies neurodégénératives avec une composante neuro-inflammatoire telle que la MP, ainsi que le suivi des thérapies neuroprotectrices et anti-inflammatoires expérimentales (Bartels et al. 2010). La protéine TSPO, surexprimée par la microglie activée, semble être une cible moléculaire très pertinente pour le développement de nouveaux radioligands utilisables en imagerie TEMP ou TEP. Le radioligand de référence reste à ce jour le [11C]-PK11195. Les études pré-cliniques dans un modèle animal de MP utilisant le [11C]-PK11195 comme radioligand ont permis de réaliser le suivi de la progression de la neuroinflammation dans l'évolution de la perte neuronale, mais avec un seul temps post-lésionnel (28 jours) contrairement à ce que nous avons fait dans notre étude (Cicchetti et al. 2002). Les études cliniques TEP concernant la MP et utilisant ce radioligand ont permis de détecter les phénomènes neuroinflammatoires en lien avec les aires cérébrales atteintes spécifiquement dans la maladie (Gerhard et al. 2006). Ces résultats ont été obtenus bien que le [11C]-PK11195 souffre d'inconvénients non résolus (rapport signal spécifique / non-spécifique faible ; métabolisme hépatique ; fixation aux protéines plasmatiques élevée) qui rendent difficile la quantification précise des variations de densité de la TSPO (Kropholler et al. 2006). Par conséquent, il y a un intérêt considérable dans le développement de nouveaux radioligands sélectifs et capables de mieux quantifier la TSPO que le [11C]-PK11195 comme alternative pour l'imagerie TEP ou TEMP de l'activation microgliale. Plusieurs molécules prometteuses sont actuellement en cours de validation clinique ou pré-clinique (Chauveau et al. 2008). Deux familles de molécules semblent particulièrement intéressantes, les dérivés pyrazolopyrimidine comme le [18F]-DPA714 (James et al. 2008 ; Arlicot et al. 2012), et les dérivés imidazopyridine acétamide comme le [18F]-PBR111 (Katsifis et al. 2011) et le [123I]-CLINDE (Arlicot et al. 2010). Ce dernier radioligand, développé au sein de notre laboratoire en collaboration avec l'ANSTO, institut de recherche australien, a montré des caractéristiques avantageuses pour l'imagerie TEMP de la TSPO par rapport au [11C]-PK11195, avec un meilleur rapport signal spécifique / non-spécifique, un faible métabolisme plasmatique et cérébral (Mattner et al. 2008).

A ce jour, le CLINDE n'a été évalué que dans des modèles animaux de lésion excitotoxique (Arlicot et al. 2008), d'ischémie cérébrale (Arlicot et al. 2010) et d'intoxication à la cuprizone (Mattner et al 2011). Notre étude est la première qui évalue le CLINDE comme nouveau ligand pour l'imagerie moléculaire de la TSPO dans un modèle animal de lésion à la 6-OHDA. Les résultats obtenus montrent d'excellentes performances du [125I]-CLINDE dans la détection de la neuroinflammation. Il existe une bonne corrélation entre le [3H]-PK11195 et le [125I]-CLINDE concernant les localisations où la densité de la TSPO est augmentée. Le [125I]-CLINDE présente un rapport signal / bruit augmenté par rapport à celui du [3H]-PK11195. Par ailleurs, nos résultats suggèrent une relation quantitative entre le degré de la neuroinflammation et la fixation du [125I]-CLINDE. Nous avons démontré que les différents degrés de surexpression de la TSPO du côté lésé, corrélés à l'intensité de la lésion, peuvent être distingués par le CLINDE. Il en ressort donc que le [125I]-CLINDE est un radioligand intéressant qui pourrait être utilisé pour assurer le suivi du processus neuroinflammatoire dans ce type de modèle animal de la MP. Notre étude peut donc s'inscrire dans le cadre de la validation pré-clinique du CLINDE comme ligand de la TSPO, biomarqueur de l'activation microgliale. Les résultats prometteurs obtenus dans notre étude appuient ceux déjà trouvés dans d'autres travaux et permettent d'envisager une utilisation du CLINDE en imagerie in-vivo de la TSPO, biomarqueur de l'activation microgliale. Dans un premier temps chez des modèles animaux de la MP, cette imagerie in-vivo pourrait être intéressante chez l'homme en imagerie moléculaire TEMP avec du [123I]-CLINDE, dans le diagnostic précoce, le suivi longitudinal de la progression, et le suivi des effets neuroprotecteurs de nouveaux traitements anti-inflammatoires de la MP. Aujourd'hui, la validation du [123I]-CLINDE chez l'homme est en cours. D'ailleurs, ce radioligand fait l'objet d'un essai clinique, dans la détection de l'activation microgliale chez des patients ayant eu un AVC, par l'unité de recherche en neurobiologie de l'université de Copenhague.

V. PERSPECTIVES

A. Utilisation de l'imagerie moléculaire *in-vivo*

La mise en oeuvre de l'imagerie TEMP et/ou TEP chez l'animal *in-vivo*, en particulier le rongeur, est actuellement en plein développement, notamment grâce à l'amélioration des systèmes d'imagerie en termes de résolution et de sensibilité. L'imagerie moléculaire offre ainsi de grandes possibilités dans le suivi quantitatif de biomarqueurs qui signent la survenue et l'évolution de phénomènes physiopathologiques ou qui sont le reflet de l'efficacité d'approches thérapeutiques expérimentales. Un biomarqueur de référence de la neuroinflammation est donc nécessaire et doit, pour être reconnu comme tel, être approprié pour les études en imagerie TEMP et/ou TEP en accord avec l'intérêt grandissant de l'imagerie moléculaire dans les études d'évaluation et d'approbation de nouveaux médicaments (Uppoor et al. 2008). Dans notre étude, nous montrons qu'il devient possible de suivre, dans un modèle animal de lésion à la 6-OHDA, l'efficacité neuroprotectrice d'une approche thérapeutique anti-inflammatoire lorsqu'elle est accessible à l'imagerie moléculaire TEMP ou TEP en utilisant des radioligands spécifiques de biomarqueurs de la neuroinflammation (TSPO) et de la neurodégénérescence (DAT) en parallèle. Il apparaît donc évident que la suite légitime à ce travail expérimental est dans un premier temps le passage à des méthodes d'exploration *in-vivo* à travers l'utilisation de l'imagerie moléculaire de la neuroinflammation par micro-TEMP et surtout micro-TEP en comparant les images avant et après lésion et dans un second temps l'utilisation de cette imagerie *in-vivo* dans l'exploration d'approches thérapeutiques anti-inflammatoires. Cette démarche est par ailleurs séduisante du fait qu'à ce jour, il existe relativement peu d'études utilisant l'imagerie moléculaire de la neuroinflammation dans les modèles animaux de lésion à la 6-OHDA (Cicchetti et al. 2002 ; Sánchez-Pernaute et al. 2004 et Venneti et al. 2007). De plus, la disponibilité de radioligands récemment développés au sein de notre équipe de recherche (Arlicot et al. 2008 ; 2012), tels que le [123I]-CLINDE et le [18F]-DPA714 comme traceurs de la TSPO, biomarqueur de la neuroinflammation, ainsi que le [18F]-LBT999 comme traceur du DAT, biomarqueur de la neurodégénérescence dopaminergique, rend aisée cette

perspective. Dans ce cadre, l'exploration de la neuroinflammation dans le même modèle animal de lésion partielle à la 6-OHDA par imagerie moléculaire avec un micro-TEP et en utilisant en parallèle le [18F]-DPA-714 et le [18F]-LBT999 est en cours au sein de notre laboratoire.

B. Exploration de nouvelles approches thérapeutiques neuroprotectrices et anti-inflammatoires

Aujourd'hui, les grandes études cliniques d'évaluation des traitements neuroprotecteurs et anti-inflammatoires ne sont basées que sur l'évolution des signes cliniques selon les échelles Hoehn et Yahr ou UPDRS (NINDS NET-PD Investigators, Neurology. 2006 ; 2008). Cependant, la notation des symptômes cliniques est une évaluation indirecte de l'atteinte neuronale dopaminergique et médecin dépendant. Par ailleurs, l'effet neuroprotecteur peut être masqué par l'effet symptomatique de la thérapie et cette notation s'avère difficile dans les stades précoces de la maladie (Pavese et al. 2009). L'imagerie moléculaire TEMP ou TEP couplée à un scanner permet de quantifier, à l'échelle moléculaire, des perturbations biochimiques *in-vivo* de manière sensible et sélective. Utilisée chez l'humain, cette méthode montre son intérêt pour progresser dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques, le diagnostic précoce et le suivi d'un certain nombre d'atteintes du SNC dont les maladies neurodégénératives (Bohnen et Frey, 2007). L'imagerie moléculaire s'est révélée être un précieux outil, complémentaire à la classification des symptômes cliniques lors de l'évaluation de nouvelles approches thérapeutiques neuroprotectrices et anti-inflammatoires dans la MP (Bartels et al. 2010 ; Tatsch 2010). En effet, elle permet leur évaluation chez l'homme en fournissant des preuves quantifiables et objectives de la réponse au traitement de façon indirecte à travers l'effet des molécules sur un biomarqueur (récepteur, transporteur) visualisé à l'aide d'un radioligand spécifique.

Bien que le modèle animal de lésion à la 6-OHDA utilisé ici n'induit pas l'apparition de corps de Lewy et ne mime pas toutes les caractéristiques biochimique de la pathologie humaine, nous avons vu qu'il avait l'avantage d'être reproductible, d'induire une perte neuronale progressive et de représenter un stade précoce de la MP. Ses caractéristiques en font un modèle très intéressant pour l'évaluation des approches thérapeutiques neuroprotectrices ayant un effet

d'atténuation de la neuroinflammation à travers le suivi longitudinal de leurs impacts sur la perte neuronale dopaminergique (Armentero et al. 2006). D'ailleurs, dans ce cadre, un projet financé par l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR) associant plusieurs unités INSERM est en cours. Un des volets de ce projet a pour but d'étudier, *in-vivo* dans le même modèle animal de lésion partielle rétrograde à la 6-OHDA, l'activité neuroprotectrice de nouveaux composés de synthèse en suivant l'évolution longitudinale du DAT, biomarqueur de la perte neuronale dopaminergique, par sa quantification en imagerie moléculaire micro-TEP en utilisant du [18F]-LBT999, radioligand développé au sein de notre laboratoire (Chalon et al. 2006 ; Saba et al. 2007).

Les résultats obtenus concernant l'évolution de la TSPO et du DAT, biomarqueurs de l'activation microgliale et de la dégénérescence neuronale, permettent d'envisager la définition de protocoles d'évaluations de thérapies expérimentales anti-inflammatoires ou neuroprotectrices. En effet, en se basant sur la cinétique de survenue et de progression des deux phénomènes physiopathologiques dans un modèle animal reflétant un stade précoce de la MP humaine, il apparaît opportun d'instaurer de façon précoce, avant le début de la perte neuronale, l'administration de molécules capables de bloquer ou de réduire la neuroinflammation. Plusieurs études *in-vivo* utilisant des modèles animaux de lésion à la 6-OHDA ont montré un effet neuroprotecteur suite à l'administration d'agents capables d'inhiber ou de ralentir l'activation microgliale, comme la minocycline (Quintero et al. 2006), les statines (Yan et al. 2011), les facteurs neurotrophiques comme le GDNF (Johnston et al. 2008) et la fractalkine (Pabon et al. 2011) ou les inhibiteurs d'enzymes oxydatives comme la iNOS (Broom et al. 2011). Par ailleurs, certaines études cliniques indiquent que l'introduction précoce d'un médicament neuroprotecteur ou qui supprime l'activation microgliale comme la sélégiline (Zhao et al. 2011), la créatine ou la minocycline (NINDS NET-PD investigators, 2006 ; 2008) chez les patients parkinsoniens est favorable dans le ralentissement de la progression de la neurodégénérescence. Enfin, les nouvelles approches thérapeutiques de la MP basée sur l'alimentation et l'utilisation de « nutricaments » comme les acides gras polyinsaturés n-3 (De Lau et al. 2005) et les vitamines A, E (Miyake et al. 2011) ont montré un effet préventif sur la neurodégénérescence à travers un effet anti-inflammatoire lorsqu'elles sont administrées au long cours avant l'apparition clinique de la MP. Ces résultats soutiennent l'hypothèse de l'existence d'une « fenêtre thérapeutique » favorisant l'efficacité des traitements potentiels de la MP. Celle-ci doit être la plus précoce possible lors du déclenchement physiopathologique de la maladie et peut même être définie comme antérieure chez les patients ayant des facteurs de risque. Néanmoins, les études précliniques d'évaluation d'agents thérapeutiques anti-inflammatoires

qui ont montré un résultat positif sont généralement réalisées par l'administration avant ou en même temps de la lésion neurotoxique et ne tiennent pas compte du fait que le processus de la maladie est connu chez les patients à partir du diagnostic. C'est peut-être pour cette raison que les résultats des essais cliniques évaluant des composés anti-inflammatoires comme les AINS (Ton et al. 2006) ou les statines (Mikaye et al. 2010) ont été modestes. Par ailleurs, il a été suggéré qu'étant donnée l'origine multifactorielle de l'étiologie de la MP et en raison de la complexité des interactions biochimiques des voies inflammatoires, qu'une approche combinée avec des agents anti-inflammatoires et des agents qui visent à restaurer la perte neuronale soit nécessaire dans le traitement de la maladie (Whitton 2010).

Du point de vue des futures applications cliniques, la détection précoce et l'évaluation de la neuroinflammation avant et après le traitement sont donc des questions centrales dans la mise au point des futurs traitements anti-inflammatoires de la MP, auxquelles l'optimisation de la technique d'imagerie moléculaire TEMP ou TEP *in-vivo* permettra de répondre (Ouchi et al. 2009). Par ailleurs, comme nous l'avons démontré chez l'animal, la détection de la neuroinflammation qui survient de façon concomitante à celle de la perte neuronale dopaminergique mais qui est antérieure à la perte neuronale cliniquement significative, pourrait devenir un enjeu majeur dans la prise en charge pré-symptomatique de la MP chez des patients avec des facteurs de risques génétiques et/ou environnementaux (Ross et Smith 2007). Enfin, les avancées techniques en imagerie moléculaire rendent envisageable la mise en place d'approches thérapeutiques personnalisées avec, l'ajustement des doses thérapeutiques selon l'avancée de la maladie, la prédiction de la réponse clinique et par conséquent la réduction des effets indésirables de ces nouvelles approches (Shen et al. 2011).

CONCLUSION

Les preuves scientifiques sont de plus en plus nombreuses pour admettre que dans le déclenchement et la progression de la MP une composante neuroinflammatoire existe. Cette neuroinflammation est caractérisée par l'activation microgliale qui aboutit à la survenue d'un stress oxydatif, et à la sur-production de médiateurs pro-inflammatoires. L'activation microgliale, localisée dans les voies nigro-striées, induit la neurodégénérescence dopaminergique. En revanche, des questions persistent concernant les relations spacio-temporelles exactes entre la neuroinflammation et la perte neuronale.

Le travail qui fait l'objet de cette thèse est le premier qui procède au suivi en parallèle, dans un modèle animal de MP, de la neuroinflammation et de la neurodégénérescence nigro-striée entre 3 et 56 jours après la lésion à la 6-OHDA en utilisant l'imagerie moléculaire *in-vitro* et *ex-vivo* de la TSPO, marqueur de l'activation microgliale, et du DAT, marqueur de la perte neuronale. Nous avons ainsi pu montrer dans ce modèle animal de la MP que :

- 1) le processus neuroinflammatoire et neurodégénératif se produisent simultanément, la présence transitoire de l'activation microgliale indique qu'elle pourrait être impliquée dans l'installation durable de la perte neuronale dopaminergique. Ces résultats sont clairement compatibles avec l'hypothèse que la perte neuronale résulte d'une réponse à l'activation microgliale précoce et intense, suggérant fortement que la neuroinflammation joue un rôle important dans l'apparition, la progression et l'installation à long terme de la neurodégénérescence. Ces résultats supposent la possibilité d'instaurer des traitements anti-inflammatoires ou neuroprotecteurs de façon précoce dans les premiers jours après la lésion.
- 2) le CLINDE comme ligand de la TSPO présente des caractéristiques meilleures que le PK11195 et semble être un candidat intéressant pour être utilisé comme radioligand en imagerie moléculaire TEMP de la TSPO, biomarqueur de la neuroinflammation.

Maintenant que la cinétique au long cours de la neuroinflammation est bien définie dans ce modèle animal de lésion à la 6-OHDA, la suite logique à ce travail expérimental chez ce modèle est :

- 1) d'explorer les relations entre neuroinflammation et neurodégénérescence en imagerie *in-vivo* en utilisant des méthodes d'imagerie moléculaire comme la micro-TEMP et surtout la micro-TEP, techniques transposables à l'homme et qui offrent chez l'animal des performances en

terme de résolution et de sensibilité inégalables et qui permettent de quantifier l'évolution des biomarqueurs étudiés,

2) d'utiliser l'imagerie TEMP ou TEP *in-vivo* dans l'exploration de nouvelles approches thérapeutiques anti-inflammatoires et neuroprotectrices à travers le profil de fixation des radioligands sur le DAT et la TSPO, biomarqueurs spécifiques de la perte neuronale et de la neuroinflammation, preuves quantifiables et objectives de la réponse à un traitement.

Ces deux perspectives expérimentales sont d'ailleurs en cours au sein de notre laboratoire, en utilisant le même modèle animal de lésion partielle à la 6-OHDA décrit dans ce travail de thèse, par imagerie moléculaire micro-TEP en utilisant en parallèle le [18F]-DPA-714 radioligand de la TSPO et le [18F]-LBT999 radioligand du DAT. La détection précoce et l'évaluation de la neuroinflammation avant et après traitement sont des questions centrales dans la mise au point des futurs traitements anti-inflammatoires de la MP, auxquelles l'optimisation de la technique d'imagerie moléculaire TEMP ou TEP *in-vivo* permettra de répondre.

ANNEXE

Article publié en lien avec la thèse :

Maia S, Arlicot N, Vierron E, Bodard S, Vergote J, Guilloteau D, Chalon S. Longitudinal and parallel monitoring of neuroinflammation and neurodegeneration in a 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Synapse*. 2012 Jul; 66(7):573-83.

Longitudinal and Parallel Monitoring of Neuroinflammation and Neurodegeneration in a 6-Hydroxydopamine Rat Model of Parkinson's Disease

SERGE MAIA,^{1,2,3} NICOLAS ARLICOT,^{1,2,3} EMILIE VIERRON,^{1,2} SYLVIE BODARD,^{1,2}
 JACKIE VERGOTE,^{1,2} DENIS GUILLOTEAU,^{1,2,3} AND SYLVIE CHALON^{1,2,3*}

¹Inserm, U930, Tours, F-37000 France

²Université François Rabelais, Tours, F-37000 France

³CHRU de Tours, Tours, F-37000 France

KEY WORDS 6-hydroxydopamine; microglia; SPECT; TSPO (18 kDa)

ABSTRACT As neuroinflammatory processes are involved in the pathogenesis of Parkinson's disease (PD), we achieved the longitudinal evaluation of them in parallel with the modifications of dopaminergic function at several time-points after 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesion in the rat mimicking an early stage of PD. After unilateral intrastriatal 6-OHDA administration, we quantified the temporal evolution of the 18 kDa translocator protein (TSPO), TH-immunoreactivity and dopamine transporters in the striatum and substantia nigra pars compacta (SNc) from 3- to 56-days postlesion (dpl). Increased binding of TSPO ligands used, i.e., [³H]PK11195 and [¹²⁵I]CLINDE, was observed in the lesioned striatum at 3, 7, and 14 dpl, followed by a progressive return to the basal level at 56 dpl. The binding profile in the SNc showed progressive binding beginning at 3 dpl, peaking at 14 dpl, and progressively decreasing until 56 dpl. In this model, the neuroinflammatory and neurodegenerative processes occurred concomitantly. The transitory occurrence of microglial activation could be involved in the lasting installation of dopaminergic neuron loss. **Synapse 66:573–583, 2012.** © 2012

Wiley Periodicals, Inc.

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is a common, age-related neurodegenerative disease characterized by the progressive degeneration of dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta (SNc) leading to a deficit in dopamine (DA) in the projection areas, i.e., the caudate putamen in the primate brain. This loss is responsible for the motor symptoms occurring in this disease such as bradykinesia, rigidity, and tremor. Although the precise molecular mechanisms causing the degeneration of dopaminergic neurons are still not totally understood, a body of epidemiological, clinical, and experimental evidence indicates that neuroinflammation may have an important role in the pathogenesis of PD (Hirsch and Hunot, 2009; Tansey and Goldberg, 2010; Tansey et al., 2007; Whitton, 2007). The process of neuroinflammation occurs in a number of brain injuries and is in particular characterized by the activation of microglial cells which have the ability to pass from a resting state in the healthy brain to an activated state

associated with a different morphology (Heneka et al., 2010; Kreutzberg, 1996). The role of these activated microglial cells appears to be variable, with both harmful and beneficial effects on brain function, a currently frequently debated subject (Streit and Xue, 2009).

Several studies have provided evidence that dopaminergic cell death is associated with microglial activation in PD patients using both postmortem examination (McGeer et al., 1988, 2001) and PET (positron emission tomography) molecular imaging (Gerhard et al., 2006; Ouchi et al., 2005).

Contract grant sponsor: EC-FP6-project DiMI; Contract grant number: LSHB-CT-2005-512146.

*Correspondence to: S. Chalon, UMR Inserm U930, UFR des Sciences Pharmaceutiques, 31 Avenue Monge, 37200 Tours, France.
 E-mail: sylvie.chalon@univ-tours.fr

Received 22 December 2011; Accepted 24 January 2012

DOI 10.1002/syn.21543

Published online 31 January 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

Study of links between neuroinflammation and neurodegeneration during the course of PD would improve understanding of the physiopathological mechanism and also accessibility to early diagnosis and/or new therapeutic approaches. The current development of noninvasive molecular imaging methods allowing direct monitoring of the neuroinflammation process should be valuable for this purpose. The molecular target of choice in this field is the 18 kDa translocator protein (TSPO), formerly known as the peripheral benzodiazepine receptor (Papadopoulos et al., 2006), which is overexpressed on the surface of the mitochondrial membrane in activated microglia, thus providing a sensitive biomarker for microglial activation associated with neuroinflammation (Chen and Guilarte, 2008). Microglial activation has already been demonstrated in early PD using the TSPO ligand [^{11}C]PK11195 with PET (Gerhard et al., 2006; Ouchi et al., 2005, 2009). However, the use of this tracer is limited by several drawbacks such as the short half-life of [^{11}C] that constrains its availability, associated with poor passage through the blood-brain barrier and high nonspecific binding (Bartels et al., 2010; Venneti et al., 2006). This has led to the current development of alternative PET and SPECT ligands with higher specific binding and better ability to quantify TSPO expression in vivo. Several of these PET tracers such as DAA1106 (Venneti et al., 2007) DPA713 and 714 (Boutin et al., 2007; James et al., 2008) and vinpocetine (Gulyas et al., 2011) have shown promising results and need to be further evaluated for use in human. In parallel, the SPECT tracer CLINDE (6-chloro-2-(4-iodophenyl)-3-(*N,N*-diethyl)-imidazo[1,2-*a*]pyridine-3-acetamide) seems to be highly promising, as it has a high affinity for TSPO (Mattner et al., 2008) and is highly sensitive in detecting the microglial activation following various brain injuries mimicked in animals such as excitotoxicity (Arlicot et al., 2008), stroke (Arlicot et al., 2010), and demyelination processes (Mattner et al., 2011).

In the present study, we used CLINDE to follow the density of the TSPO at several time-points (3, 7, 14, 21, 28, and 56 days) after unilateral 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesion in the rat striatum, a model that produces many of the early stage features of PD. As it is known that the rodent brain, with the exception of the olfactory bulbs and choroid plexus, express undetectable TSPO levels in the absence of neuroinflammatory challenge (Benavides et al., 1983), the levels of TSPO in the lesioned side of brain were compared to the intact side in a same animal, and to sham-lesioned rats. In complementary experiments, we also studied the TSPO using a reference method of in vitro autoradiography with [^3H]PK11195, and the degeneration of nigro-striatal dopaminergic neurons using two markers, i.e., tyrosine hydroxylase immunoreactivity (TH-i) and dopamine transporter

(DAT) density. The DAT density was measured using the high specific radioactive probe *N*-(3-iodopro-2-enyl)-2 β -carbomethoxy-3 β -(4'-methylphenyl) nortropine (PE2I) now widely used (Emond et al., 2008).

MATERIALS AND METHODS

Animals and radioligands

All procedures were conducted in accordance with the requirements of the European Community Council for the care of laboratory animal's 86/609/EEC and after approval of the regional ethical committee (INSERM37-002). Experiments were carried out on adult Wistar rats (CERJ, Le Genest-St-Isle, France) weighing 250–300 g at the beginning of the experiment. Animals were housed in groups of three per cage in a temperature and humidity controlled environment (temperature $22^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$; hygrometry $40\% \pm 7\%$), under a 12 h light/dark cycle with food and water available ad libitum.

[^{125}I]PE2I and [^{125}I]CLINDE were prepared in our facilities as previously described (Arlicot et al., 2008; Chalon et al., 1999) and obtained with a specific activity of $80 \text{ GBq } \mu\text{mol}^{-1}$; [^3H]PK11195 was purchased from Perkin Elmer (specific activity $3.14 \text{ GBq } \mu\text{mol}^{-1}$).

Surgery

Twenty minutes before surgery, animals were injected i.p. with pargyline (50 mg kg^{-1}), (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). Rats were then anesthetized with isoflurane (4% , 500 mL min^{-1}) and placed on a stereotaxic apparatus (Stoelting, Phymep, Paris, France). They were maintained under isoflurane 2.5% (500 mL min^{-1}) during surgery. The skull was exposed and small holes were made with a dental drill. Lesion was carried out by unilateral intrastriatal injection of 6-OHDA hydrochloride (1 mg mL^{-1}). A total of $10 \mu\text{g}$ of 6-OHDA was administered in two points of the right striatum (1 mg mL^{-1} in 0.01% ascorbic acid, pH 4.5, i.e., $5 \mu\text{g}$ in $5 \mu\text{L}$ for each point) with a Hamilton syringe (gauge 25, Hamilton, Massy, France) at a flow rate of $1 \mu\text{L min}^{-1}$. Coordinates from bregma were AP = $+0.5 \text{ mm}$, L = -2.5 mm , P = -5 mm , and AP = -0.5 mm , L = -4.2 mm , P = -5 mm according to (Paxinos and Watson, 1986). The syringe was left in place for 4 min after injection and then removed slowly to optimize toxin diffusion. Sham animals received the 6-OHDA vehicle in same experimental conditions.

Study design

A total of 96 animals were used, 72 lesioned with 6-OHDA and 24 receiving 6-OHDA vehicle (Sham). They were divided into six subgroups of 16 according

to the time of sacrificing, i.e., 3, 7, 14, 21, 28, or 56 days postlesion (dpl).

In the first set of experiments, (6-OHDA group, $n = 6$; Sham group, $n = 4$), the effects of 6-OHDA lesion were evaluated on TH-i and DAT and TSPO densities in vitro using anti-TH antibody, [125 I]PE2I, and [3 H]PK11195 as markers, respectively.

In the second set of experiment, (6-OHDA group, $n = 6$), activated microglia expression was evaluated through ex vivo brain quantitative autoradiography using the TSPO radioligand [125 I]CLINDE.

Rotational behavior

All animals were tested for their rotational behavior in response to D-amphetamine sulphate injection (3 mg kg $^{-1}$ i.p., Sigma) 1-week postlesion. No tests were performed for animals studied at 3 dpl. For the test, animals were injected with amphetamine, placed in automated rotometer bowls (Imetronic, Pessac, France), and 15 min later left and right full body turns were monitored by a computer for 90 min. The 6-OHDA-lesioned animals showing on average more than five ipsilateral turns per min were selected for experiments. Results were expressed as mean numbers of ipsilateral turns/min \pm SEM.

In vitro studies on brain sections

After sacrifice, brains were removed and frozen in isopentane cooled to -35°C . Coronal sections (20 μm thickness) were then cut in a cryostat microtome (Jung CM 3000, Leica) and thaw-mounted on SuperFrostPlus[®] slides (CML, Nemours, France). Sections were kept at -80°C until use. Immunohistochemical and autoradiographic experiments were performed on consecutive sections from each brain, either at the level of the 6-OHDA or vehicle injected striatum [AP coordinates between +0.5 and -0.5 from the bregma according to the atlas of Paxinos and Watson, (Paxinos and Watson, 1986)] or in the substantia nigra pars compacta (SNc), (AP coordinates between -5 and -6 from the bregma). For each animal, we compared the ipsilateral lesioned side of the brain in the region of the striatum or SNc to the intact controlateral side.

Anti-TH immunohistochemistry

Sections were fixed with 4% PFA (Merck, Fontenay-sous-Bois, France) for 30 min at room temperature and washed in PBS (0.1 M). Endogenous peroxidase activity was blocked with H $_2$ O $_2$ (0.5%, 100 μL per section, 5 min). Slides were washed and incubated in a serum solution (10% goat serum, 0.1% tween and 1% gelatin in 0.1 M PBS) for 30 min, washed twice with PBS and then incubated in anti-TH antibody solution (rabbit polyclonal anti-rat, 1/400; Euromedex,

TABLE I. Experimental in vitro binding conditions

Tracer	[125 I]PE2I	[3 H]PK11195
Concentration (nM)	0.1	1
Specific activity (GBq μmol^{-1})	80	3.14
Buffer	PBS buffer (0.1 M, pH 7.4) containing 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10.14 mM Na $_2$ HPO $_4$, 1.76 mM KH $_2$ PO $_4$ and 109 g/l D-saccharose	Tris HCl buffer (50 mM, pH 7.4)
Incubation duration at RT (min)	120	30
Competitor for nonspecific binding	Cocaine 100 μM (Cooper, France)	PK11195 1 μM (Sigma, France)

Mundolsheim, France) for 3 h. Control sections were incubated with serum solution. For staining, a biotinylated rabbit anti-rabbit IgG and peroxidase-labeled streptavidin (ABC kit, Abcys, Paris, France) were used, then revealed with 3,3' diaminobenzidine tetrachloride (DAB) (Sigma). Sections were washed twice with PBS (0.1 M) and dried for 1 h at room temperature, followed by fixation with histoclear and mounted with Pertex[®] mounting medium. Three sections of each cerebral area were quantified for each animal and the average was calculated.

Quantification of immunoreactive TH fibers was performed indirectly in the striatum by quantifying the white light absorption rate across the tissue using a computerized image analysis system (Sony) and Histolab software (Microvision Instruments, Evry, Paris). The number of TH+ neurons in the SNc was counted on the ipsilateral and controlateral sides using the Histolab software. The results were expressed as the percentage of staining on the ipsilateral compared to controlateral side.

In vitro autoradiographic study of the DAT and TSPO

The density of brain-specific DAT and TSPO binding sites was measured by in vitro autoradiographic experiments using [125 I]PE2I and [3 H]PK11195, respectively. In vitro binding conditions are summarized in Table I.

Briefly, brain sections were incubated in buffer together with the radioligand. Nonspecific binding was assessed by incubation of adjacent sections in the presence of the appropriate competitor. Sections were then rinsed twice in ice-cold buffer for 20 min, dipped in distilled water at 4°C and dried at RT. Slides together with calibrated ^{125}I microscales ([125 I]PE2I) or ^3H microscales ([^3H]PK11195) were exposed for 24 h ([125 I]PE2I) or 10 weeks ([^3H]PK11195) to sensitive films (Biomax MR[®] Kodak, VWR, France) which were then developed (Kodak L24 developer), fixed (Kodak 3000 fixative) and dried. Autoradiograms

Synapse

were scanned (Scanner Epson Perfection 4870 Photo) and analyzed.

Quantification of autoradiographic images was performed using Beta-vision+ software (Biospace, Paris, France). The proportions of total binding (TB) and nonspecific binding (NSB) were measured on at least three sections for each animal. The specific binding value (SB) was determined as SB = TB minus NSB. We used the DAT or TSPO expression in the striatum and SNc (identified by visual inspection of the radioactive signal) to delineate regions of interest (ROIs). ROIs were defined manually on the ipsilateral side showing high radioligand uptake (ROI-1), and mirror ROIs (ROI-2) were drawn symmetrically in the homologous contralateral region. The results were expressed as the percentage of binding on the ipsilateral compared to contralateral side.

Ex vivo autoradiographic study of TSPO through cerebral biodistribution of [¹²⁵I]CLINDE

Six lesioned rats per group (3, 7, 14, 21, 28, and 56 dpl) were injected i.v. (tail vein) with 2-2.5 MBq of [¹²⁵I]CLINDE [specific activity 80 GBq μmol⁻¹ (Arlicot et al., 2008)] in 300–400 μL saline. Animals were sacrificed 30-min post [¹²⁵I]CLINDE injection. Brains were removed and frozen in isopentane cooled to -35°C. Coronal sections (20-μm thick) were then cut in the region of the striatum and SNc (stereotaxic coordinates as above), exposed on films for 10 days and revealed as described above. Quantitative analysis was performed on autoradiograms, as previously described for in vitro studies.

Statistical analysis

All values were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Comparisons between the percentages of binding in the lesioned vs. intact sides and theoretical values were performed using the Wilcoxon signed-rank test. To compare the rotational behavior between groups, the percentages of binding between 6-OHDA groups and the percentages of binding between Sham groups (3, 7, 14, 21, 28, and 56 dpl), we used the Kruskal–Wallis rank sum test. When global *P* values were obtained, pairwise comparisons were performed using the Mann–Whitney rank sum test. All tests were two-sided. The significance level was set at *P* < 0.05. Statistical analyses were performed using the R software version 2.12.2 (R, 2011).

RESULTS

Rotational behavior

The intensity of rotational behavior evaluated 1-week postlesion for 90 min following D-amphetamine injection was similar for all 6-OHDA groups tested

(*P* = 0.593). The mean ± SEM of turns per min was 8.9 ± 1.2, 9.8 ± 1.6, 7.9 ± 1.1, 10.4 ± 1.6, and 11.2 ± 1.8, for the 7, 14, 21, 28, and 56 dpl groups, respectively.

The intensity of rotational behavior was also similar for all Sham groups tested (*P* = 0.117). The mean ± SEM of turns per min was 2.0 ± 0.6, 2.4 ± 0.5, 1.6 ± 0.4, 0.8 ± 0.4, and 0.9 ± 0.4, for the 7, 14, 21, 28, and 56 dpl groups, respectively.

The intensity of rotational behavior was significantly different (*P* < 0.05) between 6-OHDA and Sham animals for each group tested.

In vitro studies on brain sections

Sham animals

Regardless the marker studied, i.e., the TH-i, DAT, or TSPO, there was no significant difference in the percentage of binding in lesioned vs. intact side. That is why all sham groups were combined into a single bar “Sham” on histograms.

Anti-TH immunohistochemistry

Anti-TH immunoreactivity was expressed as the percentage of staining on the ipsilateral (lesioned) compared to the intact side (Fig. 1). This percentage was no significantly different with the theoretical value of 100% in the Sham group (*P* = 0.195 and 0.683 for the striatum and the SNc, respectively).

In the striatum (Fig. 1a), the staining was slightly increased at 3 dpl, (110.0% ± 2.9%, *P* < 0.05 compared to the Sham group value of 101.1% ± 0.7%). From 7 to 56 dpl, the percentage of staining was significantly decreased in each 6-OHDA group (*P* < 0.05 vs. Sham). A significant reduction (*P* < 0.05) was observed between 3 and 7 dpl, 7 and 14 dpl, 14 and 21 dpl (69.6% ± 3.3%, 54.9% ± 2.9%, and 35.8% ± 3.9%, for 7, 14, and 21 dpl, respectively). The reduction seemed then to stabilize as no significant difference occurred between 21, 28, and 56 dpl (35.8% ± 3.9%, 40.0% ± 3.0%, and 48.1% ± 6.6%, respectively).

In the SNc (Fig. 1b), the staining was nonsignificantly decreased at 3 dpl (92.9% ± 5.9%, *P* > 0.05 compared to the Sham group value of 98.4% ± 1.3%). From 7 to 56 dpl, the percentage of staining was significantly decreased in each 6-OHDA group (*P* < 0.05 vs. Sham). At 7 dpl, the percentage of staining was significantly reduced compared to the value obtained at 3 dpl (75.5% ± 3.6% vs. 92.9% ± 5.9%, *P* < 0.05). There was then a significant decrease between 7 and 14 dpl (*P* < 0.05) followed by stabilization of the staining level (44.1% ± 4.0%, 31.6% ± 2.9%, 35.7% ± 4.0%, and 45.6% ± 6.1% at 14, 21, 28, and 56 dpl, respectively).

Autoradiographic study of the DAT

The DAT density was evaluated using in vitro [¹²⁵I]PE2I binding on brain sections (Fig. 2). This

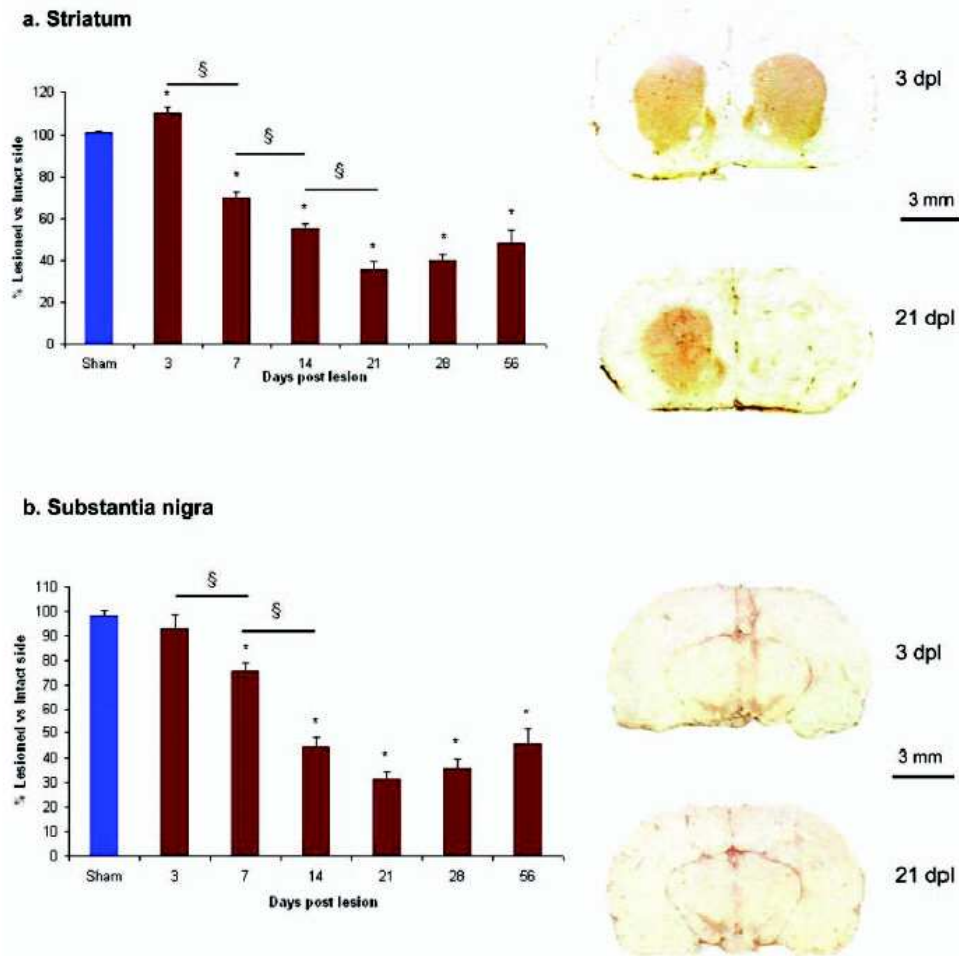


Fig. 1. Immunoreactive TH (TH-i) in the striatum and SNc. Immunostaining was assessed in the striatum by quantification of the density of TH+ fibers (a) and in the SNc by counting TH+ neuronal cell bodies (b). Results are expressed as the percentage of TH-i in the ipsilateral (lesioned) compared to the contralateral (intact) side. Each value is calculated as mean \pm SEM; $n = 5-6$ for each time-point. The significance level was set at $P < 0.05$; *: significantly dif-

ferent from the Sham value (Mann-Whitney rank sum test), §: significantly different from the previous time-point (Mann-Whitney rank sum test). Images are representative of the staining at 3 and 21 days postlesion (dpl) in the striatum (a) and SNc (b). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

percentage was no significantly different with the theoretical value of 100% in the Sham group ($P = 0.952$ and 0.094 for the striatum and the SNc, respectively).

In the striatum (Fig. 2a), the [125 I]PE2I binding showed an early loss of DAT on the lesioned side ($51.5\% \pm 7.1\%$ binding at 3 dpl, $P < 0.05$ compared to the Sham group value of $99.8\% \pm 0.8\%$). The level was then significantly decreased between 3 and 7 dpl ($51.5\% \pm 7.1\%$ vs. $31.8\% \pm 4.1\%$, $P < 0.05$). The values obtained at 14, 21, 28, and 56 dpl were then sig-

nificantly lower than that obtained at 3 dpl ($18.8\% \pm 5.3\%$, $23.3\% \pm 2.8\%$, $18.2\% \pm 3.0\%$, and $26.6\% \pm 4.6\%$, respectively, $P < 0.05$) but were not significantly different from the 7 dpl value.

In the SNc (Fig. 2b), the [125 I]PE2I binding was slightly increased on the lesioned compared to the intact side at 3 dpl ($114.8\% \pm 4.0\%$, $P < 0.05$ compared to the Sham group value $102.4\% \pm 1.1\%$). This level was then significantly decreased between 3 and 7 dpl ($82.0\% \pm 6.5\%$, $P < 0.05$). The values obtained

Synapse

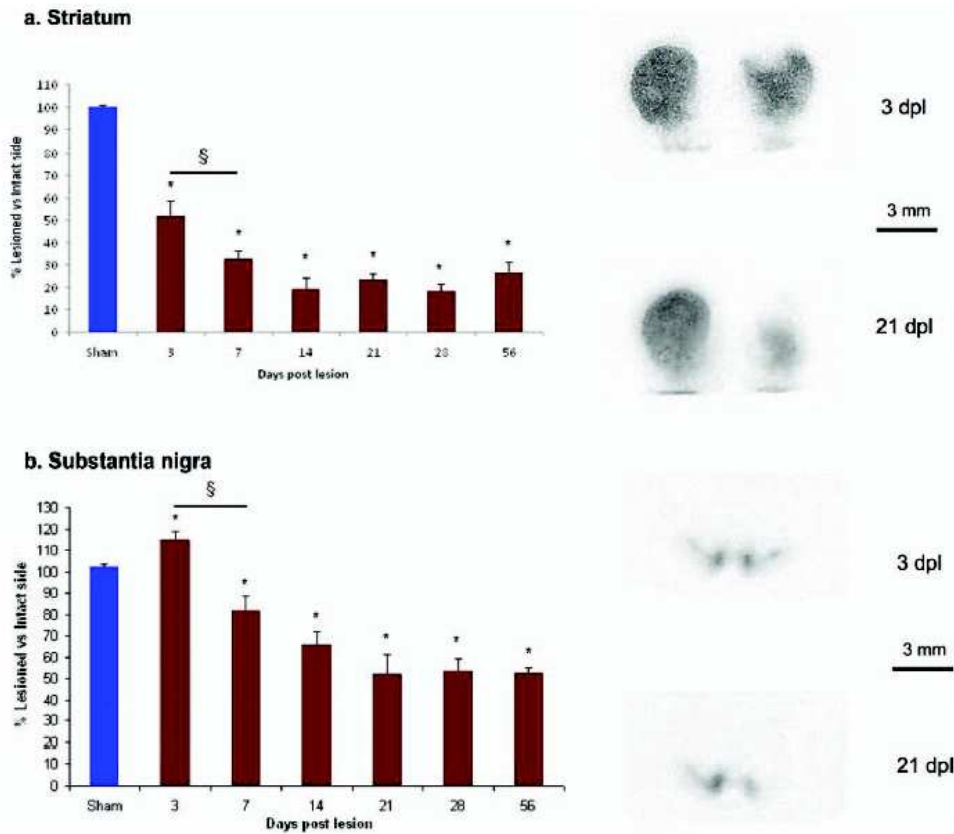


Fig. 2. In vitro autoradiographic study of the DAT with [125 I]PE2I in the striatum and SNc. Results are expressed as the percentage of binding in the ipsilateral (lesioned) compared to the contralateral (intact) side. Each value is calculated as mean \pm SEM; $n = 5-6$ for each time-point. The significance level was set at $P < 0.05$; *: significantly different from the Sham value (Mann-

Whitney rank sum test), §: significantly different from the previous time-point (Mann-Whitney rank sum test). Images are representative of the binding at 3 and 21 days postlesion (dpl) in the striatum (a) and SNc (b). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

at 14, 21, 28, and 56 dpl were then significantly lower than the value obtained at 3 dpl ($65.6\% \pm 5.7\%$, $52.3\% \pm 8.0\%$, $53.8\% \pm 5.0\%$, and $52.6\% \pm 2.1\%$, $P < 0.05$) but not significantly different between them.

Autoradiographic study of the TSPO

The density of TSPO was determined on adjacent brain sections using [3 H]PK11195 (Fig. 3). For the sham group, the percentage of binding on the lesioned side was slightly higher than the theoretical value of 0% in the striatum ($P < 0.05$), whereas no significant difference occurred in the SNc ($P = 0.301$).

In the striatum (Fig. 3a), the binding was increased at 3 dpl ($50.9\% \pm 9.4\%$, $P < 0.05$ compared to the Sham group value of $5.4\% \pm 1.1\%$). This increase was

Synapse

then similar in the 3 dpl group and in the 7 and 14 dpl groups ($57.4\% \pm 13.0\%$ and $47.8\% \pm 10.4\%$, respectively). From 21 dpl, the binding was significantly reduced in comparison to the 3 dpl value ($24.1\% \pm 5.6\%$, $10.0\% \pm 1.8\%$, and $4.7\% \pm 5.5\%$ at 21, 28, and 56 dpl, respectively, $P < 0.05$). Moreover, this level was significantly decreased between 21 and 28 dpl ($P < 0.05$).

In the SNc (Fig. 3b), we observed a nonsignificant modification of the binding at 3 and 7 dpl ($P > 0.05$ compared to the Sham group value of 1.5 ± 1.3). At 14 dpl, the binding was significantly increased compared to 3 and 7 dpl (39.2 ± 4.6 vs. -1.3 ± 5.7 and $10.4\% \pm 7.0\%$, respectively, $P < 0.05$). At 21 and 28 dpl, the binding was still significantly higher than at 3 dpl ($27.9\% \pm 3.0\%$ and $17.3\% \pm 3.1\%$ respectively,

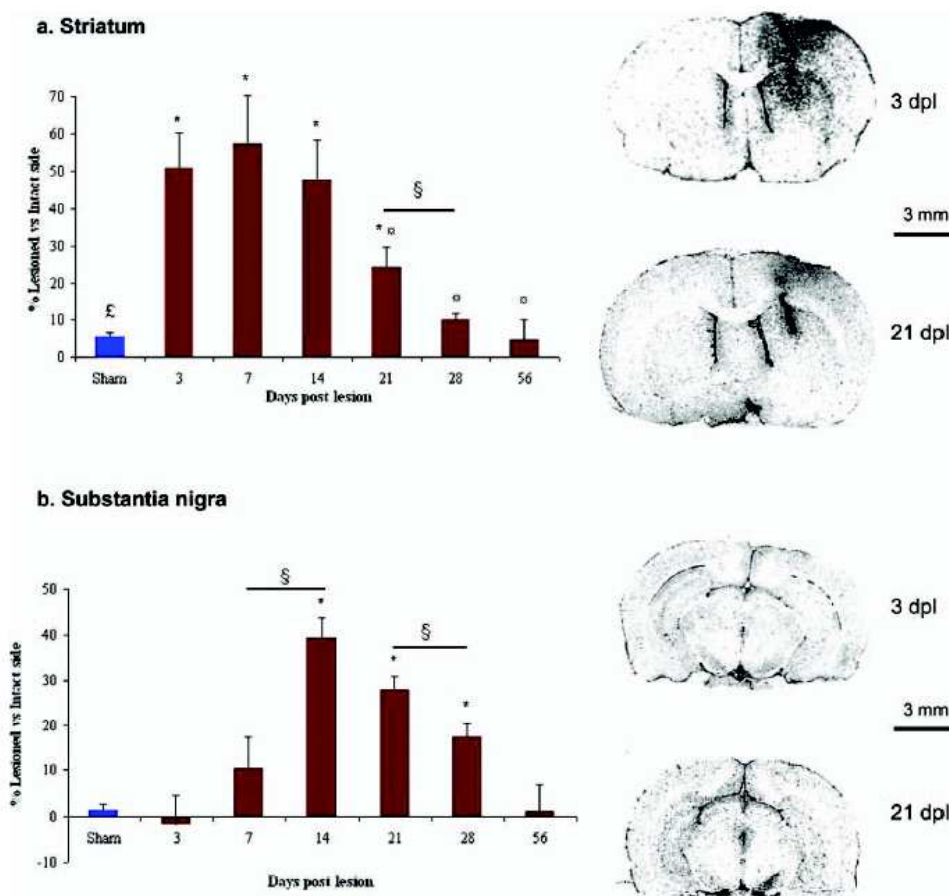


Fig. 3. In vitro autoradiographic study of the TSPO with [^3H]PK-11195 in the striatum and SNc. Results are expressed as the percentage of binding in the ipsilateral (lesioned) compared to the contralateral (intact) side. Each value is calculated as mean \pm SEM; $n = 5-6$ for each time-point. The significance level was set at $P < 0.05$; †: significantly different from the theoretical value of 0% (Wilcoxon signed-rank test), *: significantly different from the Sham

value (Mann-Whitney rank sum test), ‡: significantly different from the value at 3 dpl (Mann-Whitney rank sum test), §: significantly different from the previous time-point (Mann-Whitney rank sum test). Images are representative of the binding at 3 and 21 days postlesion (dpl) in the striatum (a) and SNc (b). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

$P < 0.05$), but a significant decrease occurred between 21 and 28 dpl ($P < 0.05$), after the value returned similar to that of the Sham group at 56 dpl.

Ex vivo TSPO study with [^{125}I]CLINDE

In the striatum (Fig. 4a), the accumulation of [^{125}I]CLINDE in the lesioned side at 30-min postinjection was significantly increased from 3 dpl ($105.0\% \pm 5.4\%$, $P < 0.05$ compared to the theoretical value of 0%). The increase was similar in the 7 and 14 dpl groups ($106.8\% \pm 3.3\%$ and $116.7\% \pm 10.3\%$, respectively). The binding then decreased

significantly between 14 and 21 dpl ($116.7\% \pm 10.3\%$ and $88.5\% \pm 3.5\%$, respectively, $P < 0.05$) and between 28 and 56 dpl ($63.4\% \pm 12.7\%$ and $19.0\% \pm 2.2\%$, respectively, $P < 0.05$) to reach a low level at the later stage.

In the SNc (Fig. 4b), the accumulation of [^{125}I]CLINDE was significantly increased at 3 dpl ($8.8\% \pm 2.0\%$ compared to the theoretical value of 0%) and then increased significantly between this stage and 7 dpl ($20.5\% \pm 2.7\%$, $P < 0.05$ vs. 3 dpl) and 14 dpl ($60.1\% \pm 5.1\%$, $P < 0.05$ vs. 3 and 7 dpl). After stabilization between 14 and 21 dpl, the value decreased progressively at 28 ($51.9\% \pm 9.0\%$), and

Synapse

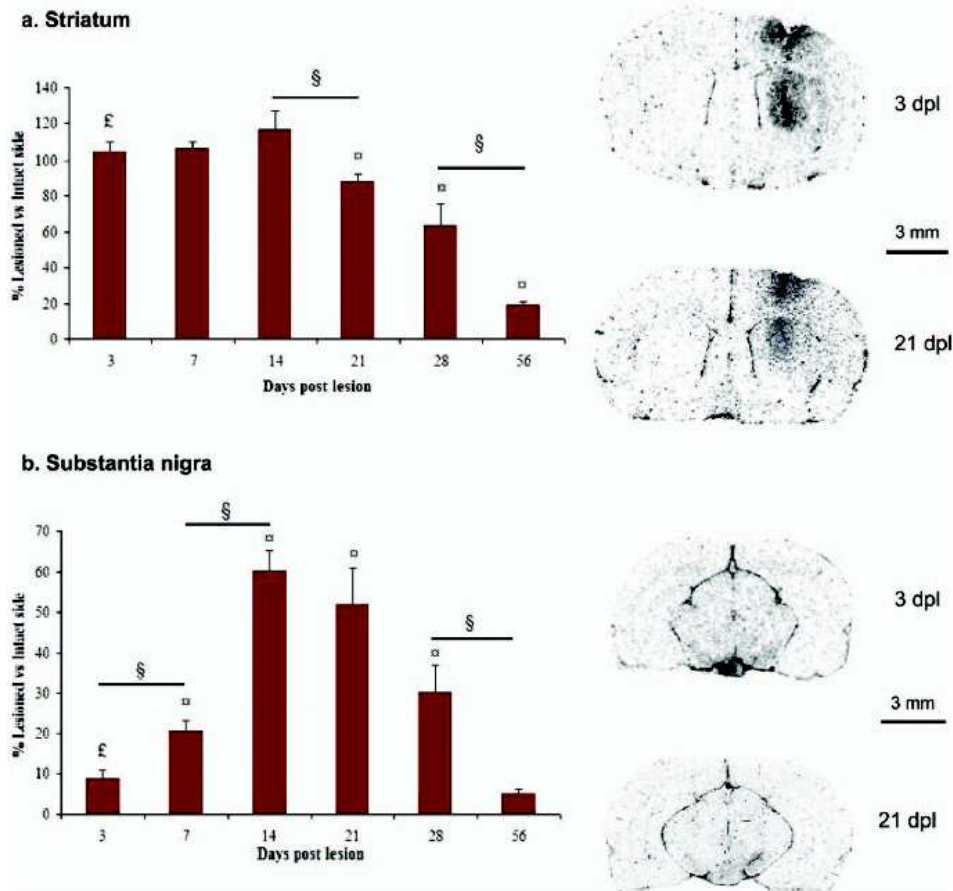


Fig. 4. Ex vivo autoradiographic study of the TSPO with [125 I]CLINDE in the striatum and SNc. Results are expressed as the percentage of binding in the ipsilateral (lesioned) compared to the contralateral (intact) side. Each value is calculated as mean \pm SEM; $n = 5-6$ for each time-point. The significance level was set at $P < 0.05$; £: significantly different from the theoretical value of 0%

(Wilcoxon signed-rank test), \square : significantly different from the value at 3 dpl (Mann-Whitney rank sum test), §: significantly different from the previous time-point (Mann-Whitney rank sum test). Images are representative of the binding at 3 and 21 days postlesion (dpl) in the striatum (a) and SNc (b). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

significantly between 28 and 56 dpl ($30.3\% \pm 6.6\%$ and $5.0\% \pm 1.0\%$, respectively, $P < 0.05$) to reach a low level at the later stage.

DISCUSSION

The causative factors and molecular mechanisms underlying the selective loss of nigro-striatal dopaminergic neurons in PD are complex, but a number of clinical and preclinical findings suggest that neuroinflammation could contribute to the initiation and/or progression of the disease. In this study, we followed in parallel a marker of neuroinflammation, i.e., the TSPO which is known to be overexpressed by acti-

vated microglia, and markers of neurodegeneration of the nigro-striatal dopaminergic neurons over a long time period (3- to 56-days postlesion, dpl) in a rat model of PD induced by partial striatal lesion with 6-OHDA.

The diversity of rat models using 6-OHDA make it possible to choose the approximate stage of human PD it is wished to imitate, depending on the site, dose and number of injections of neurotoxin. We used here a partial lesion model which induces progressive and retrograde degeneration of dopaminergic neurons that can be defined as a mild lesion (at most 65–70% loss of TH-positive neurons in the SNc and TH-positive innervation in the striatum) corresponding to an

early symptomatic stage of PD (Bjorklund et al., 1997; Kirik et al., 1998). This model is relevant to testing therapeutic strategies, rather than intra-SNc or intramedial forebrain bundle (mbf) 6-OHDA lesions which generally cause a complete and immediate lesion that is not easily accessible to a therapeutic window.

In our model, a 31% reduction in TH-immunoreactivity (TH-i) occurred in the striatum at 7 dpl while a 48% decrease in DAT density occurred as early as 3 dpl, in comparison to sham values. It therefore appeared that the reduction in DAT density in the striatum, i.e., the site of the lesion, was greater and earlier compared to the reduction in TH-i, thus showing an apparent lower vulnerability of TH-i compared to DAT density. This could be explained if a fraction of nigro-striatal neurons only partly express the dopaminergic phenotype but lack the DAT, as already described in other brain regions (Ugrumov, 2009), thus being less vulnerable to the neurotoxic effects of 6-OHDA that enters dopaminergic neurons via the DAT. In addition, TH-i appears to be a metabolic marker and DAT density an anatomic marker. It also can be noted that we observed in the striatum a slightly increase in TH-i at 3 dpl. This could appear in contradiction with several findings describing a reduction in TH-i at early time after 6-OHDA lesion (e.g., Blandini et al., 2007; Sanchez-Iglesias et al., 2009). However, our results are in agreement with other data showing an increase in TH-i in specific parts of the striatum of rats that underwent a very partial and focalized lesion of the nigro-striatal pathway, suggesting that this increased enzymatic activity could be a compensatory mechanism to the lesion (Dentresangle et al., 2001; Dzahini et al., 2010). In our model we evaluated the TH-i in the whole striatum, with probably no distinction between lesioned area and potentially nonlesioned but transiently "hyperactive" area. In the SNc, around 23 and 20% reduction was observed at 7 dpl in TH-i and DAT density, respectively, while little modification of these markers occurred at 3 dpl. This result is in agreement with the delayed onset of degeneration in cell bodies compared to that of striatal endings that occurs in retrograde 6-OHDA lesion models (Blandini et al., 2007; Ichtani et al., 1994; Sauer and Oertel, 1994; Walsh et al., 2011). Our results also highlight that molecular imaging techniques using selected radiopharmaceuticals combined with immunohistochemistry provide complementary information and permit to follow disease progression in preclinical models of neurodegenerative diseases such as PD.

We evaluated TSPO density as a marker of microglial activation *in vitro* using the prototypic ligand [³H]PK11195 on brain sections adjacent to those used for the determination of TH-i and DAT density. In the striatum we observed a 43–52% increase in the ligand

binding compared to sham value at 3, 7, and 14 dpl, followed by a progressive return to basal levels at 56 dpl, i.e., similar binding on the lesioned and intact sides. The binding profile in the SNc was different, with a progressive increase in binding beginning at 3 dpl and peaking at 14 dpl, with a 40% increase on the lesioned compared to the intact side, followed by a progressive decrease until a basal level at 56 dpl as in the striatum. The slight but significant higher binding of [³H]PK11195 in the striatum of the Sham group probably reflects the presence of a mechanical lesion due to the cross of the needle in a part of animals. To expand the results obtained *in vitro* and to establish the spatial distribution of activated microglial cells, we measured TSPO density through *ex vivo* accumulation of [¹²⁵I]CLINDE, a method which reflects the exhaustive distribution of the tracer in living animals. We obtained similar binding profiles overall using both experimental designs, i.e., *in vitro* and *ex vivo*, both in the striatum and in the SNc. However, the intensity of the signal was twofold higher with the *ex vivo* [¹²⁵I]CLINDE accumulation compared to *in vitro* [³H]PK11195 binding in both regions of interest. This discrepancy between the *ex vivo* CLINDE and *in vitro* PK11195 data may be due to the fact that a distinct difference exists between *in vitro* and *ex vivo* in terms of ligand delivery with blood flow, the *ex vivo* situation being vulnerable to inaccuracy not encountered *in vitro*. Moreover, the *ex vivo* [¹²⁵I]CLINDE experiment showed that the increased TSPO density occurred mainly in the striatum and SNc, with also a neuroinflammatory response in cortical area adjacent to the lesioned striatum. Therefore, the combination of these two sets of techniques yielded complementary information which provided some greater understanding of the time-course of neuroinflammatory and neuropathological changes observed after 6-OHDA administration.

The relative contribution of microglia and astrocytes in TSPO overexpression in CNS during neuroinflammation is a subject of debate, and a growth body of evidence suggests that TSPO density is increased in microglia in CNS disorders, with less significant contribution from astrocytes (Venneti et al., 2006). However, it may also depend on the animal model, species and strain used, and on the time course of the neuroinflammatory process. To clarify this point, several investigators combined [³H]PK11195 autoradiography with immunohistochemistry for both astrocytes and microglia. We did not achieve this point in the present study for technical reasons, since it would require for each time point another set of animals for brain perfusion. Moreover, translation of these *in vitro* immunohistochemical studies to *ex vivo* CLINDE setting would have been complex.

The neuroinflammation profiles we obtained during this long period (3–56 dpl) showed that it appeared to

Synapse

be a transitory process, both in the dopaminergic nerve endings and cell body brain regions. This process was already present at a maximum level at 3 dpl in the striatum while it increased progressively in the SNc. Thus, as for the decrease in dopaminergic markers, the onset of TSPO was shifted in the SNc compared to the striatum. As we observed, transitory neuroinflammation has recently been described in the SNc accompanied by a progressive decrease in TH-i, but using a slightly different model in which 6-OHDA was administered in the mbf (Henry et al., 2009). In contrast to this latter study, a neuroinflammatory process has been described in the SNc as early as 1 day after 6-OHDA lesion in the mbf (Marinova-Mutafchieva et al., 2009). However, it was not demonstrated in this study whether this neuroinflammation was transitory or not as the kinetics study did not exceed 15 dpl. In a more recent study was shown that a significant decrease in TH-i was observed after strong striatal 6-OHDA lesion (28 µg vs. 10 µg for the present study) as early as 6 h in the striatum and between 72 h and 2 weeks in the SNc, while the microglial activation assessed by OX42 immunohistochemistry occurred at 72-h postlesion in both regions; but no information was provided after 2 weeks (Walsh et al., 2011). We showed in our model that the microglial activation had practically disappeared at 56 dpl on the lesioned side, while the dopaminergic markers TH-i and DAT stabilized at around 50–80% reduced level in the striatum as well as in the SNc. Information concerning the comparative time-courses of neuroinflammation and neurodegeneration has thus been highlighted by our study, in particular the concomitance of appearance of both processes in the striatum and the SNc and the transitory nature of the first. It can be proposed that 6-OHDA, that is known to induce powerful oxidative stress and deficit in the mitochondrial respiratory chain (Blum et al., 2001), is at the origin of the onset of both neuroinflammation and neurodegeneration and that microglial activation could last until long-term installation of neuronal loss. This confirms the hypothesis that there is a window during which the administration of factors able to block or reduce the neuroinflammation process could also be able to block or slow down the degenerative process, at least in this animal model. Such a beneficial effect has recently been reported using different agents able to act on microglial activation (Broom et al., 2011; Pabon et al., 2011).

It also appears from our study that a molecular imaging tracer such as CLINDE could be used to follow up the neuroinflammatory process in animal models of PD. This type of investigation has previously been described, but at a single time-point postlesion, using the PET tracer [¹¹C]PK11195 (Cicchetti et al., 2002). Even if the model we used does not reflect all the mechanisms involved in human PD, our results

suggest that there might be a therapeutic window for anti-inflammatory agents in the early stage of the disease and that such therapeutic approach could be assessed through SPECT and/or PET molecular imaging methods using TSPO and DAT tracers in parallel.

REFERENCES

- Arlicot N, Katsifis A, Garreau L, Mattner F, Vergote J, Duval S, Koussignian I, Bodard S, Guilloteau D, Chalon S. 2008. Evaluation of CLINDE as potent translocator protein (18 kDa) SPECT radiotracer reflecting the degree of neuroinflammation in a rat model of microglial activation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35:2203–2211.
- Arlicot N, Petit E, Katsifis A, Toutain J, Divoux D, Bodard S, Rousset S, Guilloteau D, Bernaudin M, Chalon S. 2010. Detection and quantification of remote microglial activation in rodent models of focal ischaemia using the TSPO radioligand CLINDE. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 37:2371–2380.
- Bartels AL, Willemsen AT, Doorduyn J, de Vries EF, Dierckx RA, Leenders KL. 2010. [¹¹C]-PK11195 PET: Quantification of neuroinflammation and a monitor of anti-inflammatory treatment in Parkinson's disease? *Parkinsonism Relat Disord* 16:57–59.
- Benavides J, Quarteronet D, Imbault F, Malignous C, Uzan A, Renault C, Dubroeuq MC, Gueremy C, Le Fur G. 1983. Labeling of 'peripheral-type' benzodiazepine binding sites in the rat brain by using [³H]PK 11195, an isquinoline carboxamide derivative: Kinetic studies and autoradiographic localization. *J Neurochem* 41:1744–1750.
- Bjorklund A, Rosenblad C, Winkler C, Kirik D. 1997. Studies on neuroprotective and regenerative effects of GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 4:186–200.
- Blandini F, Levandis G, Bazzini E, Nappi G, Armentero MT. 2007. Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastratial injection of 6-hydroxydopamine in the rat: New clues from an old model. *Eur J Neurosci* 25:397–405.
- Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. 2001. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: Contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 65:135–172.
- Boutin H, Chauveau F, Thominaux C, Gregoire MC, James ML, Tribossens R, Hantraye P, Dolle F, Tavittian B, Kassou M. 2007. [¹¹C]-DPA-713: A novel peripheral benzodiazepine receptor PET ligand for in vivo imaging of neuroinflammation. *J Nucl Med* 48:573–581.
- Broom L, Marinova-Mutafchieva L, Sadeghian M, Davis JB, Medhurst AD, Dexter DT. 2011. Neuroprotection by the selective iNOS inhibitor GW274150 in a model of Parkinson disease. *Free Radic Biol Med* 50:633–640.
- Chalon S, Garreau L, Emond P, Zimmer L, Vilar MP, Besnard JC, Guilloteau D. 1999. Pharmacological characterization of (E)-N-(3-iodoprop-2-enyl)-2beta-carbomethoxy-3beta-(4'-methylphenyl)nortropane as a selective and potent inhibitor of the neuronal dopamine transporter. *J Pharmacol Exp Ther* 291:648–654.
- Chen MK, Guilarte TR. 2008. Translocator protein 18 kDa (TSPO): Molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacol Ther* 118:1–17.
- Cicchetti F, Brownell AL, Williams K, Chen YI, Livni E, Isaacson O. 2002. Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. *Eur J Neurosci* 15:991–998.
- Dentresangle C, Le Cavorsin M, Savasta M, Leviel V. 2001. Increased extracellular DA and normal evoked DA release in the rat striatum after a partial lesion of the substantia nigra. *Brain Res* 893:178–185.
- Dzahini K, Dentresangle C, Le Cavorsin M, Bertrand A, Detraz I, Savasta M, Leviel V. 2010. Pre-synaptic glutamate-induced activation of DA release in the striatum after partial nigral lesion. *J Neurochem* 113:1459–1470.
- Emond P, Guilloteau D, Chalon S. 2008. PE21: A radiopharmaceutical for in vivo exploration of the dopamine transporter. *CNS Neurosci Ther* 14:47–64.
- Gerhard A, Pavese N, Hotton G, Turkheimer F, Es M, Hammers A, Eggert K, Oertel W, Banati RB, Brooks DJ. 2006. In vivo imaging of microglial activation with [¹¹C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 21:404–412.
- Gulyas B, Toth M, Vas A, Shchukin E, Kostulas K, Hillert J, Hallidin C. 2011. Visualizing neuroinflammation in poststroke patients:

- A comparative PET study with the TSPO molecular imaging biomarkers [(11)C]PK11195 and [(11)C]vinpocetine. *Curr Radiopharm.*
- Heneka MT, Rodriguez JJ, Verkhratsky A. 2010. Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Res Rev* 63:189–211.
- Henry V, Paille V, Lelan F, Brachet P, Damier P. 2009. Kinetics of microglial activation and degeneration of dopamine-containing neurons in a rat model of Parkinson disease induced by 6-hydroxydopamine. *J Neuropathol Exp Neurol* 68:1092–1102.
- Hirsch EC, Hunot S. 2009. Neuroinflammation in Parkinson's disease: A target for neuroprotection? *Lancet Neurol* 8:382–397.
- Ichitani Y, Okamura H, Nakahara D, Nagatsu I, Iyata Y. 1994. Biochemical and immunocytochemical changes induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in the rat nigrostriatal dopamine neuron system: Evidence for cell death in the substantia nigra. *Exp Neurol* 130:269–278.
- James ML, Fulton RR, Vercoillie J, Henderson DJ, Garreau L, Chalon S, Dolle F, Costa B, Guilloteau D, Kassiou M. 2008. DPA-714, a new translocator protein-specific ligand: Synthesis, radiofluorination, and pharmacologic characterization. *J Nucl Med* 49:814–822.
- Kirik D, Rosenblad C, Björklund A. 1998. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol* 152:259–277.
- Kreutzberg GW. 1996. Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312–318.
- Marinova-Mutafchieva L, Sadeghian M, Broom L, Davis JB, Medhurst AD, Dexter DT. 2009. Relationship between microglial activation and dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra: A time course study in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 110:966–975.
- Mattner F, Mardon K, Katsifis A. 2008. Pharmacological evaluation of [¹²⁵I]-CLINDE: A radiolabeled imidazopyridine-3-acetamide for the study of peripheral benzodiazepine binding sites (PBBS). *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35:779–789.
- Mattner F, Bandin DL, Staykova M, Berghofer P, Gregoire MC, Balantyne P, Quinlivan M, Fordham S, Pham T, Willenborg DO, Katsifis A. 2011. Evaluation of [¹²⁵I]-CLINDE as a potent SPECT radiotracer to assess the degree of astroglia activation in cuprizone-induced neuroinflammation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 38:1516–1528.
- McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. 1988. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38:1285–1291.
- McGeer PL, Yasojima K, McGeer EG. 2001. Inflammation in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 86:83–89.
- Ouchi Y, Yoshikawa E, Sekine Y, Futatsubashi M, Kanno T, Ogusu T, Torizuka T. 2005. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann Neurol* 57:168–175.
- Ouchi Y, Yagi S, Yokokura M, Sakamoto M. 2009. Neuroinflammation in the living brain of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 15 (Suppl 3):S200–S204.
- Pabon MM, Bachstetter AD, Hudson CE, Gemma C, Bickford PC. 2011. CX3CL1 reduces neurotoxicity and microglial activation in a rat model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation* 8:9.
- Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapere JJ, Lindemann P, Norenberg MD, Nutt D, Weizman A, Zhang MR, Gavish M. 2006. Translocator protein (18kDa): New nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci* 27:402–409.
- Paxinos G, Watson C. 1986. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press.
- R. 2011. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Development Core Team.
- Sanchez-Iglesias S, Mendez-Alvarez E, Iglesias-Gonzalez J, Munoz-Patino A, Sanchez-Sellero I, Labandeira-Garcia JL, Soto-Otero R. 2009. Brain oxidative stress and selective behavior of aluminum in specific areas of rat brain: Potential effects in a 6-OHDA-induced model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 109:879–888.
- Sauer H, Oertel WH. 1994. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: A combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* 59:401–415.
- Streit WJ, Xue QS. 2009. Life and death of microglia. *J Neuroimmune Pharmacol* 4:371–379.
- Tansey MG, Goldberg MS. 2010. Neuroinflammation in Parkinson's disease: Its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis* 37:510–518.
- Tansey MG, McCoy MK, Frank-Cannon TC. 2007. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: Potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp Neurol* 208:1–25.
- Ugrumov MV. 2009. Nondopaminergic neurons partly expressing dopaminergic phenotype: Distribution in the brain, development and functional significance. *J Chem Neuroanat* 38:241–256.
- Venneti S, Lopresti BJ, Wiley CA. 2006. The peripheral benzodiazepine receptor (Translocator protein 18kDa) in microglia: From pathology to imaging. *Prog Neurobiol* 80:308–322.
- Venneti S, Lopresti BJ, Wang G, Slagel SL, Mason NS, Mathis CA, Fischer ML, Larsen NJ, Mortimer AD, Hastings TG, Smith AD, Zigmond MJ, Suhara T, Higuchi M, Wiley CA. 2007. A comparison of the high-affinity peripheral benzodiazepine receptor ligands DAA1106 and (R)-PK11195 in rat models of neuroinflammation: Implications for PET imaging of microglial activation. *J Neurochem* 102:2118–2131.
- Walsh S, Finn DP, Dowd E. 2011. Time-course of nigrostriatal neurodegeneration and neuroinflammation in the 6-hydroxydopamine-induced axonal and terminal lesion models of Parkinson's disease in the rat. *Neuroscience* 175:251–261.
- Whitton PS. 2007. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol* 150:963–976.

BIBLIOGRAPHIE

Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci*. 2007 ; 10(12): 1538-43.

Aloisi F, Ambrosini E, Columba-Cabezas S, Magliozzi R, Serafini B. Intracerebral regulation of immune responses. *Ann Med*. 2001 ; 33(8): 510-5.

Altar CA, Marien MR. Preservation of dopamine release in the denervated striatum. *Neurosci Lett*. 1989; 96(3):329-34.

Alves G, Forsaa EB, Pedersen KF, Dreetz Gjerstad M, Larsen JP. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol*. 2008 ; 255 Suppl 5: 18-32

Amitani M, Zhang MR, Noguchi J, Kumata K, Ito T, Takai N, Suzuki K, et al. Blood flow dependence of the intratumoral distribution of peripheral benzodiazepine receptor binding in intact mouse fibrosarcoma. *Nucl Med Biol*. 2006 ; 33(8): 971-5.

Antonini A, Vontobel P, Psylla M, Günther I, Maguire PR, Missimer J, Leenders KL. Complementary positron emission tomographic studies of the striatal dopaminergic system in Parkinson's disease. *Arch Neurol*. 1995 ; 52(12): 1183-90.

Antonini A, Benti R, De Notaris R, Tesei S, Zecchinelli A, Sacilotto G, et al. 123I-Ioflupane/SPECT binding to striatal dopamine transporter (DAT) uptake in patients with Parkinson's disease, multiple system atrophy, and progressive supranuclear palsy. *Neurol Sci*. 2003 ; 24(3): 149-50.

Arai H, Furuya T, Yasuda T, Miura M, Mizuno Y, Mochizuki H. Neurotoxic effects of lipopolysaccharide on nigral dopaminergic neurons are mediated by microglial activation, interleukin-1beta, and expression of caspase-11 in mice. *J Biol Chem*. 2004 Dec 3; 279(49): 51647-53.

Arlicot N, Katsifis A, Garreau L, Mattner F, Vergote J, Duval S, et al. Evaluation of CLINDE as potent translocator protein (18 kDa) SPECT radiotracer reflecting the degree of neuroinflammation in a rat model of microglial activation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008, 35(12):2203-2211.

Arlicot N, Petit E, Katsifis A, Toutain J, Divoux D, Bodard S, Roussel S, Guilloteau D, Bernaudin M, Chalon S. Detection and quantification of remote microglial activation in rodent models of focal ischaemia using the TSPO radioligand CLINDE. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010, 37(12):2371-2380.

Arlicot N, Vercouillie J, Ribeiro MJ, Tauber C, Venel Y, Baulieu JL, Maia S, et al. Initial evaluation in healthy humans of [18F]DPA-714, a potential PET biomarker for neuroinflammation. *Nucl Med Biol*. 2012, 39(4):570-8.

Arlicot Nicolas. Imagerie moléculaire de la neuroinflammation - Evaluation préclinique d'un nouveau radiopharmaceutique : le CLINDE. Thèse de doctorat, Université de Tours, 8 déc 2009, 212 pages

Armentero MT, Levandis G, Nappi G, Bazzini E, Blandini F. Peripheral inflammation and neuroprotection: systemic pretreatment with complete Freund's adjuvant reduces 6-hydroxydopamine toxicity in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2006 ; 24(3): 492-505.

Ashkan K, Wallace BA, Mitrofanis J, Pollo C, Brard PY, Fagret D, Benabid AL. SPECT imaging, immunohistochemical and behavioural correlations in the primate models of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2007 ; 13(5): 266-75.

Austin SA, Floden AM, Murphy EJ, Combs CK. Alpha-synuclein expression modulates microglial activation phenotype. *J Neurosci.* 2006 ; 26(41): 10558-63.

Bailey SM, Pietsch EC, Cunningham CC. Ethanol stimulates the production of reactive oxygen species at mitochondrial complexes I and III. *Free Radic Biol Med.* 1999 ; 27(7-8): 891-900.

Banati RB, Egensperger R, Maassen A, Hager G, Kreutzberg GW, Graeber MB. Mitochondria in activated microglia in vitro. *J Neurocytol.* 2004 ; 33(5): 535-41.

Banati RB, Myers R, Kreutzberg GW. PK ('peripheral benzodiazepine')- binding sites in the CNS indicate early and discrete brain lesions: microautoradiographic detection of [3H]PK11195 binding to activated microglia. *J Neurocytol.* 1997 ; 26(2): 77-82.

Banati RB, Newcombe J, Gunn RN, Cagnin A, Turkheimer F, Heppner F, et al. The peripheral benzodiazepine binding site in the brain in multiple sclerosis: quantitative in vivo imaging of microglia as a measure of disease activity. *Brain.* 2000 ; 123 (Pt 11): 2321-37.

Banerjee R, Starkov AA, Beal MF, Thomas B. Mitochondrial dysfunction in the limelight of Parkinson's disease pathogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2009 ; 1792(7): 651-63.

Barnéoud P, Parmentier S, Mazadier M, Miquet JM, Boireau A, Dubédat P, Blanchard JC. Effects of complete and partial lesions of the dopaminergic mesotelencephalic system on skilled forelimb use in the rat. *Neuroscience.* 1995 ; 67(4): 837-48.

Barnéoud P, Descombris E, Aubin N, Abrous DN. Evaluation of simple and complex sensorimotor behaviours in rats with a partial lesion of the dopaminergic nigrostriatal system. *Eur J Neurosci.* 2000 ; 12(1): 322-36.

Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet.* 2008 Aug ; 40(8): 955-62.

Bartels AL, Willemsen AT, Doorduyn J, de Vries EF, Dierckx RA, Leenders KL. [11C]-PK11195 PET: quantification of neuroinflammation and a monitor of anti-inflammatory treatment in Parkinson's disease? *Parkinsonism Relat Disord* 2010, 16(1):57-59.

Bartels T, Choi JG, Selkoe DJ. α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature.* 2011 ; 477(7362): 107-10.

- Batarseh A, Papadopoulos V. Regulation of translocator protein 18 kDa (TSPO) expression in health and disease states. *Mol Cell Endocrinol.* 2010 ; 327(1-2):1-12.
- Batchelor PE, Porritt MJ, Martinello P, Parish CL, Liberatore GT, Donnan GA, Howells DW. Macrophages and Microglia Produce Local Trophic Gradients That Stimulate Axonal Sprouting Toward but Not beyond the Wound Edge. *Mol Cell Neurosci.* 2002 ; 21(3): 436-53.
- Beal MF. Neuroprotective effects of creatine. *Amino Acids.* 2011 ; 40(5): 1305-13.
- Ben V, Blin O, Bruguerolle B. Time-dependent striatal dopamine depletion after injection of 6-hydroxydopamine in the rat. Comparison of single bilateral and double bilateral lesions. *J Pharm Pharmacol.* 1999 ; 51(12): 1405-8.
- Benabid AL, Benazzouz A, Hoffmann D, Limousin P, Krack P, Pollak P. Long-term electrical inhibition of deep brain targets in movement disorders. *Mov Disord.* 1998 ; 13 Suppl 3: 119-25.
- Benaderette S, Zanotti Fregonara P, Apartis E, Nguyen C, Trocello JM, Remy P, et al. Psychogenic parkinsonism: a combination of clinical, electrophysiological, and [(123)I]-FP-CIT SPECT scan explorations improves diagnostic accuracy. *Mov Disord.* 2006 ; 21(3): 310-7.
- Benamer TS, Patterson J, Grosset DG, Booij J, de Bruin K, van Royen E, et al. Accurate differentiation of parkinsonism and essential tremor using visual assessment of [123I]-FP-CIT SPECT imaging: the [123I]-FP-CIT study group. *Mov Disord.* 2000 ; 15(3): 503-10.
- Benavides J, Quarteronet D, Imbault F, Malgouris C, Uzan A, Renault C, et al. Labelling of "peripheral-type" benzodiazepine binding sites in the rat brain by using [3H]PK 11195, an isoquinoline carboxamide derivative: kinetic studies and autoradiographic localization. *J Neurochem.* 1983 ; 41(6): 1744-50.
- Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT. Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays* 2002 ; 24(4): 308-18.
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 2000 ; 3(12): 1301-6.
- Bibliothèque de l'université de Laval, Productions et implication dans les processus biologiques des radicaux libres oxygénés (ROS) et azotés (RNS), consultation le 26 avril 2012, www.bibl.ulaval.ca/,
- Bjorklund A, Rosenblad C, Winkler C, Kirik D. Studies on neuroprotective and regenerative effects of GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 1997, 4(3-4):186-200.
- Blandini F, Armentero MT, Martignoni E. The 6-hydroxydopamine model: News from the past Parkinsonism and Related Disorders 2008 ; 14 : S124-S129
- Blandini F, Levandis G, Bazzini E, Nappi G, Armentero MT. Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. *Eur J Neurosci* 2007, 25(2):397-405.

- Block ML, Hong JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol*. 2005 ; 76(2): 77-98.
- Block ML, Hong JS. Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. *Biochem Soc Trans*. 2007 ; 35(Pt 5): 1127-32.
- Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2001, 65(2):135-172.
- Blum-Degen D, Müller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett*. 1995; 202(1-2): 17-20.
- Bohnen NI, Koeppe RA, Minoshima S, Giordani B, Albin RL, Frey KA, Kuhl DE. Cerebral glucose metabolic features of Parkinson disease and incident dementia: longitudinal study. *J Nucl Med*. 2011 ; 52(6): 848-55.
- Booij J, Habraken JB, Bergmans P, Tissingh G, Winogrodzka A, Wolters EC, et al. Imaging of dopamine transporters with iodine-123-FP-CIT SPECT in healthy controls and patients with Parkinson's disease. *J Nucl Med*. 1998 ; 39(11): 1879-84.
- Booij J, Speelman JD, Horstink MW, Wolters EC. The clinical benefit of imaging striatal dopamine transporters with [123I]FP-CIT SPET in differentiating patients with presynaptic parkinsonism from those with other forms of parkinsonism. *Eur J Nucl Med*. 2001 ; 28 : 266-272.
- Bouchez G, Sensebé L, Vourc'h P, Garreau L, Bodard S, Rico A, et al. Partial recovery of dopaminergic pathway after graft of adult mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson's disease. *Neurochem Int*. 2008 ; 52(7): 1332-42.
- Bouchez Gaëlle. Nouvelle approche de thérapie cellulaire pour la maladie de parkinson : étude de la greffe de cellules souches mesenchymateuses d'origine médullaire chez le rat. Thèse de doctorat, Université de Tours, 6 déc 2007, 154 pages.
- Bousquet M, Saint-Pierre M, Julien C, Salem N Jr, Cicchetti F, Calon F. Beneficial effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid on toxin-induced neuronal degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J*. 2008 ; 22(4): 1213-25.
- Boutin H, Chauveau F, Thominaux C, Gregoire MC, James ML, Trebossen R, et al. 11C-DPA-713: a novel peripheral benzodiazepine receptor PET ligand for in vivo imaging of neuroinflammation. *J Nucl Med* 2007, 48(4):573-581.
- Braak H, Braak E, Yilmazer D, Schultz C, de Vos RA, Jansen EN. Nigral and extranigral pathology in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*. 1995 ; 46: 15-31.
- Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003 ; 24(2): 197-211.
- Braestrup C, Squires RF. Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H)diazepam binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 ; 74(9): 3805-9.

Briard E, Zoghbi SS, Imaizumi M, Gourley JP, Shetty HU, Hong J, et al. Synthesis and evaluation in monkey of two sensitive ¹¹C-labeled aryloxyanilide ligands for imaging brain peripheral benzodiazepine receptors in vivo. *J Med Chem.* 2008 ; 51(1): 17-30.

Brochard V, Combadière B, Prigent A, Laouar Y, Perrin A, Beray-Berthet V, et al. Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J Clin Invest.* 2009 ; 119(1): 182-92.

Brooks DJ. Imaging Approaches to Parkinson Disease. *Journal of Nuclear Medicine* 2010 ; 51 (4): 596-605

Broom L, Marinova-Mutafchieva L, Sadeghian M, Davis JB, Medhurst AD, Dexter DT. Neuroprotection by the selective iNOS inhibitor GW274150 in a model of Parkinson disease. *Free Radic Biol Med* 2011, 50(5):633-640.

Brown AK, Fujita M, Fujimura Y, Liow JS, Stabin M, Ryu YH, et al. Radiation dosimetry and biodistribution in monkey and man of ¹¹C-PBR28: a PET radioligand to image inflammation. *J Nucl Med.* 2007 ; 48(12): 2072-9.

Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Südhof TC. "Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro". *Science* 2010 ; 329(5999): 1663–7.

Cagnin A, Brooks DJ, Kennedy AM, Gunn RN, Myers R, Turkheimer FE, et al. In-vivo measurement of activated microglia in dementia. *Lancet.* 2001 ; 358(9280): 461-7.

Cagnin A, Gerhard A, Banati RB. In vivo imaging of neuroinflammation. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2002 ; 12(6): 581-6.

Carey RJ. Dopamine receptors mediate drug-induced but not Pavlovian conditioned contralateral rotation in the unilateral 6-OHDA animal model. *Brain Research* 1990 ; 515 : 292-298

Cervenka S, Varrone A, Fransén E, Halldin C, Farde L. PET studies of D2-receptor binding in striatal and extrastriatal brain regions: Biochemical support in vivo for separate dopaminergic systems in humans. *Synapse.* 2010 ; 64(6): 478-85.

Chalon S, Garreau L, Emond P, Zimmer L, Vilar MP, Besnard JC, Guilloteau D. Pharmacological characterization of (E)-N-(3-iodoprop-2-enyl)-2beta-carbomethoxy-3beta-(4'-methylphenyl)nortropine as a selective and potent inhibitor of the neuronal dopamine transporter. *J Pharmacol Exp Ther* 1999, 291(2):648-654.

Chalon S, Hall H, Saba W, Garreau L, Dolle F, Halldin C, et al. Pharmacological Characterization of (E)-N-(4-Fluorobut-2-enyl)-2-carbomethoxy-3-(4-tolyl)nortropine (LBT-999) as a Highly Promising Fluorinated Ligand for the Dopamine Transporter. *JPET* 2006 ; Vol. 317, No. 1 :147–152.

Chang RC, Hudson P, Wilson B, Haddon L, Hong JS. Influence of neurons on lipopolysaccharide-stimulated production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha by cultured glia. *Brain Res.* 2000 ; 853(2): 236-44.

- Charbonneau P, Syrota A, Crouzel C, Valois JM, Prenant C, Crouzel M. Peripheral-type benzodiazepine receptors in the living heart characterized by positron emission tomography. *Circulation*. 1986 ; 73(3):476-83.
- Chaturvedi RK, Beal MF. PPAR: a therapeutic target in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2008 ; 106(2): 506-18.
- Chauveau F, Van Camp N, Dollé F, Kuhnast B, Hinnen F, Damont A, et al. Comparative evaluation of the translocator protein radioligands 11C-DPA-713, 18F-DPA-714, and 11C-PK11195 in a rat model of acute neuroinflammation. *J Nucl Med*. 2009 ; 50(3): 468-76.
- Chen MK, Guilarte TR. Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacol Ther* 2008, 118(1):1-17.
- Chesselet MF, Fleming S, Mortazavi F, Meurers B. Strengths and limitations of genetic mouse models of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2008 ; 14 Suppl 2:S84-7.
- Chen H, O'Reilly EJ, Schwarzschild MA, Ascherio A. Peripheral inflammatory biomarkers and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol*. 2008 ; 167(1): 90-5.
- Chen H, Jacobs E, Schwarzschild MA, McCullough ML, Calle EE, Thun MJ, Ascherio A. Nonsteroidal antiinflammatory drug use and the risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2005 ; 58(6): 963-7.
- Choi DY, Lee YJ, Hong JT, Lee HJ. Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease. *Brain Res Bull*. 2012 ; 87(2-3): 144-53.
- Chung YC, Ko HW, Bok E, Park ES, Huh SH, Nam JH, Jin BK. The role of neuroinflammation on the pathogenesis of Parkinson's disease. *BMB Rep*. 2010 ; 43(4): 225-32.
- Cicchetti F, Brownell AL, Williams K, Chen YI, Livni E, Isacson O. Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. *Eur J Neurosci* 2002, 15(6):991-998.
- Ciliax BJ, Heilman C, Demchyshyn LL, Pristupa ZB, Ince E, Hersch SM, et al. The dopamine transporter: immunochemical characterization and localization in brain. *J Neurosci*. 1995 ;15(3 Pt 1):1714-23.
- Clark CM, Schneider JA, Bedell BJ, Beach TG, Bilker WB, Mintun MA, et al; AV45-A07 Study Group. Use of florbetapir-PET for imaging beta-amyloid pathology. *JAMA*. 2011 ; 305 : 275-83.
- Collins LM, Toulouse A, Connor TJ, Nolan YM. Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*. 2012 ; 62(7): 2154-68.
- Cookson MR. Alpha-Synuclein and neuronal cell death. *Mol Neurodegener*. 2009 ; 4: 4:9.
- Cosenza-Nashat M, Zhao ML, Suh HS, Morgan J, Natividad R, Morgello S, Lee SC. Expression of the translocator protein of 18 kDa by microglia, macrophages and astrocytes based on immunohistochemical localization in abnormal human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2009 ; 35(3): 306-28.

Cropley VL, Fujita M, Innis RB, Nathan PJ Molecular Imaging of the Dopaminergic System and its Association with Human Cognitive Function. *Biol Psychiatry* 2006 ; 59: 898–907

Crotty S, Fitzgerald P, Tuohy E, Harris DM, Fisher A, Mandel A, et al. Neuroprotective effects of novel phosphatidylglycerol-based phospholipids in the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*. 2008 ; 27(2): 294-300.

Cumming P, Pedersen MD, Minuzzi L, Mezzomo K, Danielsen EH, Iversen P, et al. Distribution of PK11195 binding sites in porcine brain studied by autoradiography in vitro and by positron emission tomography. *Synapse*. 2006 ; 59(7): 418-26.

D'Asseler Y. Advances in SPECT imaging with respect to radionuclide therapy. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2009 ; 53(3): 343-7.

D'Aversa TG, Eugenin EA, Lopez L, Berman JW. Myelin basic protein induces inflammatory mediators from primary human endothelial cells and blood-brain-barrier disruption implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2012

Dale RC, Church AJ, Surtees RA, Lees AJ, Adcock JE, Harding B, et al. Encephalitis lethargica syndrome: 20 new cases and evidence of basal ganglia autoimmunity. *Brain*. 2004 ; 127(Pt 1): 21-33.

Das K, Ghosh M, Nag C, Nandy SP, Banerjee M, Datta M, et al. Role of familial, environmental and occupational factors in the development of Parkinson's disease. *Neurodegener Dis*. 2011 ; 8(5): 345-51.

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*. 2005 ; 8(6): 752-8.

Dawson TM, Seok Ko H, Dawson VL. Genetic Animal Models of Parkinson's Disease. *Neuron* 2010 ; 66 : 646-661

Debruyne JC, Van Laere KJ, Versijpt J, De Vos F, Eng JK, Strijckmans K, et al. Semiquantification of the peripheral-type benzodiazepine ligand [11C]PK11195 in normal human brain and application in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Belg*. 2002 ; 102(3): 127-35.

Degos V, Chhor V, Gressens P, Mantz J. Neuro-inflammation aiguë et stratégies neuroprotectrices. *Réanimation* 2009 ; V18 N°7 : 556-565

De Kemp RA, Epstein FH, Catana C, Tsui BM, Ritman EL. Small-animal molecular imaging methods. *J Nucl Med*. 2010 ; 51 Suppl 1: 18S-32S.

De la Fuente-Fernández R, Appel-Cresswell S, Doudet J, Sossi V. Functional neuroimaging in Parkinson's disease. *Expert Opinion on Medical Diagnostics* 2011, 5(2), 109-120.

De Lau LM, Bornebroek M, Wittteman JC, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM. Dietary fatty acids and the risk of Parkinson disease: the Rotterdam study. *Neurology*. 2005 ; 64(12) : 2040-5.

- Del Rio Hortega P. Microglia : Cytology and cellular pathology of the nervous system. 1937 ; Penfield W Ed. New York, Hoeber 2 : 483-534.
- Dentresangle C, Le Cavorsin M, Savasta M, Leviel V. Increased extracellular DA and normal evoked DA release in the rat striatum after a partial lesion of the substantia nigra. *Brain Res.* 2001 ; 893(1-2): 178-85.
- De Paulis T. The discovery of epidepride and its analogs as high-affinity radioligands for imaging extrastriatal dopamine D(2) receptors in human brain. *Curr Pharm Des.* 2003 ; 9(8): 673-96.
- De Simone R, Ajmone-Cat MA, Carnevale D, Minghetti L. Activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor by nicotine selectively up-regulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in rat microglial cultures. *J Neuroinflammation.* 2005 ; 2(1): 4.
- Deumens R, Blokland A, Prickaerts J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol* 2002; 175: 303-17.
- De Vries EF, Luurtsema G, BruÈssermannb M, Elsingaa PH, Vaalburga W. Fully automated synthesis module for the high yield one-pot preparation of 6-[18F]⁻uoro-L-DOPA. *Applied Radiation and Isotopes* 1999 ; 51 : 389-394
- De Vries EF. Imaging of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression: potential use in diagnosis and drug evaluation. *Curr Pharm Des.* 2006 ; 12(30): 3847-56.
- De Vries EF, Doorduyn J, Dierckx RA, van Waarde A. Evaluation of [(11)C]rofecoxib as PET tracer for cyclooxygenase 2 overexpression in rat models of inflammation. *Nucl Med Biol.* 2008 ; 35(1): 35-42.
- Dickstein LP, Zoghbi SS, Fujimura Y, Imaizumi M, Zhang Y, Pike VW, et al. Comparison of 18F- and 11C-labeled aryloxyanilide analogs to measure translocator protein in human brain using positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2011 Feb;38(2):352-7.
- Dissing-Olesen L, Ladeby R, Nielsen HH, Toft-Hansen H, Dalmau I, Finsen B. Axonal lesion-induced microglial proliferation and microglial cluster formation in the mouse. *Neuroscience.* 2007 ; 149(1): 112-22.
- Doble A, Burgevin MC, Ménager J, Ferris O, Bégassat F, Renault C, et al. Partial purification and pharmacology of peripheral-type benzodiazepine receptors. *J Recept Res.* 1987, 7(1-4):55-70.
- Dollé F, Bottlaender M, Demphel S, Emond P, Fuseau C, Coulon C, et al. Highly efficient synthesis of [11C]PE2I, a selective radioligand for the quantification of the dopamine transporter using PET. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 2000 ; 43 (10) : 997–1004.
- Dollé F, Emond P, Mavel S, Demphel S, Hinnen F, Mincheva Z, et al. Synthesis, radiosynthesis and in vivo preliminary evaluation of [11C]-LBT-999, a selective radioligand for the visualisation of the dopamine transporter with PET. *Bioorg. Med. Chem.* 2006 ; 14 : 1115–1125.

- Doorduyn J, de Vries EF, Willemsen AT, de Groot JC, Dierckx RA, Klein HC. Neuroinflammation in schizophrenia-related psychosis: a PET study. *J Nucl Med.* 2009 ; 50(11): 1801-7.
- Doorduyn J, Klein HC, de Jong JR, Dierckx RA, de Vries EF. Evaluation of [11C]-DAA1106 for imaging and quantification of neuroinflammation in a rat model of herpes encephalitis. *Nucl Med Biol.* 2010 ; 37(1): 9-15.
- Doorduyn J, Klein HC, Dierckx RA, James M, Kassiou M, de Vries EF. [11C]-DPA-713 and [18F]-DPA-714 as new PET tracers for TSPO: a comparison with [11C]-(R)-PK11195 in a rat model of herpes encephalitis. *Mol Imaging Biol.* 2009 ; 11(6): 386-98.
- Drake C, Boutin H, Jones MS, Denes A, McColl BW, Selvarajah JR, et al. Brain inflammation is induced by co-morbidities and risk factors for stroke. *Brain Behav Immun.* 2011 ; 25 : 1113-1122.
- Duke DC, Moran LB, Pearce RK, Graeber MB. The medial and lateral substantia nigra in Parkinson's disease: mRNA profiles associated with higher brain tissue vulnerability. *Neurogenetic* 2007 ; 8(2): 83-94.
- Dumont F, De Vos F, Versijpt J, Jansen HM, Korf J, Dierckx RA, Slegers G. In vivo evaluation in mice and metabolism in blood of human volunteers of [123I]iodo-PK11195: a possible single-photon emission tomography tracer for visualization of inflammation. *Eur J Nucl Med.* 1999 ; 26(3): 194-200.
- Dunlop BW, Nemeroff CB. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Arch Gen Psychiatry.* 2007 ; 64 : 327-37
- Dutta G, Zhang P, Liu B The Lipopolysaccharide Parkinson's disease animal model: mechanistic studies and drug discovery. *Fundam Clin Pharmacol.* 2008 ; 22(5): 453-464.
- Dzahini K, Dentresangle C, Le Cavorsin M, Bertrand A, Detraz I, Savasta M, Leviel V. Pre-synaptic glutamate-induced activation of DA release in the striatum after partial nigral lesion. *J Neurochem.* 2010, 113(6):1459-70.
- Ebadi M, Govitrapong P, Sharma S, Muralikrishnan D, Shavali S, Pellett L, et al. Ubiquinone (coenzyme q10) and mitochondria in oxidative stress of parkinson's disease. *Biol Signals Recept.* 2001 ; 10(3-4): 224-53.
- Eikelenboom P, Bate C, Van Gool WA, Hoozemans JJ, Rozemuller JM, Veerhuis R, Williams A. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and prion disease. *Glia.* 2002 ; 40(2): 232-9.
- Endres CJ, Pomper MG, James M, Uzuner O, Hammoud DA, Watkins CC, et al. Initial evaluation of 11C-DPA-713, a novel TSPO PET ligand, in humans. *J Nucl Med.* 2009 Aug ; 50(8): 1276-82.
- Endres CJ, Coughlin JM, Gage KL, Watkins CC, Kassiou M, Pomper MG. Radiation dosimetry and biodistribution of the TSPO ligand 11C-DPA-713 in humans. *J Nucl Med.* 2012 Feb ; 53(2): 330-5.
- Esposito E, Di Matteo V, Benigno A, Pierucci M, Crescimanno G, Di Giovanni G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2007 ; 205(2): 295-312.

Ekelund J, Slifstein M, Narendran R, Guillin O, Belani H, Guo NN, et al. In vivo DA D(1) receptor selectivity of NNC 112 and SCH 23390. *Mol Imaging Biol.* 2007 ; 9(3): 117-25.

Emond P, Garreau L, Chalon S, Boazi M, Caillet M, Bricard J, et al. Synthesis and ligand binding of nortropine derivatives: N-Substituted 2b-carbomethoxy-3b-(49-iodophenyl) nortropine and N-(3-iodoprop-2E-enyl)-2b-carbomethoxy-3b-(39,49-disubstituted phenyl)nortropine: New high-affinity and selective compounds for the dopamine transporter. *J Med Chem* 1997 ; 40: 1366–1372.

Emond P, Guilloteau D, Chalon S. PE2I: a radiopharmaceutical for in vivo exploration of the dopamine transporter. *CNS Neurosci Ther* 2008, 14(1):47-64.

Endres CJ, Kolachana BS, Saunders RC, Su T, Weinberger D, Breier A, et al. Kinetic modeling of [¹¹C]raclopride: combined PET-microdialysis studies. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997 ; 17(9): 932-42.

Etmnan M, Gill SS, Samii A. Intake of vitamin E, vitamin C, and carotenoids and the risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. *Lancet Neurol.* 2005 ; 4(6): 362-5.

Evatt ML, DeLong MR, Khazai N, Rosen A, Triche S, Tangpricha V. Prevalence of vitamin d insufficiency in patients with Parkinson disease and Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2008 ; 65(10) :1348-52.

Evatt ML, DeLong MR, Kumari M, Auinger P, McDermott MP, Tangpricha V; Parkinson Study Group DATATOP Investigators. High prevalence of hypovitaminosis D status in patients with early Parkinson disease. *Arch Neurol.* 2011 ; 68(3): 314-9.

Fahn S. The Case of the Frozen Addicts: How the Solution of an Extraordinary Medical Mystery Spawned a Revolution in the Understanding and Treatment of Parkinson's Disease. *The New England Journal of Medicine*, 1996 ; Vol. 335, Iss. 26; pg. 2002.

Felicio AC, Godeiro-Junior C, Shih MC, Borges V, Silva SM, Aguiar Pde C, et al. Evaluation of patients with Clinically Unclear Parkinsonian Syndromes submitted to brain SPECT imaging using the technetium-99m labeled tracer TRODAT-1. *J Neurol Sci.* 2010 ; 291(1-2): 64-8.

Floden AM, Li S, Combs CK. Beta-amyloid-stimulated microglia induce neuron death via synergistic stimulation of tumor necrosis factor alpha and NMDA receptors. *J Neurosci.* 2005 ; 25(10): 2566-75.

Fookes CJ, Pham TQ, Mattner F, Greguric I, Loc'h C, Liu X, et al. Synthesis and biological evaluation of substituted [¹⁸F]imidazo[1,2-a]pyridines and [¹⁸F]pyrazolo[1,5-a]pyrimidines for the study of the peripheral benzodiazepine receptor using positron emission tomography. *J Med Chem.* 2008 ; 51(13): 3700-12.

Fox SH, Brotchie JM. The MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease. Past, present, and future. *Prog Brain Res.* 2010 ; 184: 133-57.

Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med.* 2003 Apr 3;348(14):1365-75.

Fujimura Y, Ikoma Y, Yasuno F, Suhara T, Ota M, Matsumoto R, et al. Quantitative analyses of 18F-FEDAA1106 binding to peripheral benzodiazepine receptors in living human brain. *J Nucl Med.* 2006 ; 47(1): 43-50.

Fujimura Y, Zoghbi SS, Simèon FG, Taku A, Pike VW, Innis RB, Fujita M. Quantification of translocator protein (18 kDa) in the human brain with PET and a novel radioligand, (18)F-PBR06. *J Nucl Med.* 2009 ; 50(7): 1047-53.

Fujimura Y, Kimura Y, Siméon FG, Dickstein LP, Pike VW, Innis RB, Fujita M. Biodistribution and radiation dosimetry in humans of a new PET ligand, (18)F-PBR06, to image translocator protein (18 kDa). *J Nucl Med.* 2010 Jan;51(1):145-9.

Fujita M, Imaizumi M, Zoghbi SS, Fujimura Y, Farris AG, Suhara T, et al. Kinetic analysis in healthy humans of a novel positron emission tomography radioligand to image the peripheral benzodiazepine receptor, a potential biomarker for inflammation. *Neuroimage.* 2008 ; 40(1): 43-52.

Futura-santé, Cellules microgliales sous forme rémifiée, consultation le 30 avril 2012, www.futura-santé.com

Gao HM, Jiang J, Wilson B, Zhang W, Hong JS, Liu B. Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2002 ; 81(6): 1285-97.

Gao HM, Hong JS. Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. *Trends Immunol.* 2008 ; 29(8): 357-65.

Gao HM, Kotzbauer PT, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VM. Neuroinflammation and oxidation/nitration of alpha-synuclein linked to dopaminergic neurodegeneration. *J Neurosci.* 2008 ; 28(30): 7687-98.

Garden GA, Möller T. Microglia biology in health and disease. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2006 ; 1(2): 127-37.

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

Gerhard A, Banati RB, Goerres GB, Cagnin A, Myers R, Gunn RN, et al. [11C](R)-PK11195 PET imaging of microglial activation in multiple system atrophy. *Neurology.* 2003 ; 61(5): 686-9.

Gerhard A, Schwarz J, Myers R, Wise R, Banati RB. Evolution of microglial activation in patients after ischemic stroke: a [11C](R)-PK11195 PET study. *Neuroimage.* 2005 ; 24(2):591-5.

Gerlach M, Double K, Riederer P, Hirsch E, Jellinger K, Jenner P, et al. Iron in the Parkinsonian substantia nigra. *Mov Disord.* 1997 ; 12(2): 258-60.

Ginsberg MD. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* 2008 ; 55:363-389.

- Gisquet-Verrier P. Bases structurales et anatomiques de la mémoire. *Epilepsies* 2006 ; 18: 21-29.
- Goldstein M, Lieberman A. The role of the regulatory enzymes of catecholamine synthesis in Parkinson's disease. *Neurology*. 1992 ; 42(4 Suppl 4):8-12; discussion 41-8.
- Greenamyre JT, MacKenzie G, Peng TI, Stephens SE. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochem Soc Symp*. 1999 ; 66:85-97.
- Greuter HN, van Ophemert PL, Luurtsema G, van Berckel BN, Franssen EJ, Windhorst BD, Lammertsma AA. Optimizing an online SPE-HPLC method for analysis of (R)-[11C]1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide [(R)-[11C]PK11195] and its metabolites in humans. *Nucl Med Biol*. 2005 ; 32(3): 307-12.
- Guilloteau D, Emond P, Baulieu JL, Garreau L, Frangin Y, Pourcelot L, et al. Exploration of the Dopamine Transporter: In Vitro and In Vivo Characterization of a High-Affinity and High-Specificity Iodinated Tropane Derivative (E)-N-(3-iodoprop-2-enyl)-2b-carbomethoxy-3b-(49-methylphenyl)nortropine (PE2I). *Nuclear Medicine & Biology* 1998 ; Vol. 25, pp. 331–337.
- Gulyas B, Toth M, Vas A, Shchukin E, Kostulas K, Hillert J, Halldin C. Visualising neuroinflammation in post-stroke patients: a comparative PET study with the TSPO molecular imaging biomarkers [11C]PK11195 and [11C]vinpocetine. *Curr Radiopharm*. 2012 ; 5(1): 19-28.
- Hall H, Köhler C, Gawell L, Farde L, Sedvall G. Raclopride, a new selective ligand for the dopamine-D2 receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1988 ; 12(5): 559-68.
- Halldin C, Farde L, Högberg T, Mohell N, Hall H, Suhara T, et al. Carbon-11-FLB 457: a radioligand for extrastriatal D2 dopamine receptors. *J Nucl Med*. 1995 ; 36(7): 1275-81.
- Halldin C, Erixon-Lindroth N, Pauli S, Chou YH, Okubo Y, Karlsson P, et al. [(11)C]PE2I: a highly selective radioligand for PET examination of the dopamine transporter in monkey and human brain. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2003 ; 30(9): 1220-30.
- Heikkinen H, Varhe A, Laine T, Puttonen J, Kela M, Kaakkola S, Reinikainen K. Entacapone improves the availability of L-dopa in plasma by decreasing its peripheral metabolism independent of L-dopa/carbidopa dose. *Br J Clin Pharmacol*. 2002 ; 54(4): 363-71.
- Heneka MT, Rodriguez JJ, Verkhratsky A. Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Res Rev* 2010, 63(1-2):189-211.
- Henry V, Paille V, Lelan F, Brachet P, Damier P. Kinetics of microglial activation and degeneration of dopamine-containing neurons in a rat model of Parkinson disease induced by 6-hydroxydopamine. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009, 68(10):1092-1102.
- Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol* 2009, 8:382-397
- Hirsch EC, Hunot S, Damier P, Brugg B, Faucheux BA, Michel PP, et al. Glial cell participation in the degeneration of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Adv Neurol*. 1999 ; 80:9-18.

- Hirvonen J, Johansson J, Teräs M, Oikonen V, Lumme V, Virsu P, et al. Measurement of striatal and extrastriatal dopamine transporter binding with high-resolution PET and [11C]PE2I: quantitative modeling and test-retest reproducibility. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008 ; 28(5): 1059-69.
- Hirvonen J, Roivainen A, Virta J, Helin S, Någren K, Rinne JO. Human biodistribution and radiation dosimetry of 11C-(R)-PK11195, the prototypic PET ligand to image inflammation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010 ; 37(3): 606-12.
- Hirvonen J, Kreisl WC, Fujita M, Dustin I, Khan O, Appel S, et al. Increased in vivo expression of an inflammatory marker in temporal lobe epilepsy. *J Nucl Med*. 2012 ; 53(2): 234-40.
- Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology*. 1967 ; 17(5): 427-42.
- Höglinger GU, Carrard G, Michel PP, Medja F, Lombès A, Ruberg M, et al. Dysfunction of mitochondrial complex I and the proteasome: interactions between two biochemical deficits in a cellular model of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2003 ; 86(5): 1297-307.
- Honer M, Hengerer B, Blagoev M, Hintermann S, Waldmeier P, Schubiger PA, Ametamey SM. Comparison of [18F]FDOPA, [18F]FMT and [18F]FECNT for imaging dopaminergic neurotransmission in mice. *Nucl Med Biol*. 2006 ; 33(5): 607-14.
- Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L et al. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992 ; 55: 181-184.
- Hughes JL, Jones PS, Beech JS, Wang D, Menon DK, Aigbirhio FI, et al. A microPET study of the regional distribution of [11C]-PK11195 binding following temporary focal cerebral ischemia in the rat. Correlation with post mortem mapping of microglia activation. *Neuroimage*. 2012 ; 59(3): 2007-16.
- Hunot S, Vila M, Teismann P, Davis RJ, Hirsch EC, Przedborski S, et al. JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 ; 101(2): 665-70.
- Ichitani Y, Okamura H, Nakahara D, Nagatsu I, Iyata Y. Biochemical and immunocytochemical changes induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in the rat nigrostriatal dopamine neuron system: evidence for cell death in the substantia nigra. *Exp Neurol* 1994, 130(2):269-278.
- Ikeda-Matsuo Y, Hirayama Y, Ota A, Uematsu S, Akira S, Sasaki Y. Microsomal prostaglandin E synthase-1 and cyclooxygenase-2 are both required for ischaemic excitotoxicity. *Br J Pharmacol*. 2010 ; 159(5): 1174-86.
- Ikoma Y, Yasuno F, Ito H, Suhara T, Ota M, Toyama H, et al. Quantitative analysis for estimating binding potential of the peripheral benzodiazepine receptor with [(11)C]DAA1106. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007 ; 27(1): 173-84.
- Imaizumi M, Briard E, Zoghbi SS, Gourley JP, Hong J, Fujimura Y, et al. Brain and whole-body imaging in nonhuman primates of [11C]PBR28, a promising PET radioligand for peripheral benzodiazepine receptors. *Neuroimage*. 2008 ; 39(3): 1289-98.

Imaizumi M, Kim HJ, Zoghbi SS, Briard E, Hong J, Musachio JL, et al. PET imaging with [¹¹C]PBR28 can localize and quantify upregulated peripheral benzodiazepine receptors associated with cerebral ischemia in rat. *Neurosci Lett*. 2007 ; 411(3): 200-5.

Imaizumi M, Briard E, Zoghbi SS, Gourley JP, Hong J, Musachio JL, et al. Kinetic evaluation in nonhuman primates of two new PET ligands for peripheral benzodiazepine receptors in brain. *Synapse*. 2007 ; 61(8):595-605.

INSERM, Corps de Lewy – D’après Etienne Hirsch, consultation le 27 avril 2012, www.INSERM

International Parkinson Disease Genomics Consortium. Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet*. 2011 ; 377(9766): 641-9.

Iravani MM, Leung CC, Sadeghian M, Haddon CO, Rose S, Jenner P. The acute and the long-term effects of nigral lipopolysaccharide administration on dopaminergic dysfunction and glial cell activation. *Eur J Neurosci*. 2005 ; 22(2): 317-30.

Ito F, Toyama H, Kudo G, Suzuki H, Hatano K, Ichise M, et al. Two activated stages of microglia and PET imaging of peripheral benzodiazepine receptors with [¹¹C]PK11195 in rats. *Ann Nucl Med*. 2010 ; 24(3): 163-9.

Jackson-Lewis V, Przedborski S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nat Protoc*. 2007 ; 2(1): 141-51.

Jacobs AH, Tavittian B and the INMiND consortium. Noninvasive molecular imaging of neuroinflammation. *J Cereb Blood Flow and Metab*. 2012 ; 32 : 1393-1415.

James ML, Selleri S, Kassiou M. Development of ligands for the peripheral benzodiazepine receptor. *Curr Med Chem* 2006, 13:1991-2001

James ML, Fulton RR, Henderson DJ, Eberl S, Meikle SR, Thomson S, et al. Synthesis and in vivo evaluation of a novel peripheral benzodiazepine receptor PET radioligand. *Bioorg Med Chem*. 2005 ; 13(22) : 6188-94.

James ML, Fulton RR, Vercoullie J, Henderson DJ, Garreau L, Chalon S, et al. DPA-714, a new translocator protein-specific ligand: synthesis, radiofluorination, and pharmacologic characterization. *J Nucl Med*. 2008 ; 49(5): 814-22.

Jamin N, Neumann JM, Ostuni MA, Vu TK, Yao ZX, Murail S, et al. Characterization of the cholesterol recognition amino acid consensus sequence of the peripheral-type benzodiazepine receptor. *Mol Endocrinol*. 2005 ; 19(3):588-94.

Jarraya B, Boulet S, Ralph GS, Jan C, Bonvento G, Azzouz M, et al. Dopamine gene therapy for Parkinson's disease in a nonhuman primate without associated dyskinesia. *Sci Transl Med*. 2009 ; 1(2):2ra4.

Jewett DM, Kilbourn MR, Lee LC. A simple synthesis of [¹¹C]dihydrotrabenazine (DTBZ). *Nucl Med Biol*. 1997 ; 24(2): 197-9.

Johnston LC, Eberling J, Pivrotto P, Hadaczek P, Federoff HJ, et al. Clinically relevant effects of convection-enhanced delivery of AAV2-GDNF on the dopaminergic nigrostriatal pathway in aged rhesus monkeys. *Hum Gene Ther* 2009 ; 20: 497–510.

Johnston GA, Hanrahan JR, Chebib M, Duke RK, Mewett KN. Modulation of ionotropic GABA receptors by natural products of plant origin. *Adv Pharmacol*. 2006 ; 54: 285-316.

Josephs D, Spicer J, O'Doherty M. Molecular imaging in clinical trials. *Target Oncol*. 2009 ; 4(3): 151-68.

Jučaite A, Cselényi Z, Arvidsson A, Ahlberg G, Julin P, Varnäs K, et al. Kinetic analysis and test-retest variability of the radioligand [11C](R)-PK11195 binding to TSPO in the human brain - a PET study in control subjects. *EJNMMI Res*. 2012 ; 2:15.

Katsifis A, Mattner F, Mardon K, Najdovski L, Dikic B, Kassiou M. Synthesis and evaluation of an [123I]iodo-imidazo[1,2-a]pyridine as potential tracer for the study of the mitochondrial benzodiazepine receptor using SPECT. *J Lab Comp Radiopharm* 1997 ; 40 :620-2.

Katsifis A, Mattner F, Dikic B, Papazian V. Synthesis of substituted [123I]imidazo[1,2-a]pyridines as potential probes for the study of the peripheral benzodiazepine receptors using SPECT. *Radiochim Acta* 2000 ; 88 : 229-32.

Katsifis A, Loc'h C, Henderson D, Bourdier T, Pham T, Greguric I, et al. A rapid solid-phase extraction method for measurement of non-metabolised peripheral benzodiazepine receptor ligands, [(18F)PBR102 and [(18F)PBR111, in rat and primate plasma. *Nucl Med Biol*. 2011 ; 38(1): 137-48.

Kegeles LS, Slifstein M, Xu X, Urban N, Thompson JL, Moadel T, et al. Striatal and extrastriatal dopamine D2/D3 receptors in schizophrenia evaluated with [18F]fallypride positron emission tomography. *Biol Psychiatry*. 2010 ; 68(7): 634-41.

Kim WG, Mohny RP, Wilson B, Jeohn GH, Liu B, Hong JS. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci*. 2000 ; 20(16): 6309-16.

Kim SU, de Vellis J. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res*. 2005 ; 81(3): 302-13.

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

Kuikka JT, Akerman K, Bergström KA, Karhu J, Hiltunen J, Haukka J, et al. Iodine-123 labelled N-(2-fluoroethyl)-2 beta-carbomethoxy-3 beta-(4-iodophenyl)nortropane for dopamine transporter imaging in the living human brain. *Eur J Nucl Med*. 1995 ; 22(7): 682-6.

Kones R. Parkinson's disease : Mitochondrial Molecular Pathology, Inflammation, Statins and Therapeutic Neuroprotective Nutrition. *Nutrition in clinical practice* 2010 ; 25 (4) : 371-389

Koepp RA, Frey KA, Vander Borgh T, Karlamangla A, Jewett DM, Lee LC, et al. Kinetic evaluation of [11C]dihydrotrabenazine by dynamic PET: measurement of vesicular monoamine transporter. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996 ; 16(6): 1288-99.

- Kolseth IB, Agren J, Sundvold-Gjerstad V, Lyngstadaas SP, Wang JE, Dahle MK. 9-cis retinoic acid inhibits inflammatory responses of adherent monocytes and increases their ability to induce classical monocyte migration. *J Innate Immun.* 2012 ; 4(2): 176-86.
- Koprach JB, Reske-Nielsen C, Mithal P, Isacson O. Neuroinflammation mediated by IL-1beta increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation.* 2008 ; 5: 8.
- Koprach JB, Johnston TH, Reyes MG, Sun X, Brotchie JM. Expression of human A53T alpha-synuclein in the rat substantia nigra using a novel AAV1/2 vector produces a rapidly evolving pathology with protein aggregation, dystrophic neurite architecture and nigrostriatal degeneration with potential to model the pathology of Parkinson's disease. *Mol Neurodegener.* 2010 ; 5: 43.
- Kordower JH, Brundin P. Lewy body pathology in long-term fetal nigral transplants: is Parkinson's disease transmitted from one neural system to another? *Neuropsychopharmacology.* 2009 ; 34(1): 254.
- Korkhov VM, Sachse C, Short JM, Tate CG. Three-dimensional structure of TspO by electron cryomicroscopy of helical crystals. *Structure.* 2010 ; 18(6): 677-87.
- Kosaka J, Takahashi H, Ito H, Takano A, Fujimura Y, Matsumoto R, et al. Decreased binding of [11C]NNC112 and [11C]SCH23390 in patients with chronic schizophrenia. *Life Sci.* 2010 22 ; 86(21-22): 814-8.
- Kowall NW, Hantraye P, Brouillet E, Beal MF, McKee AC, Ferrante RJ. MPTP induces alpha-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons. *Neuroreport.* 2000 ; 11(1): 211-3.
- Kreisl WC, Fujita M, Fujimura Y, Kimura N, Jenko KJ, Kannan P, et al. Comparison of [(11)C]-(R)-PK 11195 and [(11)C]PBR28, two radioligands for translocator protein (18 kDa) in human and monkey: Implications for positron emission tomographic imaging of this inflammation biomarker. *Neuroimage.* 2010 ; 49(4): 2924-32.
- Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 1996. 19(8):312-318.
- Kropholler MA, Boellaard R, Schuitemaker A, van Berckel BN, Luurtsema G, Windhorst AD, Lammertsma AA. Development of a tracer kinetic plasma input model for (R)-[11C]PK11195 brain studies. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005 ; 25(7): 842-51.
- Kuge Y, Obokata N, Kimura H, Katada Y, Temma T, Sugimoto Y, et al. Synthesis and evaluation of a radioiodinated lumiracoxib derivative for the imaging of cyclooxygenase-2 expression. *Nucl Med Biol.* 2009 ; 36(8): 869-76.
- Kuhle J, Lindberg RL, Regeniter A, Mehling M, Steck AJ, Kappos L, Czaplinski A. Increased levels of inflammatory chemokines in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol.* 2009 ; 16(6): 771-4.
- Kumar A, Sharma N, Gupta A, Kalonia H, Mishra J. Neuroprotective potential of atorvastatin and simvastatin (HMG-CoA reductase inhibitors) against 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced Parkinson-like symptoms. *Brain Res.* 2012 Jul 9. [Epub ahead of print]

Kumar A, Chugani HT, Luat A, Asano E, Sood S. *Pediatr Neurol.* 2008 Jun;38(6):439-42. Epilepsy surgery in a case of encephalitis: use of 11C-PK11195 positron emission tomography.

Kung HF, Kasliwal R, Pan SG, Kung MP, Mach RH, Guo YZ. Dopamine D-2 receptor imaging radiopharmaceuticals: synthesis, radiolabeling, and in vitro binding of (R)-(+)- and (S)-(-)-3-iodo-2-hydroxy-6-methoxy-N- [(1-ethyl-2-pyrrolidinyl)methyl]benzamide. *J Med Chem.* 1988 ; 31(5): 1039-43.

Kung MP, Stevenson DA, Plössl K, Meegalla SK, Beckwith A, Essman WD, et al. [99mTc]TRODAT-1: a novel technetium-99m complex as a dopamine transporter imaging agent. *Eur J Nucl Med* 1997 ; 24: 372–380

Kunikowska G, Jenner P. Alterations in m-RNA expression for Cu, Zn-superoxide dismutase and glutathione peroxidase in the basal ganglia of MPTP-treated marmosets and patients with Parkinson's disease. *Brain Res.* 2003 ; 968(2): 206-18.

Kurkowska-Jastrzebska I, Bałkowiec-Iskra E, Joniec I, Litwin T, Członkowski A, Członkowska A. Immunization with myelin oligodendrocyte glycoprotein and complete Freund adjuvant partially protects dopaminergic neurons from 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced damage in mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 2005 ; 131(1): 247-54.

Kurz A, Double KL, Lastres-Becker I, Tozzi A, Tantucci M, Bockhart V, et al. A53T-alpha-synuclein overexpression impairs dopamine signaling and striatal synaptic plasticity in old mice. *PLoS One.* 2010 ; 5(7): e11464.

Landry Y, Gies JP. *Pharmacologie : Des cibles vers l'indication thérapeutique*, Dunod, 2009 (2e édition)

Langston JW: MPTP neurotoxicity: an overview and characterization of phases of toxicity. *Life Sci* 1985 ; 36: 201-206

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

Langston JW, Quik M, Petzinger G, Jakowec M, Di Monte DA. Investigating levodopa-induced dyskinesias in the Parkinsonian primate. *Ann Neurol* 2000 ; 47: S79–S89.

Lapointe N, St-Hilaire M, Martinoli MG, Blanchet J, Gould P, Rouillard C, Cicchetti F. Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity. *FASEB J.* 2004 ; 18(6): 717-9.

Laruelle M, D'Souza CD, Baldwin RM, Abi-Dargham A, Kanes SJ, Fingado CL, Seibyl JP, et al. Imaging D2 receptor occupancy by endogenous dopamine in humans. *Neuropsychopharmacology.* 1997 ; 17(3): 162-74.

Lee JK, Tran T, Tansey MG. Neuroinflammation in Parkinson's Disease. *J Neuroimmune Pharmacol* 2009 ; 4:419–429.

Lees AJ, Hardy J, Revesz T. Parkinson's disease. *Lancet.* 2009 ; 373(9680): 2055-66.

Le Fur G, Vaucher N, Perrier ML, Flamier A, Benavides J, Renault C, et al. Differentiation between two ligands for peripheral benzodiazepine binding sites, [3H]RO5-4864 and [3H]PK 11195, by thermodynamic studies. *Life Sci.* 1983 ; 33(5): 449-57.

Lenhardt S, Massillon L, Follet P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003 ; 100:8514-8519.

Lenaz G, Genova ML. Mobility and function of coenzyme Q (ubiquinone) in the mitochondrial respiratory chain. *Biochim Biophys Acta.* 2009 ; 1787(6): 563-73.

Le Pogam A, Vercouilly J, Corcia P, Praline J, Guilloteau D, Baulieu JL, et al. Preliminary results of PET with 18F-DPA714 in humans for detection of microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Nucl Med.* 2008; 49 (Supplement 1): 231P

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

Leviel V. Dopamine release mediated by the dopamine transporteur, facts and consequences. *Journal of Neurochem.* 2011 ; 118 : 475-489

Liang ZQ, Li YL, Zhao XL, Han R, Wang XX, Wang Y, Chase TN et al. NF-kappaB contributes to 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of nigral dopaminergic neurons through p53. *Brain Res.* 2007 ; 1145 : 190-203.

Lin X, Parisiadou L, Gu XL, Wang L, Shim H, Sun L, et al. Leucine-rich repeat kinase 2 regulates the progression of neuropathology induced by Parkinson's-disease-related mutant alpha-synuclein. *Neuron.* 2009 Dec 24 ; 64(6): 807-27.

Lin JJ, Chen CH, Yueh KC, Chang CY, Lin SZ. A CD14 monocyte receptor polymorphism and genetic susceptibility to Parkinson's disease for females. *Parkinsonism Relat Disord.* 2006 Jan ; 12(1): 9-13.

Lin KJ, Weng YH, Wey SP, Hsiao IT, Lu CS, Skovronsky D, et al. Whole-body biodistribution and radiation dosimetry of 18F-FP-(+)-DTBZ (18F-AV-133): a novel vesicular monoamine transporter 2 imaging agent. *J Nucl Med.* 2010 ; 51(9): 1480-5.

Ling ZD, Chang Q, Lipton JW, Tong CW, Landers TM, Carvey PM. Combined toxicity of prenatal bacterial endotoxin exposure and postnatal 6-hydroxydopamine in the adult rat midbrain. *Neuroscience.* 2004 ; 124(3): 619-28.

Liu G, Zhang C, Yin J, Li X, Cheng F, Li Y, et al. Alpha-Synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity. *Neurosci Lett.* 2009 ; 454(3): 187-92.

Liu S, Salyapongse AN, Geller DA, Vodovotz Y, Billiar TR. Hepatocyte toll-like receptor 2 expression in vivo and in vitro: role of cytokines in induction of rat TLR2 gene expression by lipopolysaccharide. *Shock.* 2000 ; 14(3): 361-5.

Liu J, Wang L, Zhan SY, Xia Y. Coenzyme Q10 for Parkinson's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011 ; (12): CD008150.

Loland CJ, Gråna C, Javitch JA, Gether U. Identification of Intracellular Residues in the Dopamine Transporter Critical for Regulation of Transporter Conformation and Cocaine Binding. *J Biol Chem* 2004 ; Vol. 279, No. 5, pp. 3228–3238

Long-Smith CM, Sullivan AM, Nolan YM. The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2009 ; 89(3): 277-87.

Lu CS, Weng YH, Chen MC, Chen RS, Tzen KY, Wey SP, et al. 99mTc-TRODAT-1 imaging of multiple system atrophy. *J Nucl Med.* 2004 ; 45(1): 49-55.

Luchtman DW, Shao D, Song C. Behavior, neurotransmitters and inflammation in three regimens of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Physiol Behav.* 2009 4; 98: 130-8.

Maeda J, Suhara T, Zhang MR, Okauchi T, Yasuno F, Ikoma Y, et al. Novel peripheral benzodiazepine receptor ligand [11C]DAA1106 for PET: an imaging tool for glial cells in the brain. *Synapse.* 2004 ; 52(4): 283-91.

Maeda J, Ji B, Irie T, Tomiyama T, Maruyama M, Okauchi T, et al. Longitudinal, quantitative assessment of amyloid, neuroinflammation, and anti-amyloid treatment in a living mouse model of Alzheimer's disease enabled by positron emission tomography. *J Neurosci.* 2007; 27(41): 10957-68.

Maguire-Zeiss KA, Federoff HJ. Future directions for immune modulation in neurodegenerative disorders: focus on Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 2010 ; 117(8): 1019-25.

Majo VJ, Prabhakaran J, Simpson NR, Van Heertum RL, Mann JJ, Kumar JS. A general method for the synthesis of aryl [11C]methylsulfones: potential PET probes for imaging cyclooxygenase-2 expression. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005 ; 15(19): 4268-71.

Mandel S, Grünblatt E, Maor G, Youdim MB. Early and late gene changes in MPTP mice model of Parkinson's disease employing cDNA microarray. *Mandel et al. 2003Neurochem Res.* 2002 ; 27(10): 1231-43.

Margolis DJ, Hoffman JM, Herfkens RJ, Jeffrey RB, Quon A, Gambhir SS. Molecular imaging techniques in body imaging. *Radiology.* 2007 ; 245(2): 333-56.

Marinova-Mutafchieva L, Sadeghian M, Broom L, Davis JB, Medhurst AD, Dexter DT. Relationship between microglial activation and dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra: a time course study in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2009 ; 110(3):966-975.

Marks WJ Jr, Ostrem JL, Verhagen L, Starr PA, Larson PS, Bakay RA, et al. Safety and tolerability of intraputamin 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.* 2008 ; 7(5): 400-8.

Marks WJ Jr, Bartus RT, Siffert J, Davis CS, Lozano A, Boulis N, et al. Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol.* 2010 Dec;9(12):1164-72. Epub 2010 Oct 20.

- Marshall VL, Reininger CB, Marquardt M, Patterson J, Hadley DM, Oertel WH, et al. Parkinson's disease is overdiagnosed clinically at baseline in diagnostically uncertain cases: a 3-year European multicenter study with repeat [123I]FP-CIT SPECT. *Mov Disord.* 2009 ; 24(4): 500-8.
- Martin WR, Wieler M, Stoessl AJ, Schulzer M. Dihydratetrabenazine positron emission tomography imaging in early, untreated Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2008 ; 63(3): 388-94.
- Martín A, Boisgard R, Thézé B, Van Camp N, Kuhnast B, Damont A, et al. Evaluation of the PBR/TSPO radioligand [(18F)DPA-714 in a rat model of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010 ; 30(1): 230-41.
- Masliah E, Hansen L, Adame A, Crews L, Bard F, Lee C, et al. A β vaccination effects on plaque pathology in the absence of encephalitis in Alzheimer disease. *Neurology* 2005 ; 64 : 129-131.
- Massoud TF, Gambhir SS. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev.* 2003 Mar 1;17(5):545-80.
- Mattner F, Katsifis A, Staykova M, Ballantyne P, Willenborg DO. Evaluation of a radiolabelled peripheral benzodiazepine receptor ligand in the central nervous system inflammation of experimental autoimmune encephalomyelitis: a possible probe for imaging multiple sclerosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2005 ; 32(5): 557-63.
- Mattner F, Mardon K, Katsifis A. Pharmacological evaluation of [123I]-CLINDE: a radioiodinated imidazopyridine-3-acetamide for the study of peripheral benzodiazepine binding sites (PBBS). *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008, 35:779-789
- Mattner F, Bandin DL, Staykova M et al. Evaluation of [(123)I]-CLINDE as a potent SPECT radiotracer to assess the degree of astroglia activation in cuprizone-induced neuroinflammation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011, 38:1516-1528
- McCormack AL, Mak SK, Shenasa M, Langston WJ, Forno LS, Di Monte DA. Pathologic modifications of alpha-synuclein in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated squirrel monkeys. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008 ; 67(8): 793-802.
- McCoy MK, Martinez TN, Ruhn KA, Szymkowski DE, Smith CG, Botterman BR, et al. Blocking soluble tumor necrosis factor signaling with dominant-negative tumor necrosis factor inhibitor attenuates loss of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2006 ; 26(37): 9365-75.
- McGeer PL, McGeer EG. Glial cell reactions in neurodegenerative diseases: pathophysiology and therapeutic interventions. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 1998 ; 12 Suppl 2:S1-6.
- McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 1998, 38(8):1285-1291.
- McGeer PL, Yasojima K, McGeer EG. Inflammation in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 2001, 86:83-89.

Meegalla SK, Plössl K, Kung MP, Chumpradit S, Stevenson DA, Kushner SA, et al. Synthesis and characterization of technetium-99m-labeled tropanes as dopamine transporter-imaging agents. *J Med Chem.* 1997 ; 40(1): 9-17.

Meredith GE, Kang UJ. Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. *Mov Disord.* 2006 ; 21(10): 1595-606.

Meredith GE, Totterdell S, Potashkin JA, Surmeier DJ. Modeling PD pathogenesis in mice: advantages of a chronic MPTP protocol. *Parkinsonism Relat Disord.* 2008 ; 14 Suppl 2: S112-5.

Middleton LS, Apparsundaram S, King-Pospisil KA, Dwoskin LP. Nicotine increases dopamine transporter function in rat striatum through a trafficking-independent mechanism. *Eur J Pharmacol.* 2007 Jan 12;554(2-3):128-36. Epub 2006 Oct 19.

Miklya I, Knoll B, Knoll J. A pharmacological analysis elucidating why, in contrast to (-)-deprenyl (selegiline), alpha-tocopherol was ineffective in the DATATOP study. *Life Sci.* 2003 ; 72(23): 2641-8.

Miyake Y, Tanaka K, Fukushima W, Sasaki S, Kiyohara C, Tsuboi Y, Fukuoka Kinki Parkinson's Disease Study Group. Lack of association of dairy food, calcium, and vitamin D intake with the risk of Parkinson's disease: a case-control study in Japan. *Parkinsonism Relat Disord.* 2011 ; 17(2): 112-6.

Miyake Y, Fukushima W, Tanaka K, Sasaki S, Kiyohara C, Tsuboi Y, et al. Fukuoka Kinki Parkinson's Disease Study Group. Dietary intake of antioxidant vitamins and risk of Parkinson's disease: a case-control study in Japan. *Eur J Neurol.* 2011 ; 18(1): 106-13.

Miyake Y, Tanaka K, Fukushima W, Sasaki S, Kiyohara C, Tsuboi Y, et al. Dietary intake of metals and risk of Parkinson's disease: a case-control study in Japan. *J Neurol Sci.* 2011 ; 306 (1-2): 98-102.

Miyake Y, Tanaka K, Fukushima W, Sasaki S, Kiyohara C, Tsuboi Y, et al. Fukuoka Kinki Parkinson's Disease Study Group. Case-control study of risk of Parkinson's disease in relation to hypertension, hypercholesterolemia, and diabetes in Japan. *J Neurol Sci.* 2010 Jun 15; 293(1-2): 82-6.

Mizrahi R, Rusjan PM, Kennedy J, Pollock B, Mulsant B, Suridjan I, et al. Translocator protein (18kDa) polymorphism (rs6971) explains in-vivo brain binding affinity of the PET radioligand [(18)F]-FEPPA. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 ; 32(6): 968-72.

Montero AJ, Jassem J. Cellular redox pathways as a therapeutic target in the treatment of cancer. *Drugs.* 2011 ; 71(11): 1385-96.

Moon Y, Lee KH, Park JH, Geum D, Kim K. Mitochondrial membrane depolarization and the selective death of dopaminergic neurons by rotenone: protective effect of coenzyme Q10. *J Neurochem.* 2005 ; 93(5): 1199-208.

Morais VA, Verstreken P, Roethig A, Smet J, Snellinx A, Vanbrabant M, et al. Parkinson's disease mutations in PINK1 result in decreased Complex I activity and deficient synaptic function. *EMBO Mol Med.* 2009 ; 1(2): 99-111.

- Morrish PK, Sawle GV, Brooks DJ. Clinical and [18F] dopa PET findings in early Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1995 ; 59(6): 597-600.
- Morissette M, Dridi M, Calon F, Hadj Tahar A, Meltzer LT, Bédard PJ, Di Paolo T. Prevention of levodopa-induced dyskinesias by a selective NR1A/2B N-methyl-D-aspartate receptor antagonist in parkinsonian monkeys: implication of preproenkephalin. *Mov Disord*. 2006 Jan ; 21(1): 9-17.
- Mosley RL, Hutter-Saunders JA, Stone DK, Gendelman HE. Inflammation and Adaptive Immunity in Parkinson's Disease In : *Perspectives in Medicine*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2012, 2(1) ; a009381.
- Mozley PD, Schneider JS, Acton PD, Plössl K, Stern MB, Siderowf A, et al. Binding of [99mTc]TRODAT-1 to dopamine transporters in patients with Parkinson's disease and in healthy volunteers. *J Nucl Med*. 2000 ; 41(4): 584-9.
- Mukherjee J, Yang ZY, Das MK, Brown T. Fluorinated benzamide neuroleptics--III. Development of (S)-N-[(1-allyl-2-pyrrolidinyl)methyl]-5-(3-[18F]fluoropropyl)-2, 3-dimethoxybenzamide as an improved dopamine D-2 receptor tracer. *Nucl Med Biol*. 1995 ; 22(3): 283-96.
- Mukherjee J, Christian BT, Narayanan TK, Shi B, Mantil J. Evaluation of dopamine D-2 receptor occupancy by clozapine, risperidone, and haloperidol in vivo in the rodent and nonhuman primate brain using 18F-fallypride. *Neuropsychopharmacology*. 2001 ; 25(4): 476-88.
- Mukherjee J, Christian BT, Dunigan KA, Shi B, Narayanan TK, Satter M, Mantil J. Brain imaging of 18F-fallypride in normal volunteers: blood analysis, distribution, test-retest studies, and preliminary assessment of sensitivity to aging effects on dopamine D-2/D-3 receptors. *Synapse*. 2002 ; 46(3): 170-88.
- Niemoller TD, Stark DT, Bazan NG. Omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid is the precursor of neuroprotectin D1 in the nervous system. *World Rev Nutr Diet*. 2009 ; 99: 46-54.
- NINDS NET-PD Investigators. A pilot clinical trial of creatine and minocycline in early Parkinson disease: 18-month results. *Clin Neuropharmacol*. 2008 ; 31(3): 141-50.
- NINDS NET-PD Investigators. A randomized, double-blind, futility clinical trial of creatine and minocycline in early Parkinson disease. *Neurology*. 2006 ; 66(5): 664-71.
- Norazit A, Meedeniya AC, Nguyen MN, Mackay-Sim A. Progressive loss of dopaminergic neurons induced by unilateral rotenone infusion into the medial forebrain bundle. *Brain Res*. 2010 Nov 11 ; 1360: 119-29.
- Nuytemans K, Theuns J, Cruts M, Van Broeckhoven C. Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. *Hum Mutat*. 2010 ; 31(7): 763-80.
- Obeso JA, Grandas F, Vaamonde J, Luquin MR, Artieda J, Lera G, et al. Motor complications associated with chronic levodopa therapy in Parkinson's disease. *Neurology*. 1989 ; 39(11 Suppl 2): 11-9.

- Oh U, Fujita M, Ikonomidou VN, Evangelou IE, Matsuura E, Harberts E, et al. Translocator protein PET imaging for glial activation in multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2011 ; 6(3): 354-61.
- Okada T, Fujita M, Shimada S, Sato K, Schloss P, Watanabe Y, et al. Assessment of affinities of beta-CIT, beta-CIT-FE, and beta-CIT-FP for monoamine transporters permanently expressed in cell lines. *Nucl Med Biol.* 1998 ; 25(1): 53-8.
- Olanow CW, Kordower JH, Lang AE, Obeso JA. Dopaminergic transplantation for Parkinson's disease: current status and future prospects. *Ann Neurol.* 2009 ; 66(5): 591-6.
- Olsson H, Halldin C, Farde L. Differentiation of extrastriatal dopamine D2 receptor density and affinity in the human brain using PET. *Neuroimage.* 2004 ; 22(2): 794-803.
- Ouchi Y, Yagi S, Yokokura M, Sakamoto M. Neuroinflammation in the living brain of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2009, 15 Suppl 3:S200-204.
- Ouchi Y, Yoshikawa E, Sekine Y, Futatsubashi M, Kanno T, Ogusu T, Torizuka T. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2005, 57(2):168-175.
- Ouchi Y, Yoshikawa E, Okada H, Futatsubashi M, Sekine Y, Iyo M, Sakamoto M. Alterations in binding site density of dopamine transporter in the striatum, orbitofrontal cortex, and amygdala in early Parkinson's disease: compartment analysis for beta-CFT binding with positron emission tomography. *Ann Neurol.* 1999 ; 45(5): 601-10.
- Owen DR, Gunn RN, Rabiner EA, Bennacef I, Fujita M, Kreisl WC, et al. Mixed-affinity binding in humans with 18-kDa translocator protein ligands. *J Nucl Med.* 2011 Jan;52(1):24-32.
- Owen DR, Yeo AJ, Gunn RN, Song K, Wadsworth G, Lewis A, et al. An 18-kDa translocator protein (TSPO) polymorphism explains differences in binding affinity of the PET radioligand PBR28. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 ; 32(1): 1-5.
- Pabon MM, Bachstetter AD, Hudson CE, Gemma C, Bickford PC. CX3CL1 reduces neurotoxicity and microglial activation in a rat model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation* 2011, 8:9.
- Pais TF, Figueiredo C, Peixoto R, Braz MH, Chatterjee S. Necrotic neurons enhance microglial neurotoxicity through induction of glutaminase by a MyD88-dependent pathway. *J Neuroinflammation.* 2008 Oct 9 ; 5: 43.
- Palop JJ, Chin J, Mucke L. A network dysfunction perspective on neurodegenerative diseases. *Nature.* 2006 ; 443(7113): 768-73.
- Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapère JJ, Lindemann P, et al. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci.* 2006 ; 27(8): 402-9.
- Papadopoulos V. Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function. *Endocr Rev.* 1993 ; 14(2): 222-40.

Pavese N, Gerhard A, Tai YF, Ho AK, Turkheimer F, Barker RA, et al. Microglial activation correlates with severity in Huntington disease: a clinical and PET study. *Neurology*. 2006 ; 66(11): 1638-43.

Pavese N, Kiferle L, Piccini P. Neuroprotection and imaging studies in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2009, 15 Suppl 4:S33-7.

Paxinos G, Watson C. 1986. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic editor. New York

Pedersen MD, Minuzzi L, Wirenfeldt M, Meldgaard M, Slidsborg C, Cumming P, Finsen B. Up-regulation of PK11195 binding in areas of axonal degeneration coincides with early microglial activation in mouse brain. *Eur J Neurosci*. 2006 ; 24(4): 991-1000.

Perez-Lloret S, Rascol O. Dopamine receptor agonists for the treatment of early or advanced Parkinson's disease. *CNS Drugs*. 2010 ; 24(11): 941-68.

Perry VH. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain Behav Immun*. 2004 ; 18: 407–413.

Perry VH, Cunningham C, Holmes C. Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat Rev Immunol*. 2007 ; 7(2): 161-7.

Peyronneau MA, Saba W, Dollé F, Goutal S, Coulon C, Bottlaender M, Valette H. Difficulties in dopamine transporter radioligand PET analysis: the example of LBT-999 using [18F] and [11C] labelling: part II: Metabolism studies. *Nucl Med Biol*. 2012 ; 39(3): 347-59.

Pharmaweb, Université de Lille, Les différentes voies centrales dopaminergiques, consultation le 20 avril 2012, www.Pharmaweb.com.

Poirier LJ, Giguère M, Marchand R. Comparative morphology of the substantia nigra and ventral tegmental area in the monkey, cat and rat. *Brain Res Bull*. 1983 ;11(3): 371-97.

Prediger RD, Aguiar AS Jr, Moreira EL, Matheus FC, Castro AA, Walz R, et al. The intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP): a new rodent model to test palliative and neuroprotective agents for Parkinson's disease. *Curr Pharm Des*. 2011 ; 17(5): 489-507.

Prunier C, Bézard E, Montharu J, Mantzarides M, Besnard JC, Baulieu JL, et al. Presymptomatic diagnosis of experimental Parkinsonism with 123I-PE2I SPECT. *Neuroimage* 2003 ; 19(3) : 810-6.

Przedborski S, Vila M. 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*. 2003 ; 991: 189-98.

Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*. 2007 ; 55(5): 453-62.

Quik M, Parameswaran N, McCallum SE, Bordia T, Bao S, McCormack A, et al. Chronic oral nicotine treatment protects against striatal degeneration in MPTP-treated primates. *J Neurochem*. 2006 Sep ; 98(6): 1866-75.

- Quinn LP, Crook B, Hous ME, Vidgeon-Hart M, Chapman H, Upton N, et al. The PPARgamma agonist pioglitazone is effective in the MPTP mouse model of Parkinson's disease through inhibition of monoamine oxidase B. *Br J Pharmacol*. 2008 ; 154(1): 226-33.
- Quintero EM, Willis L, Singleton R, Harris N, Huang P, Bhat N, Granholm AC. Behavioral and morphological effects of minocycline in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Brain Res*. 2006 ; 1093(1): 198-207.
- Raftopoulos C, Dethy S, Laute MA, Goldman S, Naini AB, Przedborski S, Hildebrand J. Slow increase of homovanillic acid in cerebrospinal fluid after levodopa administration. *Mov Disord*. 1996 ; 11(1): 59-62.
- Ramsey CP, Tsika E, Ischiropoulos H, Giasson BI. DJ-1 deficient mice demonstrate similar vulnerability to pathogenic Ala53Thr human alpha-syn toxicity. *Hum Mol Genet*. 2010 Apr 15 ; 19(8): 1425-37.
- Redgrave P, Rodriguez M, Smith Y, Rodriguez-Oroz MC, Lehericy S, Bergman H, et al. Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2010 ; 11(11) : 760-772.
- Riachi NJ, Harik SI. Strain differences in systemic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity in mice correlate best with monoamine oxidase activity at the blood-brain barrier. *1988 Life Sci*. 1988 ; 42(23): 2359-63.
- Ribeiro MJ, Vidailhet M, Loc'h C, Dupel C, Nguyen JP, Ponchant M, et al. Dopaminergic function and dopamine transporter binding assessed with positron emission tomography in Parkinson disease. *Arch Neurol*. 2002 Apr; 59(4): 580-6.
- Ribeiro MJ, Ricard M, Bourgeois S, Lièvre MA, Bottlaender M, Gervais P, et al. Biodistribution and radiation dosimetry of [¹¹C]raclopride in healthy volunteers. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2005 ; 32(8): 952-8.
- Ribeiro MJ, Ricard M, Lièvre MA, Bourgeois S, Emond P, Gervais P, et al. Whole-body distribution and radiation dosimetry of the dopamine transporter radioligand [(¹¹C)PE2I] in healthy volunteers. *Nucl Med Biol*. 2007 ; 34(4): 465-70.
- Ribeiro MJ, Thobois S, Lohmann E, du Montcel ST, Lesage S, Pelissolo A, et al. A multitracer dopaminergic PET study of young-onset parkinsonian patients with and without parkin gene mutations. *J Nucl Med*. 2009 ; 50(8): 1244-50.
- Rinne UK, Laihinén A, Rinne JO, Någren K, Bergman J, Ruotsalainen U. Positron emission tomography demonstrates dopamine D2 receptor supersensitivity in the striatum of patients with early Parkinson's disease. *Mov Disord*. 1990; 5(1): 55-9.
- Rodriguez-Pallares J, Parga JA, Muñoz A, Rey P, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: the role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurochem*. 2007 ; 103(1): 145-56.
- Rogers J, Mastroeni D, Leonard B, Joyce J, Grover A. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: are microglia pathogenic in either disorder? *Int Rev Neurobiol*. 2007 ; 82: 235-46.

- Ross CA, Smith WW. Gene-environment interactions in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2007 ; 13 Suppl 3: S309-15.
- Roy N, Cleren C, Singh SK, Yang L, Beal F, Goldman SA. Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nature Medicine* 2006 ; 12 : 1259 – 1268.
- Rudin M, Weissleder R. Molecular imaging in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* 2003 ; 2(2): 123-31.
- Rudnick G, Wall SC. Binding of the cocaine analog 2 beta-[3H] carboxymethoxy-3 beta-(4-fluorophenyl)tropane to the serotonin transporter. *Mol Pharmacol.* 1991 ; 40(3): 421-6.
- Rupprecht R, Rammes G, Eser D, Baghai TC, Schüle C, Nothdurfter C, et al. Translocator protein (18 kD) as target for anxiolytics without benzodiazepine-like side effects. *Science.* 2009 ; 325(5939): 490-3.
- Saba W, Valette H, Schöllhorn-Peyronneau MA, Coulon C, Ottaviani M, Chalon S, et al. [11C]LBT-999: a suitable radioligand for investigation of extra-striatal dopamine transporter with PET. *Synapse.* 2007 ; 61(1): 17-23.
- Salin H, Maitrejean S, Mallet J, Dumas S. Sensitive and quantitative co-detection of two mRNA species by double radioactive in situ hybridization. *J Histochem Cytochem.* 2000 ; 48(12): 1587-92.
- Salonen T, Haapalinna A, Heinonen E, Suhonen J, Hervonen A. Monoamine oxidase B inhibitor selegiline protects young and aged rat peripheral sympathetic neurons against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Acta Neuropathol.* 1996 ; 91(5): 466-74.
- Sánchez-Iglesias S, Méndez-Alvarez E, Iglesias-González J, Muñoz-Patiño A, Sánchez-Sellero I, Labandeira-García JL, Soto-Otero R. Brain oxidative stress and selective behaviour of aluminium in specific areas of rat brain: potential effects in a 6-OHDA-induced model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2009, 109(3):879-88.
- Sánchez-Pernaute R, Ferree A, Cooper O, Yu M, Brownell AL, Isacson O. Selective COX-2 inhibition prevents progressive dopamine neuron degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation.* 2004 May 17;1(1):6.
- Sandal M, Valle F, Tessari I, Mammi S, Bergantino E, Musiani F, et al. Conformational equilibria in monomeric alpha-synuclein at the single-molecule level. *PLoS Biol.* 2008 ; 6(1) :6.
- Sanlioglu S, Williams CM, Samavati L, Butler NS, Wang G, McCray PB Jr, et al. Lipopolysaccharide induces Rac1-dependent reactive oxygen species formation and coordinates tumor necrosis factor-alpha secretion through IKK regulation of NF-kappa B. *J Biol. Chem.* 2001 ; 276(32): 30188-98.
- Sauer H, Oertel WH. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* 1994, 59(2):401-415.

Sawada M, Imamura K, Nagatsu T. Role of cytokines in inflammatory process in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 2006 ; (70): 373-81.

Schapira AH, Jenner P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2011 ; 26(6): 1049-55.

Schintu N, Frau L, Ibba M, Caboni P, Garau A, Carboni E, Carta AR. PPAR-gamma-mediated neuroprotection in a chronic mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci.* 2009 Mar ; 29(5): 954-63.

Schlattner U, Tokarska-Schlattner M, Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2006 ; 1762(2): 164-80.

Schroeter M, Dennin MA, Walberer M, Backes H, Neumaier B, Fink GR, Graf R. Neuroinflammation extends brain tissue at risk to vital peri-infarct tissue: a double tracer [11C]PK11195- and [18F]FDG-PET study. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009 ; 29(6): 1216-25.

Schwarz J, Tatsch K, Gasser T, Arnold G, Oertel WH. [123]IBZM binding predicts dopaminergic responsiveness in patients with parkinsonism and previous dopaminomimetic therapy. *Mov Disord.* 1997 ; 12(6): 898-902.

Sciencebio, Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale, consultation le 26 avril 2012, www.sciencebio.com

Sensebé L, Bourin P. Mesenchymal stem cells for therapeutic purposes. *Transplantation* 2009 ; 87(9 Suppl): S49-53.

Serra PA, Pluchino S, Marchetti B, Desole MS, Miele E. The MPTP mouse model: cues on DA release and neural stem cell restorative role. *Parkinsonism Relat Disord.* 2008 ; 14 Suppl 2: S189-93.

Serra PA, Sciola L, Delogu MR, Spano A, Monaco G, Miele E, et al. The neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induces apoptosis in mouse nigrostriatal glia. Relevance to nigral neuronal death and striatal neurochemical changes. *J Biol Chem.* 2002 Sep 13; 277(37): 34451-61.

Shah F, Hume SP, Pike VW, Ashworth S, McDermott J. Synthesis of the enantiomer of [N-methyl-11C]-PK11195 and comparison of their behaviours as PK (peripheral benzodiazepine) binding site radioligands in rats. *Nucl Med Biol.* 1994; 21(4): 573-81.

Shchepinov MS, Chou VP, Pollock E, Langston JW, Cantor CR, Molinari RJ, Manning-Boğ AB. Isotopic reinforcement of essential polyunsaturated fatty acids diminishes nigrostriatal degeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Toxicol Lett.* 2011 ; 207(2): 97-103.

Shen LH, Tseng YC, Liao MH, Fu YK. The role of molecular imaging in the diagnosis and management of neuropsychiatric disorders. *J Biomed Biotechnol.* 2011, 2011:439397.

Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, et al. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2003 Nov 26; 23(34): 10756-64.

Shidahara M, Ikoma Y, Seki C, Fujimura Y, Naganawa M, Ito H, et al. Wavelet denoising for voxel-based compartmental analysis of peripheral benzodiazepine receptors with (18)F-FEDAA1106. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008 ; 35(2): 416-23.

Shim JH, Yoon SH, Kim KH, Han JY, Ha JY, Hyun DH, et al. The antioxidant Trolox helps recovery from the familial Parkinson's disease-specific mitochondrial deficits caused by PINK1- and DJ-1-deficiency in dopaminergic neuronal cells. *Mitochondrion*. 2011 ; 11(5): 707-15.

Shoshan-Barmatz V, Gincel D. The voltage-dependent anion channel: characterization, modulation, and role in mitochondrial function in cell life and death. *Cell Biochem Biophys*. 2003 ; 39(3): 279-92.

Siderowf A, Kurlan R. Monoamine oxidase and catechol-O-methyltransferase inhibitors. *Med Clin North Am*. 1999 ; 83(2): 445-67.

Sironi F, Trotta L, Antonini A, Zini M, Ciccone R, Della Mina E, et al. Alpha-Synuclein multiplication analysis in Italian familial Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2010 ; 16(3):228-31.

Snyder GL, Keller Jr RW, Zigmond MJ. Dopamine efflux from striatal slices after intracerebral 6-hydroxydopamine: evidence for compensatory hyperactivity of residual terminals. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;253: 867e76.

Spiga S, Lintas A, Migliore M, Diana M. Altered architecture and functional consequences of the mesolimbic dopamine system in cannabis dependence. *Addict Biol*. 2010 ; 15(3): 266-76.
Stokes AH, Hastings TG, Vrana KE. Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J Neurosci Res*. 1999 ; 55(6): 659-65.

Stence N, Waite M, Dailey ME. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia*. 2001 ; 33(3): 256-66.

Streit WJ, Mrak RE, Griffin WST. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *Journal of Neuroinflammation* 2004 ; 1:14 :10.1186/1742-2094-1-14

Streit WJ, Xue QS. Life and death of microglia. *J Neuroimmune Pharmacol* 2009, 4(4):371-379.

Su Y, Zhang Z, Trautmann K, Xu S, Schluesener HJ. TLR and NOD2 ligands induce cell proliferation in the rat intact spinal cord. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005 ; 64(11): 991-7.

Südmeyer M, Antke C, Zizek T, Beu M, Nikolaus S, Wojtecki L, et al. Diagnostic accuracy of combined FP-CIT, IBZM, and MIBG scintigraphy in the differential diagnosis of degenerative parkinsonism: a multidimensional statistical approach. *J Nucl Med*. 2011 ; 52(5): 733-40.

Szabó N, Kincses ZT, Vécsei L. Novel therapy in Parkinson's disease: adenosine A(2A) receptor antagonists. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2011 ; 7(4): 441-55.

Takano A, Gulyás B, Varrone A, Karlsson P, Sjöholm N, Larsson S, et al. Biodistribution and radiation dosimetry of the 18 kDa translocator protein (TSPO) radioligand [18F]FEDAA1106: a human whole-body PET study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2011 ; 38(11): 2058-65.

Takashima-Hirano M, Takashima T, Katayama Y, Wada Y, Sugiyama Y, Watanabe Y, Doi H, Suzuki M. Efficient sequential synthesis of PET Probes of the COX-2 inhibitor [11C]celecoxib and its major metabolite [11C]SC-62807 and in vivo PET evaluation. *Bioorg Med Chem*. 2011 ; 19(9): 2997-3004.

Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, Marras C, Bhudhikanok GS, Kasten M, Chade AR, Comyns K, Richards MB, Meng C, Priestley B, et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect*. 2011 ; 119(6): 866-72.

Tansey MG, McCoy MK, Frank-Cannon TC. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp Neurol* 2007, 208(1):1-25.

Tansey MG, Goldberg MS. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis*. 2010, 37:510-518

Tansey MG, Wyss-Coray T Cytokines in CNS inflammation and disease. In: Lane TE, Carson M, Bergmann C, Wyss-Coray T (eds) *Central nervous system diseases and inflammation*, 1st edn. Springer, New York, (2008) : 59–106

Tatsch K. Positron emission tomography in diagnosis and differential diagnosis of Parkinson's disease. *Neurodegener Dis*. 2010, 7(5):330-40.

Theil EC. Integrating iron and oxygen/antioxidant signals via a combinatorial array of DNA - (antioxidant response elements) and mRNA (iron responsive elements) sequences. *J Inorg Biochem*. 2006 ; 100(12): 2074-8.

Thiel A, Radlinska BA, Paquette C, Sidel M, Soucy JP, Schirmacher R, Minuk J. The temporal dynamics of poststroke neuroinflammation: a longitudinal diffusion tensor imaging-guided PET study with 11C-PK11195 in acute subcortical stroke. *J Nucl Med*. 2010 ; 51(9): 1404-12.

Thominiaux C, Dollé F, James ML, Bramoullé Y, Boutin H, Besret L, et al. Improved synthesis of the peripheral benzodiazepine receptor ligand [11C]DPA-713 using [11C]methyl triflate. *Appl Radiat Isot*. 2006 ; 64(5): 570-3.

Tomasi G, Bertoldo A, Cobelli C. PET parametric imaging improved by global-two-stage method. *Ann Biomed Eng*. 2009 ; 37(2): 419-27.

Tomasi G, Edison P, Bertoldo A, Roncaroli F, Singh P, Gerhard A, et al. Novel reference region model reveals increased microglial and reduced vascular binding of 11C-(R)-PK11195 in patients with Alzheimer's disease. *J Nucl Med*. 2008 ; 49(8): 1249-56.

Toulouse A, Sullivan AM. Progress in Parkinson's disease-where do we stand? *Prog Neurobiol*. 2008 ; 85(4): 376-92.

Trapani G, Franco M, Ricciardi L, Latrofa A, Genchi G, Sanna E, et al. Synthesis and binding affinity of 2-phenylimidazo[1,2- α]pyridine derivatives for both central and peripheral benzodiazepine receptors. A new series of high-affinity and selective ligands for the peripheral type. *J Med Chem*. 1997 ; 40(19): 3109-18.

Trincavelli ML, Marselli L, Falleni A, Gremigni V, Ragge E, Dotta F, et al. Upregulation of mitochondrial peripheral benzodiazepine receptor expression by cytokine-induced damage of human pancreatic islets. *J Cell Biochem.* 2002;84(3):636-44.

Turner MR, Cagnin A, Turkheimer FE, Miller CC, Shaw CE, Brooks DJ, et al. Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis.* 2004 ; 15(3): 601-9.

Tzeng SF, Hsiao HY, Mak OT. Prostaglandins and cyclooxygenases in glial cells during brain inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005 ; 4(3): 335-40.

Ugrumov MV. Non-dopaminergic neurons partly expressing dopaminergic phenotype: distribution in the brain, development and functional significance. *J Chem Neuroanat* 2009, 38(4):241-256.

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

Uppoor RS, Mummaneni P, Cooper E, Pien HH, Sorensen AG, Collins J, et al. The use of imaging in the early development of neuropharmacological drugs: a survey of approved NDAs. *Clin Pharmacol Ther.* 2008, 84(1):69-74.

Uversky VN. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J Neurochem.* 2007 ; 103(1): 17-37.

Van Berckel BN, Bossong MG, Boellaard R, Kloet R, Schuitmaker A, Caspers E, et al. Microglia activation in recent-onset schizophrenia: a quantitative (R)-[11C]PK11195 positron emission tomography study. *Biol Psychiatry.* 2008 ; 64(9): 820-2.

Van Camp N, Boisgard R, Kuhnast B, Thézé B, Viel T, Grégoire MC, et al. In vivo imaging of neuroinflammation: a comparative study between [18F]PBR111, [11C]CLINME and [11C]PK11195 in an acute rodent model. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2010 ; 37(5): 962-72.

Vandehey NT, Moirano JM, Converse AK, Holden JE, Mukherjee J, Murali D, et al. High-affinity dopamine D2/D3 PET radioligands 18F-fallypride and 11C-FLB457: a comparison of kinetics in extrastriatal regions using a multiple-injection protocol. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010 ; 30(5): 994-1007.

Van Laere K, Clerinx K, D'Hondt E, de Groot T, Vandenberghe W. Combined striatal binding and cerebral influx analysis of dynamic 11C-raclopridePET improves early differentiation between multiple-system atrophy and Parkinson disease. *J Nucl Med.* 2010 ; 51(4): 588-95.

Van Laere K, De Ceuninck L, Dom R, Van den Eynden J, Vanbilloen H, Cleynhens J, et al. Dopamine transporter SPECT using fast kinetic ligands: 123I-FP-beta-CIT versus 99mTc-TRODAT-1. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2004 ; 31(8): 1119-27.

Varrone A, Halldin C. Molecular imaging of the dopamine transporter. *J Nucl Med* 2010, 51:1331-1334.

Varrone A, Stepanov V, Nakao R, Toth M, Gulya's B, Emond P, et al. Imaging of the Striatal and Extrastriatal Dopamine Transporter with [18F]-LBT-999: Quantification, Biodistribution, and Radiation Dosimetry in Nonhuman Primates. *J Nucl Med* 2011 ; 52: 1313–1321.

- Vas A, Shchukin Y, Karrenbauer VD, Cselényi Z, Kostulas K, Hillert J, et al. Functional neuroimaging in multiple sclerosis with radiolabelled glia markers: preliminary comparative PET studies with [11C]vinpocetine and [11C]PK11195 in patients. *J Neurol Sci.* 2008 ; 264(1-2): 9-17.
- Veenman L, Gavish M. The role of 18 kDa mitochondrial translocator protein (TSPO) in programmed cell death, and effects of steroids on TSPO expression. *Curr Mol Med.* 2012 ; 12(4): 398-412.
- Veenman L, Shandalov Y, Gavish M. VDAC activation by the 18 kDa translocator protein (TSPO), implications for apoptosis. *J Bioenerg Biomembr.* 2008 ; 40(3): 199-205.
- Veiga S, Carrero P, Pernia O, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Translocator protein 18 kDa is involved in the regulation of reactive gliosis. *Glia.* 2007 ; 55(14): 1426-36.
- Venneti S, Lopresti BJ, Wiley CA. The peripheral benzodiazepine receptor (Translocator protein 18kDa) in microglia: from pathology to imaging. *Prog Neurobiol* 2006, 80(6):308-322.
- Venneti S, Lopresti BJ, Wang G, Slagel SL, Mason NS, Mathis CA et al. A comparison of the high-affinity peripheral benzodiazepine receptor ligands DAA1106 and (R)-PK11195 in rat models of neuroinflammation: implications for PET imaging of microglial activation. *J Neurochem* 2007, 102(6):2118-2131.
- Venneti S, Wagner AK, Wang G, Slagel SL, Chen X, Lopresti BJ, et al. The high affinity peripheral benzodiazepine receptor ligand DAA1106 binds specifically to microglia in a rat model of traumatic brain injury: implications for PET imaging. *Exp Neurol.* 2007 ; 207(1): 118-27.
- Venneti S, Wang G, Nguyen J, Wiley CA. The positron emission tomography ligand DAA1106 binds with high affinity to activated microglia in human neurological disorders. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008 ; 67(10): 1001-10.
- Verhoeff NP, Sokole EB, Stabin M, Hengst D, Kung HF, Van Royen EA, Janssen AG. Dosimetry of iodine-123 iodobenzamide in healthy volunteers. *Eur J Nucl Med.* 1993 ; 20(9): 747-52.
- Verschuer JD, Towson J, Eberl S, Katsifis A, Henderson D, Lam P, et al. Radiation dosimetry of the translocator protein ligands [(18)F]PBR111 and [(18)F]PBR102. *Nucl Med Biol.* 2012 ; 39(5): 742-53.
- Volkow ND, Wang GJ, Fischman MW, Foltin RW, Fowler JS, Abumrad NN, et al. Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy. *Nature.* 1997 ; 386(6627): 827-30.
- Wahner AD, Sinsheimer JS, Bronstein JM, Ritz B. Inflammatory cytokine gene polymorphisms and increased risk of Parkinson disease. *Arch Neurol.* 2007 ; 64(6): 836-40.
- Walsh S, Finn DP, Dowd E. Time-course of nigrostriatal neurodegeneration and neuroinflammation in the 6-hydroxydopamine-induced axonal and terminal lesion models of Parkinson's disease in the rat. *Neuroscience* 2011, 175:251-261.

- Walter BL, Vitek JL. Surgical treatment for Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2004 Dec ; 3(12): 719-28.
- Wang T, Qin L, Liu B, Liu Y, Wilson B, Eling TE, et al. Role of reactive oxygen species in LPS-induced production of prostaglandin E2 in microglia. *J Neurochem*. 2004 ; 88(4): 939-47.
- Wang J, Jiang YP, Liu XD, Chen ZP, Yang LQ, Liu CJ, et al. ^{99m}Tc-TRODAT-1 SPECT study in early Parkinson's disease and essential tremor. *Acta Neurol Scand*. 2005 ; 112(6): 380-385.
- Wang M, Yoder KK, Gao M, Mock BH, Xu XM, Saykin AJ, et al. Fully automated synthesis and initial PET evaluation of [¹¹C]PBR28. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009 ; 19(19): 5636-9.
- Weaver FM, Follett K, Stern M, Hur K, Harris C, Marks WJ Jr, et al. CSP 468 Study Group. Bilateral deep brain stimulation vs best medical therapy for patients with advanced Parkinson disease: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2009 ; 7; 301(1) : 63-73.
- Wenning GK, Donnemiller E, Granata R, Riccabona G, Poewe W. ¹²³I-beta-CIT and ¹²³I-IBZM-SPECT scanning in levodopa-naive Parkinson's disease. *Mov Disord*. 1998; 13(3): 438-45.
- Whitton PS. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol* 2007, 150(8):963-976.
- Whitton PS. Neuroinflammation and the prospects for anti-inflammatory treatment of Parkinson's disease. *Curr Opin Investig Drugs*. 2010 ; 11(7): 788-94.
- Wiley CA, Lopresti BJ, Venneti S, Price J, Klunk WE, DeKosky ST, Mathis CA. Carbon 11-labeled Pittsburgh Compound B and carbon 11-labeled (R)-PK11195 positron emission tomographic imaging in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2009 ; 66(1): 60-7.
- Willenborg DO. Neuroinflammation : mechanisms and managment. 2nd édition. *Immunology and Cell Biology* (2003) 81, 237–238; Edited by Paul L Wood. Humana Press, New Jersey USA.
- Williams-Gray CH, Goris A, Saiki M, Foltynie T, Compston DA, Sawcer SJ, Barker RA. Apolipoprotein E genotype as a risk factor for susceptibility to and dementia in Parkinson's disease. *J Neurol*. 2009 ; 256(3): 493-8.
- Winkeler A, Boisgard R, Awde AR, Dubois A, Thézé B, Zheng J, et al. The translocator protein ligand [¹⁸F]DPA-714 images glioma and activated microglia in vivo. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2012 ; 39(5): 811-23.
- Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol*. 2011 ; 26 Suppl 1: S1-58.
- Witt J, Marks WJ Jr. An update on gene therapy in Parkinson's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2011 ; 11(4): 362-70.
- Wu DC, Teismann P, Tieu K, Vila M, Jackson-Lewis V, Ischiropoulos H, Przedborski S. NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-

tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 13; 100(10): 6145-50.

Wu H, Lou C, Huang Z, Shi G. SPECT imaging of dopamine transporters with (99m)Tc-TRODAT-1 in major depression and Parkinson's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2011 ; 23(1): 63-7.

Xia R, Mao ZH. Progression of motor symptoms in Parkinson's disease. *Neuroscience Bulletin* 2012, 28(1):39-48.

Yan J, Xu Y, Zhu C, Zhang L, Wu A, Yang Y, et al. Simvastatin prevents dopaminergic neurodegeneration in experimental parkinsonian models: the association with anti-inflammatory responses. *PLoS One*. 2011 ; 6(6): e20945.

Yang F, Yang YP, Mao CJ, Cao BY, Cai ZL, Shi JJ, et al. Role of autophagy and proteasome degradation pathways in apoptosis of PC12 cells overexpressing human alpha-synuclein. *Neurosci Lett*. 2009 ; 454(3): 203-8.

Yang DJ, Bryant J, Chang JY, Mendez R, Oh CS, Yu DF, et al. Assessment of cyclooxygenase-2 expression with 99mTc-labeled celebrex. *Anticancer Drugs*. 2004 ; 15(3): 255-63.

Yasuda T, Mochizuki H. The regulatory role of α -synuclein and parkin in neuronal cell apoptosis; possible implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Apoptosis*. 2010 ; 15(11): 1312-21.

Yasuno F, Ota M, Kosaka J, Ito H, Higuchi M, Doronbekov TK, et al. Increased binding of peripheral benzodiazepine receptor in Alzheimer's disease measured by positron emission tomography with [11C]DAA1106. *Biol Psychiatry*. 2008 ; 64(10): 835-41.

Youdim M, Riederer P. Understanding Parkinson's disease. *Scientific American Magazine*, 1997 January, Staff Editor.

Yu S, Li X, Liu G, Han J, Zhang C, Li Y, et al. Extensive nuclear localization of alpha-synuclein in normal rat brain neurons revealed by a novel monoclonal antibody. *Neuroscience*. 2007 ; 145(2): 539-55.

Yu W, Wang E, Voll RJ, Miller AH, Goodman MM. Synthesis, fluorine-18 radiolabeling, and in vitro characterization of 1-iodophenyl-N-methyl-N-fluoroalkyl-3-isoquinoline carboxamide derivatives as potential PET radioligands for imaging peripheral benzodiazepine receptor. *Bioorg Med Chem*. 2008 ; 16(11): 6145-55.

Yuan H, Zhang ZW, Liang LW, Shen Q, Wang XD, Ren SM, Ma HJ, Jiao SJ, Liu P. Treatment strategies for Parkinson's disease. *Neurosci Bull*. 2010 Feb ; 26(1): 66-76.

Zanzonico P. Principles of nuclear medicine imaging: planar, SPECT, PET, multi-modality, and autoradiography systems. *Radiat Res*. 2012 ; 177(4): 349-64.

Zeintl J, Vija AH, Yahil A, Hornegger J, Kuwert T. Quantitative accuracy of clinical 99mTc SPECT/CT using ordered-subset expectation maximization with 3-dimensional resolution recovery, attenuation, and scatter correction. *J Nucl Med*. 2010 ; 51(6): 921-8.

- Zhang W, Li P, Hu X, Zhang F, Chen J, Gao Y. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the brain: metabolism and neuroprotection. *Front Biosci.* 2011 ; 17: 2653-70
- Zhang MR, Kida T, Noguchi J, Furutsuka K, Maeda J, Suhara T, Suzuki K. [(11)C]DAA1106: radiosynthesis and in vivo binding to peripheral benzodiazepine receptors in mouse brain. *Nucl Med Biol.* 2003 ; 30(5): 513-9.
- Zhang MR, Maeda J, Furutsuka K, Yoshida Y, Ogawa M, Suhara T, Suzuki K. [18F]FMDAA1106 and [18F]FEDAA1106: two positron-emitter labeled ligands for peripheral benzodiazepine receptor (PBR). *Bioorg Med Chem Lett.* 2003 ; 13(2): 201-4.
- Zhao YJ, Wee HL, Au WL, Seah SH, Luo N, Li SC, Tan LC. Selegiline use is associated with a slower progression in early Parkinson's disease as evaluated by Hoehn and Yahr Stage transition times. *Parkinsonism Relat Disord.* 2011 ; 17(3): 194-7.
- Ziebell M, Holm-Hansen S, Thomsen G, Wagner A, Jensen P, Pinborg LH, Knudsen GM. Serotonin transporters in dopamine transporter imaging: a head-to-head comparison of dopamine transporter SPECT radioligands 123I-FP-CIT and 123I-PE2I. *J Nucl Med.* 2010 ; 51(12): 1885-91.
- Ziebell M, Andersen BB, Thomsen G, Pinborg LH, Karlsborg M, Hasselbalch SG, Knudsen GM. Predictive value of dopamine transporter SPECT imaging with [¹²³I]PE2I in patients with subtle parkinsonian symptoms. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2012 ; 39(2): 242-50.
- Zijlmans J, Evans A, Fontes F, Katzenschlager R, Gacinovic S, Lees AJ, Costa D. [123I] FP-CIT spect study in vascular parkinsonism and Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2007 ; 22(9): 1278-85.
- Zisterer DM, Williams DC. Peripheral-type benzodiazepine receptors. *Gen Pharmacol.* 1997 ; 29(3): 305-14.

RESUME

Bien que les mécanismes moléculaires précis à l'origine de la neurodégénérescence dopaminergique ne soient pas encore totalement connus, un ensemble de preuves épidémiologiques, cliniques et expérimentales indiquent que la neuroinflammation peut avoir un rôle important dans la pathogenèse de la MP. L'étude des liens spatio-temporels entre la neuroinflammation et la neurodégénérescence au cours de la MP pourrait améliorer la compréhension du mécanisme physiopathologique et aussi l'accessibilité à un diagnostic précoce et/ou à de nouvelles approches thérapeutiques anti-inflammatoires. Le développement actuel des méthodes non invasives d'imagerie moléculaire permettant la surveillance directe du processus de neuroinflammation devrait être utile à cet effet. La cible moléculaire de choix dans ce domaine est la protéine de 18 kDa translocateur (TSPO), biomarqueur sensible associée à la neuroinflammation, qui est surexprimé dans les microglies activées.

Dans le travail présenté ici nous avons réalisé l'évaluation longitudinale des deux mécanismes physiopathologiques en parallèle avec les modifications de la fonction dopaminergique à plusieurs points au cours du temps après lésion à la 6-OHDA chez le rat, modèle qui imite un stade précoce de la MP. Après l'administration unilatérale, intra-striatale de la 6-OHDA, nous avons quantifié l'évolution temporelle de la TSPO, de l'immunoréactivité TH et du DAT dans le striatum et la SNC de 3 à 56 jours post-lésion (jpl). L'augmentation de la liaison des ligands de la TSPO utilisés, c-à-d [3H]-PK11195 et [125I]-CLINDE, a été observée dans le striatum lésé à 3, 7 et 14 jpl, suivie d'un retour progressif à un niveau basal à 56 jpl. Le profil de liaison dans la SNC a montré une augmentation progressive de la fixation qui débute à 3 jpl, avec un pic à 14 jpl, et diminue progressivement jusqu'à ce que 56 jpl. Dans ce modèle de rongeur de la MP, les processus neuroinflammatoire et neurodégénératif surviennent de façon concomitante. La présence transitoire de l'activation microgliale pourrait être impliquée dans l'apparition et l'installation durable de la perte neuronale dopaminergique. Cette étude confirme donc le lien entre la neuroinflammation et de la neurodégénérescence et met aussi l'accent sur l'intérêt du CLINDE comme traceur potentiel de la neuroinflammation in-vivo en fournissant des informations précieuses pour le diagnostic précoce et le suivi longitudinal de la progression de la maladie, avec des applications potentielles chez l'homme. En effet, la détection précoce de la neuroinflammation, de façon antérieure à une perte neuronale cliniquement significative, pourrait devenir un enjeu majeur dans la prise en charge pré-symptomatique de la MP. Dans ce sens, nous mettons en évidence l'existence d'une fenêtre thérapeutique, survenant juste après la lésion, qui peut être proposé pour l'introduction de traitements anti-inflammatoires qui viseraient à ralentir le processus neurodégénératif. La poursuite de l'exploration des relations entre la neuroinflammation et la neurodégénérescence in-vivo dans le même modèle animal avec la méthode d'imagerie micro-TEP, transposable à l'homme, en utilisant en parallèle le [18F]-DPA714 pour la TSPO et le [18F]-LBT999 pour le DAT est en cours.

RESUME EN ANGLAIS

Although the precise molecular mechanisms causing the dopaminergic neurodegeneration are still not totally understood, a body of epidemiological, clinical and experimental evidence indicates that neuroinflammation may have an important role in the pathogenesis of PD. Study of spatio-temporal links between neuroinflammation and neurodegeneration during the course of PD would improve understanding of the physiopathological mechanism and also accessibility to early diagnosis and/or new anti-inflammatory therapeutic approaches. The current development of non-invasive molecular imaging methods allowing direct monitoring of the neuroinflammation process should be valuable for this purpose. The molecular target of choice in this field is the 18 kDa translocator protein (TSPO), a sensitive biomarker associated with neuroinflammation, which is over-expressed in activated microglia.

In the study presented here we achieved the longitudinal evaluation of both physiopathological mechanisms in parallel with the modifications of dopaminergic function at several time-points after 6-OHDA lesion in the rat that mimics an early stage of PD. After unilateral intra-striatal 6-OHDA administration, we quantified the temporal evolution of the TSPO, TH immunoreactivity and DAT in the striatum and the SNc from 3 to 56 days post-lesion (dpl). Increased binding of TSPO ligands used, i.e. [3H]PK11195 and [125I]CLINDE, was observed in the lesioned striatum at 3, 7 and 14 dpl, followed by a progressive return to the basal level at 56 dpl. The binding profile in the SNc showed progressive binding beginning at 3 dpl, peaking at 14 dpl, and progressively decreasing until 56 dpl. In this rodent model of PD, the neuroinflammatory and neurodegenerative processes occurred concomitantly. The transitory occurrence of microglial activation could be involved in the advent and the lasting installation of dopaminergic neuron loss. This study supports the link between neuroinflammation and neurodegeneration and emphasizes the interest of CLINDE as potent in vivo tracer of neuroinflammation by providing valuable information for early diagnosis and longitudinal follow-up of disease progression, with potential applications to human patients. Indeed, early detection of neuroinflammation, prior to a clinically significant loss of neurons, could become a major issue in the management of pre-symptomatic PD. To support this idea, we demonstrate the existence of a therapeutic window, occurring just after the lesion, which may be proposed for the introduction of anti-inflammatory treatments that aimed to slow the neurodegenerative process. Further exploration of the relationship between neuroinflammation and neurodegeneration in vivo in the same animal model with the method of micro-PET imaging, transposable to humans, using in parallel the [18F]-DPA714 for TSPO and [18F]-LBT999 for DAT is pending.