

MARIE-PIER LAPLANTE CAMPBELL

CARACTÉRISATION DE MODÈLES MURINS DE LA
MALADIE DE PARKINSON (MPTP, PITX3) ET
MODIFICATION DES CELLULES SOUCHES
HÉMATOPOÏÉTIQUES POUR STIMULER LA
PRODUCTION DU « BRAIN-DERIVED
NEUROTROPHIC FACTOR » (BDNF)

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en physiologie-endocrinologie
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

PHYSIOLOGIE-ENDOCRINOLOGIE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2008

Résumé

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative caractérisée par des dysfonctions locomotrices causées, en grande partie, par la perte de neurones dopaminergiques de la substance noire. Les patients atteints de la maladie de Parkinson présentent un déficit en « brain-derived neurotrophic factors » (BDNF). Cette neurotrophine est nécessaire pour le développement, le maintien et la survie des neurones dopaminergiques. Nous avons utilisé la capacité naturelle des cellules souches hématopoïétiques à infiltrer les régions lésées du cerveau pour libérer ce facteur neurotrophique. Nous avons démontré que la modification des cellules de la moelle osseuse pour favoriser la production du BDNF permet d'améliorer les déficits locomoteurs des souris parkinsoniennes. De plus, la modification des cellules hématopoïétiques permet d'augmenter les niveaux de BDNF dans la substance noire, le cortex et le thalamus. La surproduction de BDNF permet également de stimuler la production de la dopamine au niveau de la substance noire.

Abstract

Parkinson's disease is a common neurodegenerative disorder characterized by locomotor dysfunctions. These motor symptoms are due to a severe loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. Parkinson's patients also have a deficit in the expression of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF). This neurotrophin plays an important role in the development, survival and neurotransmission of dopaminergic neurons. Considering that hematopoietic stem cells can infiltrate damaged brain regions, we have modified these cells to deliver the neurotrophic factor in Parkinson's disease mouse models. We have demonstrated that modification of bone marrow cells attenuates the locomotor dysfunctions in Parkinson's mice. In addition, overproduction of BDNF by hematopoietic cells increases BDNF levels in the substantia nigra, cortex and thalamus. Overproduction of BDNF also stimulates biosynthesis of dopamine in the substantia nigra.

Avant-Propos

Je tiens d'abord à remercier le Dr. Serge Rivest de m'avoir accepté dans son équipe de recherche. Sa rigueur scientifique et sa passion pour les sciences ont été une grande source d'inspiration. Ce fut une chance pour moi de travailler dans un tel laboratoire. Merci à Nataly Laflamme, Paul Préfontaine, Martine Lessard et Marie-Michèle Plante pour leur soutien technique. Je tiens également à saluer les étudiants du laboratoire, soit David Gosselin, Karine Richard, Gaëlle Naert et Vincent Boissonneault. Finalement, une pensée toute spéciale va à mes parents, Sylvie et Michel, ainsi qu'à mes deux frères Pierrick et William. Tout au long de ma maîtrise, j'ai pu compter sur la présence et les encouragements de mon copain Simon. Ton soutien a été particulièrement important et je tiens à t'en remercier.

Au bout de deux années de recherche, je vous présente donc mon mémoire de maîtrise. Ce mémoire a été entièrement réalisé dans le cadre de mes travaux de maîtrise. J'ai produit les expériences, les résultats, les analyses de même que les textes. Les chimères ont été construites par Martine Lessard. Paul Préfontaine a produit les lentivirus et a effectué les injections intrafémorales. J'ai effectué l'ensemble des hybridations *in situ* et des immunohistochimies. Pour ce qui est des tests de comportement, j'ai effectué les tests utilisant le système Flex-Field tandis que Mohammed Filali a fait les tests du rotarod et du « coat-hanger ». J'ai également effectué l'ensemble des analyses statistiques, excepté l'ANOVA à deux facteurs avec réplication qui a été fait en collaboration avec Bizhuang Zhu (étudiant en statistique et conseiller au Service de consultation statistique de l'Université Laval).

À mes parents

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Avant-Propos.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	ix
CHAPITRE I : Introduction.....	1
1.1. Maladie de Parkinson.....	2
1.2. Étiologie de la maladie de Parkinson.....	3
1.3. Pathogenèse de la maladie de Parkinson.....	3
1.4. Altération de la voie basale.....	6
1.4.1. Organisation de la voie basale.....	7
1.4.2. Pathophysiologie des symptômes moteurs de la maladie de Parkinson.....	8
1.5. Les cellules microgliales et l'inflammation.....	10
1.6. Rôles des cellules microgliales dans la maladie de Parkinson.....	12
1.7. Traitements thérapeutiques actuels.....	15
1.8. Les neurotrophines et la maladie de Parkinson.....	17
1.8.1. Les facteurs neurotrophiques.....	18
1.8.2. Le BDNF et la maladie de Parkinson.....	19
1.8.2.1. La survie neuronale.....	20
1.8.2.2. La neurotransmission de la dopamine.....	21
1.8.2.3. La neurotransmission GABAergique.....	21
1.8.2.4. Utilisation des facteurs trophiques dans le traitement de la maladie de Parkinson.....	22
1.8.3. Modification des cellules souches hématopoïétiques par l'utilisation de vecteurs lentiviraux.....	24
1.9. Modèles murins.....	25
1.9.1. Le modèle du MPTP.....	25
1.9.2. Le modèle Pitx3/ak.....	27
1.10. Objectifs du projet.....	30
1.11. Résumé de la méthodologie.....	30
CHAPITRE II : Bone Marrow Stem Cells Modification to Deliver the Brain-Derived Neurotrophic Factor in mouse model of Parkinson's disease.....	32
2.1. Résumé.....	33
2.2. Abstract.....	34
2.3. Introduction.....	35
2.4. Materials and methods.....	37
2.4.1. Animals.....	37
2.4.2. Irradiation and bone marrow transplantation.....	37
2.4.3. MPTP treatment.....	37
2.4.4. Production and femoral injection of lentiviral vector.....	38
2.4.5. Behavioral analysis.....	39
2.4.5.1. Rotorod test.....	39
2.4.5.2. Coat-hanger test.....	39

2.4.5.3. Flex-Field system.....	39
2.4.6. Tissue preparation.....	40
2.4.7. <i>In situ</i> hybridization.....	40
2.4.8. Immunohistochemistry.....	41
2.4.8.1. TH expression and loss of TH neurons.....	41
2.4.8.2. Infiltrating microglial cells.....	42
2.4.9. Statistical analysis.....	42
2.5. Results.....	43
2.5.1. Characterization of the MPTP model.....	43
2.5.2. Hematopoietic stem cells infiltrate MPTP mice.....	43
2.5.3. Pitx3/ak post-natal development.....	45
2.5.4. Behavioural characteristics of Pitx3/ak adult mice.....	46
2.5.5. Important loss of SNpc dopaminergic neurons in the Pitx3/ak adult mice.....	47
2.5.6. Pitx3/ak mice have a BDNF deficit.....	48
2.5.7. Bone marrow-derived cells infiltrate Pitx3/ak mice brain.....	49
2.5.8. Mechanisms implicated in microglial cells infiltration.....	49
2.5.9. Lenti-GFP/BDNF treatment improves locomotor activity of Pitx3/ak mice.....	51
2.5.10. Lenti-GFP/BDNF injection enhances BDNF mRNA expression.....	52
2.5.11. Lenti-GFP/BDNF injection enhances TH expression.....	53
2.6. Discussion.....	55
CHAPITRE III : Conclusion et perspectives.....	60
Bibliographie.....	66

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la voie nigrostriée chez les patients normaux et chez les patients atteints de la maladie de Parkinson.....	4
Figure 2 : Différents mécanismes pouvant être impliqués dans la neurodégénération dans la maladie de Parkinson.	6
Figure 3 : La maladie de Parkinson affecte à la fois la voie directe et la voie indirecte des ganglions de la base.	9
Figure 4 : Altération de la voie basale dans la maladie de Parkinson	10
Figure 5 : Synthèse et métabolisme de la dopamine. La tyrosine est transformée en L-DOPA par la tyrosine hydroxylase (TH)	16
Figure 6 : Certains facteurs neurotrophiques et leurs récepteurs	19
Figure 7 : Quelques voies stimulées par la liaison du BDNF à son récepteur TrkB.	24
Figure 8 : Représentation du métabolisme du MPTP	29
Figure 9: Time course of change in the neuronal density of wild-type chimeric mice without treatment and MPTP treated mice (subacute model).....	43
Figure 10: Microglial cells of bone marrow origin infiltrate the SNpc of MPTP mice as from 4 days after the first MPTP injection	44
Figure 11: MCP-1 mRNA expression in response to MPTP acute treatment. MCP-1 mRNA is expressed two days after MPTP injection compared to wild-type mice	44
Figure 12: TH immunohistochemistry and Nissl staining of midbrain sections show marked reduction in cell density in the SNpc of P1, P7 and P14 Pitx3/ak mice compared to age-matched control mice	45
Figure 13: Reduction of tyrosine hydroxylase (TH) level in the caudate putamen during the development of Pitx3/ak mice	46
Figure 14: Pitx3/ak mice have impaired locomotor activity.....	47
Figure 15: Loss of TH/Nissl positive neurons in the SNpc of Pitx3/ak mice.....	48
Figure 16: BDNF mRNA expression is significantly reduced in SNpc, cortex, thalamus and hippocampus of Pitx3/ak mice compared to control mice.....	50

Figure 17: Microglia of bone marrow origin (GFP) infiltrate the SNpc and CPU of adult Pitx3/ak mice	51
Figure 18: Lenti-GFP/BDNF improves locomotor activity in adult Pitx3/ak mice	52
Figure 19 : Expression levels of BDNF mRNA in different brain regions of Pitx3/ak, Pitx3/ak-Lenti-GFP and Pitx3/ak-Lenti-GFP/BDNF mice.....	53
Figure 20 : TH expression levels in the CPU and SNpc of Pitx3/ak, Pitx3/ak-Lenti-GFP and Pitx3/ak-Lenti-GFP/BDNF	54

Liste des abréviations

6-OHDA	6-hydroxydopamine
ABC	« Avidin-biotin-peroxidase complex »
ANOVA	Analyse de variance
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BBB	Barrière hémato-encéphalique
BDNF	« Brain-derived neurotrophic factor »
BSA	Albumine de sérum bovin
CCR2	« Monocyte chemotactic protein-1 receptor » ou « chemokine (C-C motif) receptor 2 »
CMVp	Promoteur du cytomegalovirus
CNS	Système nerveux central
CPU	Caudate putamen
CX3CL1	« Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 » ou fractalkine
CX3CR1	« Chemokine (C-X3-C) receptor 1 »
DA	Dopaminergique
DAB	3,3'-diaminobenzidine-4-HCl
DAT	Transporteur de la dopamine
DPBS-FBS	« Dulbecco's Phosphate buffered saline containing 2% fetal bovine serum »
GABA	Acide gamma-amino butyrique
GDNF	« Glial cell line-derived neurotrophic factor »
GFP	Protéine fluorescente verte
GPe	Globus pallidus externe
GPi	Globus pallidus interne

KPBS	« Potassium phosphate buffered saline »
L-DOPA	3,4-dihydroxy-L-phenylalanine
MCP-1	« Monocyte chemotactic protein-1 »
MPP+	1-methyl-4-phenylpyridinium
MPPP	1-methyl-4-phenyl-4-propionoxypiperidine
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
OD	Densité optique
PD	Maladie de Parkinson
PFA	Paraformaldéhyde
PGKp	« Phosphoglycerate kinase promoter »
SN	Substance noire
SNpc	Substance noire pars compacta
STN	Noyaux subthalamiques
TH	Tyrosine hydroxylase
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VMAT2	Transporteurs vésiculaires monoamine-2
VTA	Aire tegmentale ventrale

CHAPITRE I

Introduction

1.1. Maladie de Parkinson

S'il est vrai que James Parkinson a décrit la maladie de Parkinson en 1817, la description de syndromes parkinsoniens est également retrouvée dans des textes anciens ayurvédiques de l'Inde datant de 4500 à 1000 avant J-C (Kontakos and Stokes, 1999). Malgré cela, il a fallu attendre les années 1960 pour qu'une première percée importante voit le jour dans la recherche sur la maladie de Parkinson : la Lévodopa.

Actuellement, la maladie de Parkinson est la deuxième maladie neurodégénérative la plus commune, suivant la maladie d'Alzheimer. Au niveau mondial, 305 000 personnes sont annuellement diagnostiquées (Kontakos and Stokes, 1999). Considérant le vieillissement de la population, l'importance de la recherche est d'autant plus critique que l'incidence de la maladie augmente grandement avec l'âge. Par exemple, dans les pays occidentaux, les taux d'incidence s'échelonnent entre 8 et 13 habitants sur 100 000 ; l'incidence atteint 120 cas sur 100 000 à l'âge de 70 ans (Dauer and Przedborski, 2003).

Au niveau pathologique, la maladie de Parkinson est caractérisée par la perte de neurones dopaminergiques nigrostriés et par la présence d'inclusions intraneuronales cytoplasmiques, les corps de Lewy (Figure 1). Les corps cellulaires des neurones nigrostriés sont situés dans la substance noire pars compacta (SNpc) et leurs projections principalement dans le striatum (Dauer and Przedborski, 2003). La perte de neurones dans la SNpc provoque donc une diminution importante du niveau de dopamine dans le striatum. L'apparition des symptômes moteurs chez les patients parkinsoniens coïncide avec une perte de neurones nigrostriés d'environ 60% et une diminution de plus de 80% du niveau de dopamine striatal. Les symptômes moteurs sont divers et peuvent prendre la forme de tremblements au repos (les tremblements diminuent lors des mouvements volontaires et lors du sommeil), de bradykinésie (lenteur des mouvements), d'akinésie (rareté des mouvements), de rigidité musculaire ou encore d'une posture instable (Fleming *et al.*, 2005). Au-delà des anomalies motrices, les patients souffrent également de symptômes non-moteurs, tels la dysfonction cognitive, la dépression, l'anxiété et l'insomnie (Fleming *et al.*, 2005).

1.2. Étiologie de la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une pathologie complexe présentant de grandes variabilités dans l'étiologie, les symptômes et l'évolution. La variabilité s'explique par des effets compensatoires et également par le développement de pathologies additionnelles chez les patients atteints de la maladie de Parkinson (Linazasoro, 2008). Dans la majorité des cas, soit chez environ 95% des patients, la maladie est de nature sporadique et de cause inconnue. En effet, les variantes génétiques causales identifiées (*parkin*, α -synucléine, DJ-1, PINK1 et LRRK2) sont des facteurs de risque rares et ils ne comptent que pour une petite fraction de la prévalence de la maladie de Parkinson (Klein and Schlossmacher, 2007). Outre les facteurs de risque génétique, de nombreux facteurs ont été identifiés comme participant au développement de la maladie, notons : l'âge, le sexe mâle, l'origine caucasienne, certains traits de personnalité, le monoxyde de carbone, une diète riche en lipides, l'inflammation chronique, les traumatismes crâniens, le stress physique ou émotionnel, l'exposition aux pesticides, aux métaux et aux agents industriels, etc. (Ascherio *et al.*, 2006; Chade *et al.*, 2006).

1.3. Pathogenèse de la maladie de Parkinson

Indépendamment des causes de la maladie, la pathogenèse de la maladie de Parkinson pourrait être associée à plusieurs mécanismes (Figure 2). Une des hypothèses avance que la mort des neurones dopaminergiques de la SNpc serait provoquée par le mauvais repliement et l'agrégation de protéines. Dans les cas sporadiques, certaines protéines peuvent être modifiées directement ou encore suite à la dysfonction de chaperonnes et de protéasomes. Ces modifications favorisent l'agrégation des protéines et par le fait même, la formation de corps de Lewy. Les corps de Lewy sont des agrégats cytoplasmiques de plusieurs protéines, incluant l' α -synucléine, l'ubiquitine et les neurofilaments (Forno, 1996). Pour ce qui est de la deuxième grande hypothèse, elle propose que la perte de neurones serait reliée au stress oxydatif causé par la dysfonction des mitochondries (Dauer and Przedborski, 2003). En

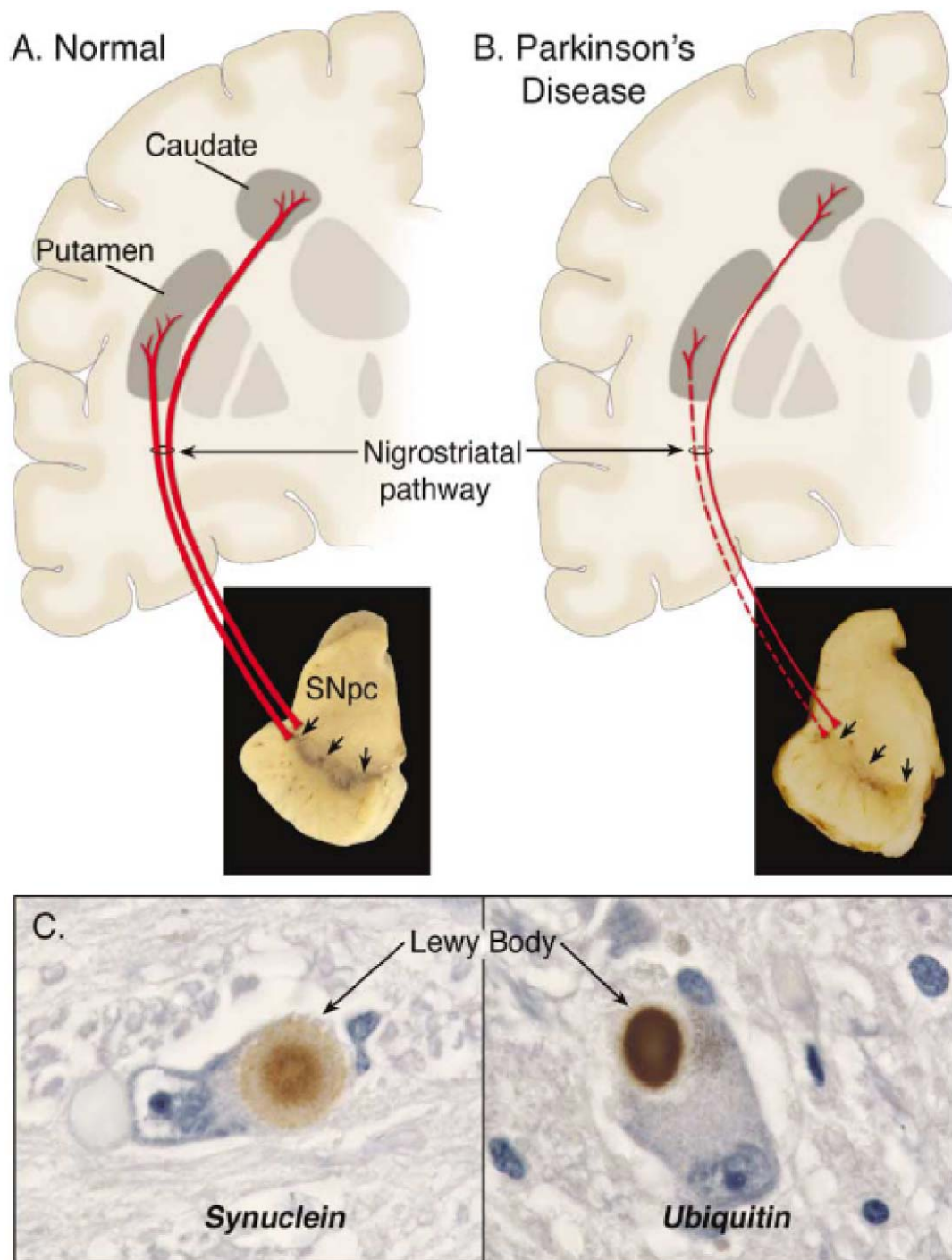


Figure 1 : Représentation schématique de la voie nigrostriée chez les patients normaux (A) et chez les patients atteints de la maladie de Parkinson (B). Les neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée possèdent leur corps cellulaire dans la SNpc et projettent vers le caudate/putamen. C) Les patients atteints de la maladie de Parkinson présentent des inclusions intraneuronales (Corps de Lewy) au niveau de la substance noire pars compacta. Tiré de Dauer and Przedborski (2003)

effet, le complexe I de la chaîne de transport des électrons serait affecté chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, et ce autant au niveau du système nerveux central (CNS) qu'en périphérie (Schapira *et al.*, 1990). La dysfonction du complexe I peut sensibiliser les cellules au stress oxydatif et à une défaillance énergétique. L'inhibition du complexe I augmente la production de superoxyde qui, par la suite, peut produire des radicaux hydroxyles toxiques ou encore réagir avec l'oxyde nitrique pour former du peroxy-nitrite. Ces molécules interagissent avec les acides nucléiques, les protéines et les lipides et par le fait même causent des dommages cellulaires. De plus, la présence d'espèces réactives oxygénées peut augmenter la proportion de protéines inadéquatement repliées. Il est également important de noter que les neurones dopaminergiques sont particulièrement sensibles au stress oxydatif. Premièrement, le métabolisme de la dopamine engendre la production de peroxyde d'hydrogène et de radicaux superoxyde (Graham, 1978). De plus, l'auto-oxydation de la dopamine produit de la dopamine-quinone, une molécule toxique qui endommage les protéines. Aussi, la diminution de l'énergie causée par une dysfonction mitochondriale déstabilise l'entreposage vésiculaire de la dopamine et crée une augmentation de la concentration cytosolique de la dopamine (Dauer and Przedborski, 2003). Ce phénomène facilite la production des réactions néfastes associées à la dopamine.

Bien que la cause ultime de la mort cellulaire observée dans la maladie de Parkinson ne soit pas totalement comprise, il a été suggéré que la perte des neurones dopaminergiques impliquerait la mort cellulaire programmée (Dauer and Przedborski, 2003). En effet, une augmentation de l'expression des gènes reliés à la mort cellulaire programmée est observée chez les patients atteints de la maladie de Parkinson. Par exemple, des études post-mortem ont révélé que l'expression de la caspase-3 (Hartmann *et al.*, 2000), de la caspase-8 (Hartmann *et al.*, 2001) et de la caspase-9 (Viswanath *et al.*, 2001) sont augmentées. Il peut donc être suggéré que la mort cellulaire programmée pourrait intervenir dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques.

Il a également été démontré que certaines molécules anti-apoptotiques, par exemple Bcl-x_L, sont surexprimées dans les neurones dopaminergiques du mésencéphale (Hartmann *et al.*,

2002). Il est possible que les neurones dopaminergiques subsistants soient protégés par la plus grande expression de Bcl-x_L. Ces résultats sont corroborés par le fait que, chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, les neurones de l'aire tegmentale ventrale (VTA), moins affectés que les neurones de la substance noire (SN), présentent également une surrégulation de la molécule anti-apoptotique Bcl-x_L (Hartmann *et al.*, 2002).

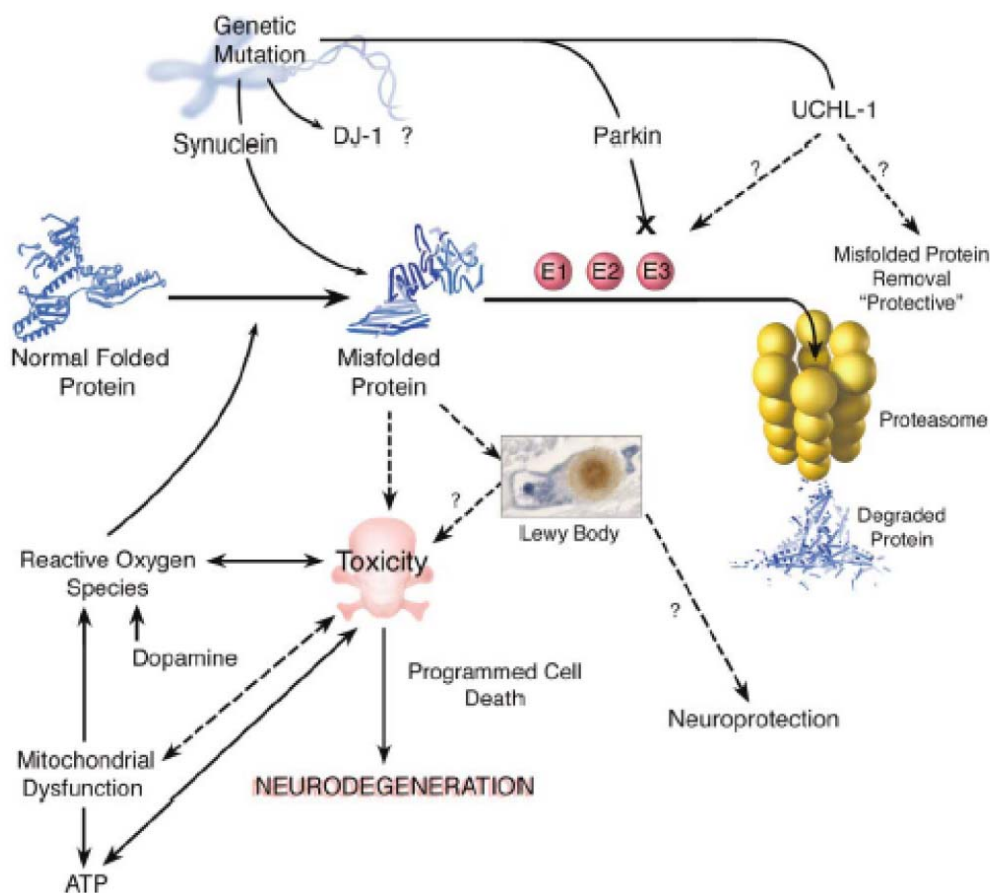


Figure 2 : Différents mécanismes pouvant être impliqués dans la neurodégénération dans la maladie de Parkinson.

Tiré de Dauer and Przedborski (2003)

1.4. Altération de la voie basale

Les symptômes de la maladie de Parkinson sont principalement causés par une perte sélective et progressive de neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée. Ce sont principalement les neurones dopaminergiques de la SNpc qui sont atteints. En effet, les neurones dopaminergiques mésolimbiques, soient les neurones ayant leur corps cellulaire

au niveau de la VTA, sont beaucoup moins affectés par la maladie de Parkinson (Uhl *et al.*, 1985).

1.4.1. Organisation de la voie basale

La voie basale est importante dans le contrôle des mouvements et joue un rôle critique dans la maladie de Parkinson. La voie basale est un groupe de noyaux sous-corticaux incluant le striatum (noyau caudé et putamen), le globus pallidus externe (GPe), le globus pallidus interne (GPi), la substance noire (SNpc, SN réticulée et SN latérale) et les noyaux subthalamiques (STN) (Squire *et al.*, 2003). La voie basale se divise grossièrement en deux parties : la voie directe et la voie indirecte (Purves *et al.*, 2001) (Figure 3). Ces deux voies jouent des rôles complémentaires. La voie directe, qui comprend les projections du striatum vers le globus pallidus interne et vers la substance noire réticulée, sert à relâcher l'inhibition tonique des neurones moteurs supérieurs. Quant à la voie indirecte, elle permet d'augmenter les niveaux d'inhibition tonique. Ainsi, les mouvements volontaires dépendent de l'activation de régions spécifiques de la voie directe, ce qui résulte en une réduction appropriée des signaux inhibiteurs de la voie basale (Factor and Weiner, 2002; Squire *et al.*, 2003). Il y a donc une désinhibition des neurones thalamocorticaux et par conséquent une facilitation des mouvements volontaires. Au contraire, par l'augmentation de l'inhibition, la voie indirecte participe à la suppression des mouvements (Factor and Weiner, 2002; Squire *et al.*, 2003). Les neurones dopaminergiques de la SNpc agissent autant sur la voie directe que sur la voie indirecte. Ainsi, les projections des neurones dopaminergiques du SNpc permettent à la fois l'excitation des neurones du striatum à l'origine de la voie directe et l'inhibition des neurones du striatum reliés à la voie indirecte (Factor and Weiner, 2002). En résumé, les influx de la SNpc vers le striatum permettent l'excitation des neurones projetant vers le GPi (voie directe) et l'inhibition des neurones projetant vers le GPe (voie indirecte) (Purves *et al.*, 2001). De façon globale, l'ensemble de ces deux voies permet la diminution des signaux inhibiteurs provenant de la voie basale et, par conséquent, l'augmentation de l'excitabilité des neurones moteurs supérieurs. Ainsi, lorsqu'il y a une perte importante des neurones dopaminergiques de la SNpc, comme dans la maladie de Parkinson, les signaux inhibiteurs de la voie basale sont augmentés (Figure 4). Ainsi, il y a une augmentation de l'inhibition tonique du thalamus, ce qui résulte en une diminution de

l'excitation des neurones moteurs du cortex. Cette diminution de la désinhibition de la voie basale est à l'origine de la majorité des symptômes moteurs caractéristiques de la maladie de Parkinson.

1.4.2. Pathophysiologie des symptômes moteurs de la maladie de Parkinson

Dans la maladie de Parkinson, les différents symptômes moteurs sont provoqués par une altération de la voie basale. Par exemple, l'akinésie et la bradykinésie sont causées par une augmentation des signaux provenant des ganglions de la base. L'augmentation de certains signaux, comme l'augmentation des signaux provenant du GPi ou de la SNr provoque une augmentation de l'inhibition tonique des neurones thalamocorticaux (Factor and Weiner, 2002; Hoover and Strick, 1993; Kojima *et al.*, 1997; Miller and DeLong, 1988; Wichmann and DeLong, 1993; Wichmann and DeLong, 1996) (Figure 4). Une inhibition exagérée de ces neurones contribue à diminuer l'excitabilité des neurones moteurs. Ainsi, suite à la réception de signaux impliqués dans l'initiation de mouvements, ces neurones seront moins excités et donc, le mouvement sera plus difficile à initier, d'où la bradykinésie (Alexander and Crutcher, 1990). La rigidité musculaire est également un symptôme de la maladie de Parkinson. La rigidité se caractérise par une augmentation uniforme de la résistance aux mouvements passifs. Bien que la pathophysiologie de la rigidité soit mal comprise, ce symptôme serait causé par des changements au niveau de la moelle épinière et également par une altération des signaux provenant du globus pallidus (Delwaide *et al.*, 1993). L'augmentation des signaux inhibiteurs des ganglions de la base serait également responsable des tremblements au repos. Une trop grande inhibition induirait une hyperpolarisation de certains neurones du thalamus, provoquant ainsi des bouffées de potentiels d'action de manière autonome (Lenz *et al.*, 1993). Ces potentiels sont ensuite transmis au cortex moteur et provoquent une innervation perturbée des muscles menant à l'apparition de mouvements involontaires prenant la forme de tremblements (Paré *et al.*, 1990).

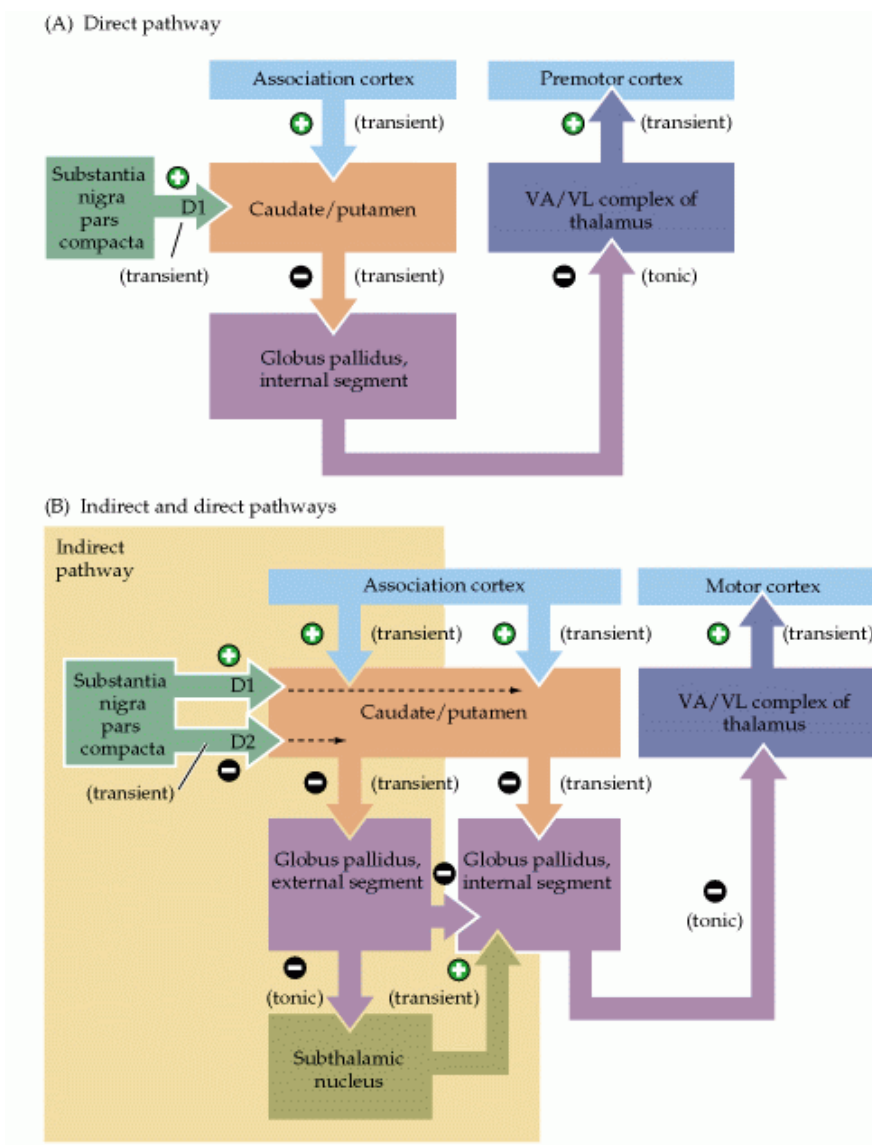


Figure 3 : La maladie de Parkinson affecte à la fois la voie directe et la voie indirecte des ganglions de la base. A) Dans la voie directe, les projections inhibitoires transitoires du caudate et du putamen projettent vers les neurones inhibiteurs du globus pallidus interne. Le globus pallidus interne inhibe de façon tonique les noyaux du thalamus. B) La voie indirecte (encadré jaune) permet l'activation transitoire des neurones inhibiteurs du caudate et du putamen. Ces neurones projettent vers les neurones inhibiteurs du globus pallidus externe qui inhibent les noyaux subthalamiques. Ces derniers excitent les neurones de globus pallidus interne et donc permet de contre-balancer l'action désinhibitoire de la voie directe. D1, récepteur 1 de la dopamine ; D2, Récepteur 2 de la dopamine, VA, noyau antérieur ventral ; VL, noyau latéral ventral.

Tiré de Purves *et al.* (2001)

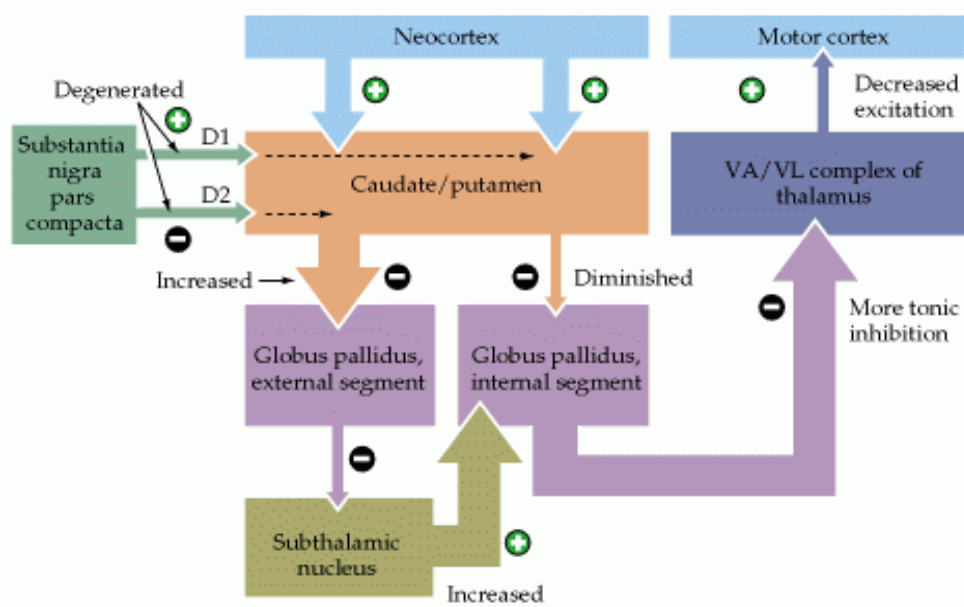


Figure 4 : Altération de la voie basale dans la maladie de Parkinson. La diminution des signaux provenant de la substance noire pars compacta entraîne une augmentation des signaux inhibiteurs de la voie basale. L'inhibition tonique des noyaux du thalamus est donc grandement augmentée, ce qui résulte en une diminution de l'excitabilité des neurones moteurs. D1, récepteur 1 de la dopamine ; D2, Récepteur 2 de la dopamine, VA, noyau antérieur ventral ; VL, noyau latéral ventral.

Tiré de Purves *et al.* (2001)

1.5. Les cellules microgliales et l'inflammation

Les cellules microgliales représentent environ 5 à 10 % de la population cellulaire du cerveau. La densité des cellules microgliales varie dans l'espace. Par exemple, la SN a une densité microgliale plus élevée comparativement aux autres régions du mésencéphale (Lawson *et al.*, 1990; Vila *et al.*, 2001). De plus, le cerveau des patients atteints de la maladie de Parkinson présente une accumulation de microglies activées dans la SN (Banati *et al.*, 1998; Forno, 1996; McGeer *et al.*, 1988). Des résultats similaires ont été observés chez des modèles murins parkinsoniens (Langston *et al.*, 1983; Nagatsu and Sawada, 2005). En tant que cellules immunitaires du CNS, les microglies phagocytent les débris et produisent plusieurs cytokines (Simard and Rivest, 2004b). Par le fait même, ces cellules sont au centre de la réponse innée du CNS et de la défense de l'hôte. Lorsque activée, la microglie peut exercer plusieurs fonctions. Entre autre, les microglies activées peuvent phagocyter les cellules endommagées, produire des substances neurotoxiques (anions

superoxyde, oxyde nitrique et glutamate) et neurotrophiques (neutrophines et cytokines pro-inflammatoires) (Abbas and Andrew, 2005; Simard and Rivest, 2006).

L'origine des microglies est depuis plusieurs décennies au centre d'un grand débat (Kaur *et al.*, 2001; Rezaie, 2003; Streit, 2001). Parmi les hypothèses proposées, les microglies parenchymales pourraient provenir 1) de la moelle osseuse (Kaur *et al.*, 2001), 2) du mésoderme (Del Rio-Hortega, 1932) et 3) du neuroectoderme (Del Rio-Hortega, 1932). Il faut d'abord distinguer deux types de microglies : les microglies résidentes et les microglies infiltrantes.

Les cellules microgliales résidentes infiltrent le parenchyme du CNS lors d'une période spécifique du développement, soit avant la maturation de la barrière hémato-encéphalique (BBB) et suite à l'expression de signaux de recrutement (Rezaie, 2003). Bien que le tissu d'origine et la lignée cellulaire de ces cellules demeurent incertains, il est suggéré que ces microglies soient d'origine hématopoïétique (Hess *et al.*, 2004; Soulet and Rivest, 2008; Vallieres and Sawchenko, 2003). En effet, une des hypothèses suggère que les monocytes circulants pénètrent le système nerveux, puis adoptent une forme amoéboïde et se différencient ensuite en microglies ramifiées (Andjelkovic *et al.*, 1998). La majorité des microglies résidentes envahissent le système nerveux lors des stades embryonnaires et fœtaux. Lors du stade adulte, un renouvellement des microglies est aussi possible soit grâce à l'auto-renouvellement des microglies résidentes ou encore par l'infiltration de monocytes issus du sang (Rezaie and Male, 2002; Simard and Rivest, 2004b). Par exemple, suite à une condition pathologique, les monocytes issus de la moelle osseuse sont recrutés (Beck *et al.*, 2003; Flügel *et al.*, 2001; Priller *et al.*, 2001; Simard and Rivest, 2004a; Simard and Rivest, 2006). En résumé, les monocytes se développent dans la moelle osseuse, gagnent la circulation sanguine, puis migrent dans le cerveau en traversant la BBB (Hess *et al.*, 2004; Priller *et al.*, 2001; Simard and Rivest, 2004a) pour ensuite se différencier en cellules microgliales (Hess *et al.*, 2004; Massengale *et al.*, 2005; Ono *et al.*, 1999; Simard and Rivest, 2004a). Rodriguez *et al.* (2007) ont démontré que les cellules hématopoïétiques adoptent différentes typologies dans le cerveau incluant des formes périvasculaires et parenchymales. Bien que les cellules monocytaires puissent infiltrer un cerveau sain, leur

niveau d'infiltration est beaucoup plus élevé suite à une lésion ou un dommage neuronal (Priller *et al.*, 2001). En effet, suite à un stimulus inflammatoire, les cellules endothéliales, les cellules périvasculaires, les cellules gliales et les neurones produisent des chimiokines (Simard and Rivest, 2006). Puisque les cellules monocytaires expriment les récepteurs répondant à ces protéines, les monocytes pourront adhérer aux cellules des vaisseaux sanguins (Simard and Rivest, 2006). Le recrutement des monocytes aux niveaux du CNS implique deux principales chimiokines, soit MCP-1 et fractalkine. Il est important de noter que ce sont des populations distinctes de monocytes qui répondent à ces signaux chimioattracteurs.

Il existerait, chez la souris, au moins deux principales sous-populations de monocytes infiltrants : les Ly-6C^{hi} (Gr1^{hi}CCR2⁺CX₃CR₁^{lo}) et Ly-6C^{lo} (Gr1^{lo}CCR2⁻CX₃CR₁^{hi}) (Nahrendorf *et al.*, 2007). Ces deux populations de monocytes se distinguent par leurs fonctions et également par les récepteurs de chimiokines qu'ils expriment (Nahrendorf *et al.*, 2007). Ainsi, les monocytes Ly-6C^{hi} expriment le récepteur du MCP-1, soit CCR2. Puisque MCP-1 est une molécule exprimée par les certaines cellules du système nerveux central suite à un stimulus inflammatoire (Simard and Rivest, 2006; Thibeault *et al.*, 2001), les monocytes Ly-6C^{hi} infiltrent principalement les sites inflammatoires (Geissmann *et al.*, 2003; Ziegler-Heitbrock, 2007). Leurs fonctions principales consistent à éliminer les débris via par l'expression de médiateurs inflammatoires, la protéolyse et la phagocytose (Nahrendorf *et al.*, 2007). Pour qui est des monocytes Ly-6C^{lo}, ils expriment le récepteur CX₃CR₁, soit le récepteur de la fractalkine (CX₃CL₁) (Geissmann *et al.*, 2003; Nahrendorf *et al.*, 2007). La fractalkine est exprimée par les cellules endothéliales, l'épithélium et par les neurones (Geissmann *et al.*, 2003). Nahrendorf *et al.* (2007) a démontré, dans un modèle d'ischémie du myocarde, que les monocytes Ly-6C^{lo} sont surtout impliqués dans les mécanismes de réparation, soit l'angiogenèse et la déposition de la matrice extracellulaire.

1.6. Rôles des cellules microgliales dans la maladie de Parkinson

Le rôle des microglies dans la pathogenèse des maladies neurodégénératives est controversé. Plusieurs auteurs ont démontré que les cellules microgliales contribuent à la

neurodégénération tandis que d'autres soutiennent que les microglies sont neuroprotectrices. Ce débat concerne également la maladie de Parkinson.

Les cellules microgliales peuvent promouvoir la survie et le maintien des neurones par divers mécanismes. Premièrement, la neuroprotection peut être assurée par la production de facteurs trophiques. En effet, la survie et le développement des neurones dopaminergiques nécessitent la présence de cellules ayant des propriétés trophiques. Batchelor *et al.* (1999) a démontré que suite à une lésion au niveau du striatum, les microglies s'activent et s'accumulent rapidement autour de la lésion. Par la suite, le nombre de microglies diminue, mais quelques-unes persistent et forment une population persistante de microglies activées. Au fil du temps, ces microglies expriment une quantité croissante d'ARNm de « glial cell line-derived neurotrophic factor » (GDNF) et de « brain-derived neurotrophic factor » (BDNF). Ces deux facteurs neurotrophiques sécrétés par les microglies promeuvent le bourgeonnement des fibres dopaminergiques et la régénération (Batchelor *et al.*, 1999). D'autres études ont également démontré la production de facteurs trophiques et de molécules de la matrice extracellulaire (laminine et thrombospondine) par les microglies (Wolfgang, 2002). La production de ces facteurs par les microglies permettrait la croissance des neurites suite à une lésion. Les microglies peuvent donc promouvoir la survie des neurones du CNS et la prolongation des neurites (Chamak *et al.*, 1994; Nagata *et al.*, 1993; Nakajima *et al.*, 1993; Rabchevsky and Streit, 1997; Streit *et al.*, 1999). Les cellules gliales peuvent également protéger les neurones dopaminergiques en éliminant les composés toxiques relâchés par les neurones dégénérants. Il est à noter que la dopamine peut produire des espèces réactives oxygénées. En métabolisant la dopamine, par l'intermédiaire de la catéchol-O-méthyltransférase, les cellules gliales protègent les neurones sains contre le stress oxydatif résiduel (Teismann and Schulz, 2004; Vila *et al.*, 2001). De plus, les cellules microgliales possèdent une autre enzyme, la glutathione peroxydase, qui détoxifie les espèces réactives oxygénées et par le fait même, protège les neurones dopaminergiques (Hirsch, 2000).

Bien qu'il ait été démontré que les microglies jouent un rôle bénéfique lors du développement de la maladie de Parkinson, d'autres études affirment que les cellules

gliales contribuent au développement de la maladie. Cette hypothèse est appuyée par le fait que l'activation des microglies, suite à une injection de lipopolysaccharides bactériens (LPS) au niveau de la SNpc, est suivie de la dégénérescence des neurones dopaminergiques (Liu and Hong, 2003). De plus, l'inhibition de l'activation des microglies par des agents pharmacologiques prévient la perte de neurones dopaminergiques par la LPS (Liu and Hong, 2003). Lorsqu'elles sont activées, les microglies peuvent produire une variété de molécules pouvant être nocives, dont les espèces réactives oxygénées et diverses molécules pro-inflammatoires, comme des prostaglandines et des cytokines (Teismann and Schulz, 2004). Parmi les espèces réactives, l'oxyde nitrique a été pointé comme un facteur clé de la maladie de Parkinson (Przedborski *et al.*, 1996). En effet, chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, de même que chez certains modèles murins, les cellules gliales expriment une forte concentration d'oxyde nitrique synthase (NOS) inductible (Vila *et al.*, 2001). Il est à noter que l'enzyme NOS inductible produit de l'oxyde nitrique et des radicaux superoxydes, deux espèces réactives pouvant provoquer la mort neuronale (Xia and Zweier, 1997).

Les cytokines sont un autre groupe de composés produits par les microglies et étudiés dans la maladie de Parkinson. En effet, les patients présentent une augmentation de certaines cytokines associées aux cellules gliales, tels le facteur nécrosant des tumeurs- α (TNF- α), l'interleukine-1 β (IL-1 β) et l'interféron- γ (IFN- γ) (Boka *et al.*, 1994; Hunot *et al.*, 1999; Sawada *et al.*, 2008; Vila *et al.*, 2001). L'augmentation de ces cytokines pro-inflammatoires est observée au niveau de la SNpc et du liquide cérébro-spinal des patients atteints de la maladie de Parkinson (Mogi *et al.*, 1994). Ces cytokines peuvent amplifier et propager la réponse gliale en stimulant les cellules avoisinantes. De plus, les cytokines pourraient agir directement sur les neurones dopaminergiques via leurs différents récepteurs. Suite à l'activation de ces récepteurs, une voie de signalisation reliée à la mort par apoptose est activée, ce qui induirait la mort des neurones (Teismann and Schulz, 2004; Vila *et al.*, 2001). Ces voies sont reliées à la translocation au noyau du facteur NF- κ B. Chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, la proportion de neurones dopaminergiques présentant une immunoréactivité de NF- κ B dans le noyau est 70 fois plus élevée que chez les patients sains (Hunot *et al.*, 1997). Mais, il faut garder à l'esprit que l'augmentation de

la concentration de ces cytokines peut également être causée par l'utilisation chronique des médicaments anti-parkinsoniens, tel la L-DOPA (Bessler *et al.*, 1999).

Finalement, la migration vers le CNS des cellules hématopoïétiques est d'un grand intérêt puisqu'elle ouvre la porte à l'utilisation de ces cellules pour acheminer des substances protectrices et thérapeutiques. La régulation de leur infiltration dans le temps et dans l'espace pourrait permettre l'élaboration de thérapies ciblées et efficaces.

1.7. Traitements thérapeutiques actuels

Les traitements actuels de la maladie de Parkinson améliorent la majorité des symptômes moteurs. Toutefois, malgré les recherches, aucun traitement ne permet de ralentir ou d'arrêter la dégénérescence des neurones dopaminergiques (Rascol *et al.*, 2002; Yahr *et al.*, 1969). Les traitements présentement utilisés ciblent le système dopaminergique et visent une augmentation de la dopamine dans la voie nigrostriée soit en : 1) augmentant la biosynthèse de la dopamine (3,4-dihydroxy-L-phenylalanine), 2) en diminuant la dégradation de la dopamine (inhibiteur de MAO-B, par exemple la sélégiline) et 3) en stimulant les récepteurs dopaminergiques restants (par exemple le pramipexole et le bromocriptine). Le traitement le plus efficace demeure l'administration d'un précurseur de la dopamine, la L-DOPA (pour un résumé de la synthèse de la dopamine voir Figure 5). En rétablissant le niveau de dopamine dans le cerveau, la L-DOPA allège presque tous les symptômes de la maladie de Parkinson. Toutefois, l'administration chronique de la L-DOPA provoque des effets secondaires moteurs et psychiatriques (Ahlskog and Muenter, 2001). De plus, le traitement à la L-DOPA n'influence pas le processus neurodégénératif de la maladie de Parkinson.

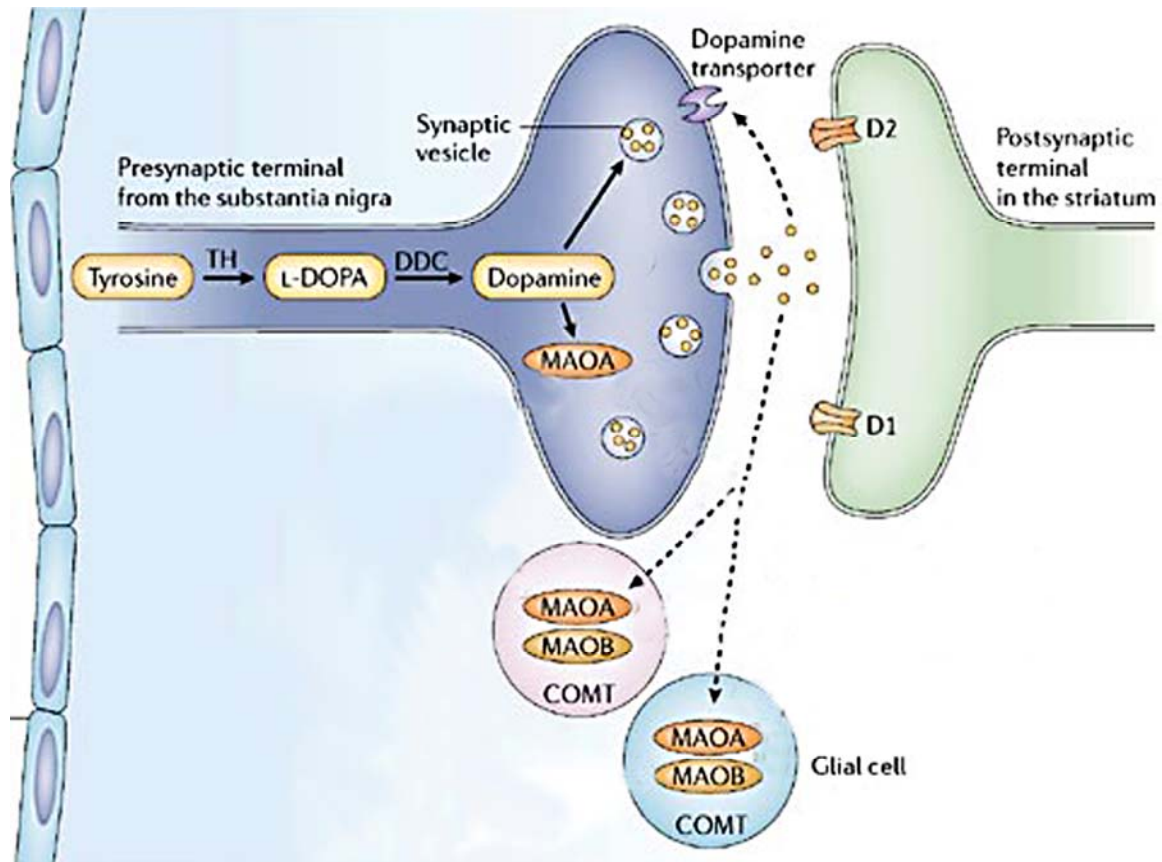


Figure 5 : Synthèse et métabolisme de la dopamine. La tyrosine est transformée en L-DOPA par la tyrosine hydroxylase (TH). La L-DOPA est décarboxylée par la dopa décarboxylase (DDC) pour former de la dopamine. Suite à son relâchement, le neurotransmetteur se lie à un de ses récepteurs. Il existe deux différentes familles de récepteurs, D1 et D2. La dopamine est captée dans les synapses par les transporteurs de la dopamine (DAT). Les DAT transportent la dopamine des synapses vers les neurones. La dopamine est métabolisée par la monoamine oxydase A neuronale (MAO-A) et par la monoamine oxydase A et B gliales (MAO-A + MAO-B).

Adapté de Youdim *et al.* (2006)

Au cours des dernières années, un nouveau traitement chirurgical à vu le jour : la stimulation profonde du cerveau. En résumé, ce traitement consiste en des impulsions électriques à haute fréquence envoyées par l'intermédiaire d'électrodes implantées dans certaines structures cérébrales, principalement dans le GPi et dans les STN (Samii *et al.*, 2004). La stimulation profonde permet d'améliorer les tremblements, la rigidité et la bradykinésie (Krack *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 1998; Limousin *et al.*, 1998; Moro *et al.*, 1999; Pollak *et al.*, 1993; Thobois *et al.*, 2002; Vingerhoets *et al.*, 2002). L'efficacité de la stimulation profonde est égale à celle de la L-DOPA (Vingerhoets *et al.*, 2002). Toutefois, des effets secondaires sont associés à la stimulation profonde, soit ceux relatifs à la

chirurgie (hémorragie cervicale, infarctus, mort, dysfonction ou infection du matériel) et ceux associés à la stimulation cérébrale (aggravation de la dyskinésie, dysfonctions subtiles de la cognition, de l'humeur, du langage) (Beric *et al.*, 2001). Une autre contrainte à la stimulation cervicale profonde est la sélection stricte des patients pouvant bénéficier de ce traitement. Un autre traitement chirurgical est également utilisé dans le traitement de la maladie de Parkinson : la transplantation de cellules dopaminergiques fœtales dans le striatum. Les cellules dopaminergiques fœtales greffées survivent et conservent leurs fonctions en ce qui a trait à la libération de la dopamine, à l'activation corticale et par conséquent, réduisent les dysfonctions motrices (Brundin *et al.*, 1988; Kordower *et al.*, 1995; Lindvall *et al.*, 1992; Perlow *et al.*, 1979; Piccini *et al.*, 1999). Toutefois, d'autres études ont démontré que malgré la survie des cellules greffées, l'amélioration clinique n'est pas significative après 12 et 24 mois (Freed *et al.*, 2001; Olanow *et al.*, 2003). De plus, une étude récente a étudié les caractéristiques histologiques post-mortem de cellules fœtales mésencéphaliques greffées chez un patient atteint de la maladie de Parkinson (Kordower *et al.*, 2008). Suite à la transplantation des cellules au niveau du putamen, les dysfonctions motrices se sont atténuées. Puis, environ dix ans après la transplantation, les fonctions motrices du patient se sont progressivement détériorées. L'analyse post-mortem a révélé que les cellules greffées avaient survécues et projetaient vers le striatum. Toutefois, il est intéressant de noter que les cellules greffées présentaient, tout comme les cellules restantes de la SNpc, une agrégation neuritique d' α -synucléine, soit la présence de corps de Lewy. Il est également important de noter que dans les modèles animaux, la greffe de cellules souches embryonnaires humaines provoque la formation de tumeurs (Brederlau *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2005). Bien que la greffe de cellules embryonnaires soit une avenue intéressante pour le traitement de la maladie de Parkinson, les effets secondaires potentiels, tel le développement de cancer et l'induction de la formation de corps de Lewy dans les cellules greffés, demeurent présents et donc, des études supplémentaires sont nécessaires.

1.8. Les neurotrophines et la maladie de Parkinson

Bien que certains traitements symptomatiques soient efficaces pendant plusieurs années, ils présentent tous des limites importantes. Une nouvelle approche thérapeutique est donc

nécessaire. L'utilisation des facteurs neurotrophiques constitue une voie thérapeutique intéressante.

1.8.1. Les facteurs neurotrophiques

Les facteurs neurotrophiques sont impliqués dans la survie neuronale, la stimulation de la croissance axonale et la formation des contacts synaptiques lors du développement (Siegel and Chauhan, 2000). Au stade adulte, les facteurs neurotrophiques sont requis pour soutenir les fonctions et le phénotype neuronal (Siegel and Chauhan, 2000) de même que pour assurer une plasticité morphologique et synaptique (Schinder and Poo, 2000). Il est aussi possible que, sous des conditions pathologiques, les facteurs neurotrophiques puissent moduler les dysfonctions neuronales, l'activation des astrocytes et les réactions inflammatoires (Siegel and Chauhan, 2000). Le rôle que jouent les facteurs neurotrophiques au sein du cerveau est si essentiel qu'il n'est pas exclu qu'un changement dans leur régulation soit un facteur critique dans la cascade pathologique de la maladie de Parkinson.

Plusieurs études se sont intéressées aux effets des différents facteurs neurotrophiques sur les neurones dopaminergiques. Les études *in vitro* ont démontré que les facteurs trophiques BDNF, NT-3, NT-4/5, IGF-1, aFGF, bFGF, EGF, GDNF et TGF β permettaient, à divers niveaux de spécificité, la survie des neurones dopaminergiques embryonnaires (Casper *et al.*, 1991; Engle and Bohn, 1991; Engle and Franke, 1996; Hyman *et al.*, 1991; Hynes *et al.*, 1994; Knüsel and Hefti, 1991; Krieglstein *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1993). Bien que le BDNF soit exprimé dans différents organes périphériques, son expression la plus élevée est localisée dans le cerveau. L'ARNm de même que la protéine BDNF se retrouvent dans plusieurs régions cérébrales, telles que le septum, le cortex, l'hippocampe, l'hypothalamus, l'amygdale, le striatum, la SN, etc. (Kawamoto *et al.*, 1996; Tapia-Arancibia *et al.*, 2004). Au niveau des neurones, le BDNF est surtout présent dans les dendrites, les fibres, le cytoplasme et le noyau (Fumagalli *et al.*, 2006; Wetmore *et al.*, 1991). Cette neurotrophine se lie à son récepteur spécifique, TrkB, et à un récepteur non spécifique, p75NTR (Figure 6) (Chao and Hempstead, 1995; Glass and Yancopoulos, 1993). Le récepteur TrkB est exprimé dans plusieurs structures, notamment le cortex, l'hippocampe, le thalamus, l'hypothalamus, le striatum, la SN et le cervelet (Yan *et al.*, 1997). L'expression à la fois du

récepteur et de la protéine BDNF au niveau du striatum et de la SN suggère qu'une boucle paracrine et autocrine du facteur trophique pourrait participer à la maintenance des neurones dopaminergiques matures.

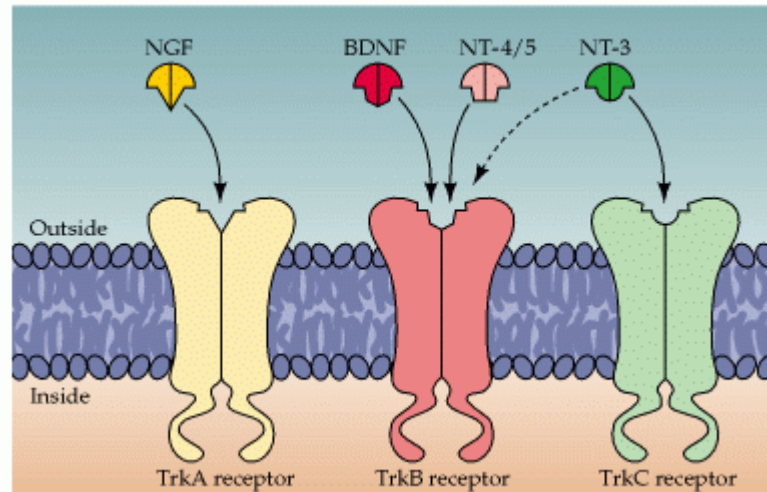


Figure 6 : Les neurotrophines et leurs récepteurs.

Tiré de Purves *et al.* (2001)

Les cellules microgliales ne semblent pas, dans des conditions normales, exprimer le BDNF. Toutefois, certaines études semblent démontrer la présence de BDNF dans les cellules gliales au niveau de l'éminence médiane, un organe circumventriculaire de l'hypothalamus (Givalois *et al.*, 2004). De plus, tel que déjà discuté, les microglies peuvent, suite à une lésion, exprimer des facteurs de croissance tels le GDNF et le BDNF (Batchelor *et al.*, 1999).

1.8.2. Le BDNF et la maladie de Parkinson

Les patients atteints de la maladie de Parkinson présentent une diminution du BDNF au niveau du striatum et de la SN, particulièrement la pars compacta (Parain *et al.*, 1999). Bien que la réduction du BDNF soit causée en partie par la perte de neurones dopaminergiques, les neurones restants de la SNpc exprimeraient le BDNF en moindre quantité (Howells *et al.*, 2000). Parain *et al.* (1999) ont d'ailleurs démontré que dans un cerveau sain, 65% des neurones mélanisés expriment du BDNF tandis que, chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, seulement 9% des neurones de la SNpc exprime cette neurotrophine. Ainsi, le niveau de BDNF semble important pour maintenir la population de neurones dopaminergiques. Une inhibition de la synthèse du BDNF par des oligonucléotides antisens

a d'ailleurs conduit à la diminution du phénotype dopaminergique des neurones de la voie nigrostriée (Porritt *et al.*, 2005). De plus, des études génétiques ont déterminé une association entre un polymorphisme du gène BDNF (BDNF val⁶⁶met) et une augmentation de la susceptibilité à développer la maladie de Parkinson (Toda *et al.*, 2003). Toutefois, une autre étude de Liu *et al.* (2005b) a confirmé qu'il n'y a aucune association entre les variants du BDNF et la maladie de Parkinson. Le déficit en BDNF chez les patients atteints de la maladie de Parkinson impliquerait seulement le facteur trophique et non les récepteurs associés. En effet, l'expression cellulaire de TrkB ne semble pas modifiée au niveau des neurones de la SN et de la VTA au cours de la maladie (Benisty *et al.*, 1998). Il est donc possible que la dégénération des neurones dopaminergiques lors de la maladie de Parkinson soit reliée à la diminution de la biosynthèse du BDNF.

1.8.2.1. La survie neuronale

Il est aussi intéressant de noter que, chez les souris âgées, une diminution partielle du récepteur spécifique pour le BDNF, trkB, provoque une perte neuronale au niveau de la SN, une diminution de l'expression de la tyrosine hydroxylase et la formation de dépôt d' α -synucléine (von Bohlen und Halbach *et al.*, 2005). Ce fait démontre que le BDNF joue un rôle clé dans la survie des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée, et ce autant lors du développement que lors de la sénescence. Notons également que le BDNF peut modifier, sur une longue période, la transcription de certains gènes. Par exemple, le BDNF peut activer le facteur de transcription « cAMP-response element binding protein » (CREB), un facteur conduisant à l'expression de Bcl-2, un gène impliqué dans la survie des cellules (Riccio *et al.*, 1999; Schabitz *et al.*, 2000). De plus, en se liant et en activant le récepteur TrkB, le BDNF active la voie du phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt (Patapoutian and Reichardt, 2001). L'activation de cette voie de signalisation est impliquée dans la survie neuronale (Gavaldà *et al.*, 2004) et permet la régulation des membres de la famille Bcl-2 (Riccio *et al.*, 1999). Ainsi, le BDNF pourrait jouer un rôle dans la survie des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée par l'expression de facteurs pro-survie. En plus de favoriser la survie des neurones dopaminergiques, les neurotrophines induisent le bourgeonnement des neurones dopaminergiques. Il a d'ailleurs été démontré que l'injection de BDNF au niveau du striatum induit la prolifération des fibres dopaminergiques en périphérie du site d'injection (Petersen *et al.*, 2001; Riccio *et al.*, 1999; Shults *et al.*, 1995).

1.8.2.2. La neurotransmission de la dopamine

Au niveau du striatum, la dopamine, en activant le récepteur D1, pourrait réguler l'expression de l'ARNm et la production de BDNF (Kuppers and Beyer, 2001). Cette régulation pourrait avoir lieu, entre autre, par l'intermédiaire d'un « cAMP-responsive element » (CRE) présent dans la séquence promotrice III du BDNF (Fang *et al.*, 2003). Suite à l'activation du récepteur D1 par la dopamine, l'expression de BDNF au niveau du striatum serait augmentée, conférant ainsi une neuroprotection aux neurones via le récepteur TrkB. Le lien entre la dopamine et le BDNF est également illustré par les recherches de Okazawa *et al.* (1992) qui a démontré que l'administration de L-DOPA *in vivo* induit une surrégulation de l'expression de BDNF au niveau du système dopaminergique. Ainsi, la production de BDNF est régulée par l'activité neuronale. En contrepartie, les neurotrophines influencent les neurones en régulant la transmission synaptique. Des études ont d'ailleurs démontré que l'administration chronique de neurotrophines *in vitro*, particulièrement de BDNF, sur des neurones dopaminergiques permet d'augmenter la recapture de la dopamine (Beck *et al.*, 1993) et d'élever le niveau de dopamine et de ses métabolites (Altar *et al.*, 1992). Ces faits démontrent que le BDNF induit une augmentation du métabolisme de la dopamine. Le traitement prolongé aux neurotrophines permet aussi d'augmenter la densité des sites de liaison à la dopamine (Studer *et al.*, 1995). De plus, Blochl and Sirrenberg (1996) ont démontré que le BDNF, par sa liaison au récepteur TrkB, stimule le relâchement de la dopamine. L'importance du BDNF dans la libération de ce neurotransmetteur est également confirmée par le fait que la mutation du gène BDNF chez la souris provoque une diminution drastique de la dopamine au niveau de la voie nigrostriée (Dluzen *et al.*, 1999). Le déficit en BDNF observé chez les patients atteints de la maladie de Parkinson pourrait donc participer à la diminution de la dopamine au niveau de la voie basale.

1.8.2.3. La neurotransmission GABAergique

En plus d'être associé au système dopaminergique, un équilibre existe également entre la régulation de l'expression de BDNF et les systèmes glutamatergiques et gabaergiques (Tapia-Arancibia *et al.*, 2004). Le BDNF régule la neurotransmission inhibitrice en facilitant la libération du glutamate et en inhibant la libération de l'acide gamma-amino butyrique (GABA) (Canas *et al.*, 2004; Tapia-Arancibia *et al.*, 2004). Le BDNF régule la

neurotransmission inhibitrice en inhibant l'expression du récepteur de GABA ($GABA_A R$). Par la régulation de la transcription des sous-unités de $GABA_A R$, le BDNF induit une modification de la composition du récepteur de GABA. Ceci induit un changement des propriétés physiologiques et pharmacologiques du récepteur au niveau post-synaptique. L'ensemble de ces phénomènes permet une modulation à long terme de la transmission inhibitoire (Brunig *et al.*, 2001). Puisque la maladie de Parkinson se caractérise par une augmentation de la neurotransmission de GABA vers le thalamus, il est possible que le BDNF ait un effet bénéfique par l'intermédiaire de l'inhibition de l'action du neurotransmetteur GABA.

Finalement, l'utilisation du BDNF dans le traitement de la maladie de Parkinson permettrait de sauvegarder les neurones dopaminergiques subsistants, d'augmenter la libération et la recapture de la dopamine et de diminuer les signaux inhibiteurs du neurotransmetteur GABA.

1.8.2.4. Utilisation des facteurs trophiques dans le traitement de la maladie de Parkinson

Il ne fait aucun doute que le BDNF est une molécule d'une grande importance pour la survie et le maintien des neurones dopaminergiques et que le déficit en BDNF chez les patients alimente la cascade pathologique de la maladie de Parkinson. L'administration de BDNF recombinant permettrait donc la protection des neurones dopaminergiques et l'amélioration des symptômes cliniques. Toutefois, la libération appropriée du facteur au sein du CNS constitue un problème majeur pour l'utilisation du BDNF comme traitement de la maladie de Parkinson. L'obstacle le plus important est la pénétration de la BBB. La taille importante des facteurs trophiques et leur structure chimique rendent leur passage à travers la BBB impossible (Fumagalli *et al.*, 2006; Peterson and Nutt, 2008). Suite à la diffusion du BDNF dans le parenchyme, les récepteurs TrkB hautement spécifiques captent la molécule et donc, peuvent limiter la biodisponibilité du BDNF (Fumagalli *et al.*, 2006). Il est également important d'assurer une distribution spécifique au système nigrostrié. En effet, une expression inadéquate du BDNF peut s'avérer inefficace, voire même nocive. Par exemple, les souris surexprimant le BDNF présentent une augmentation des lésions suite à une agression, telle l'injection d'acide kaïnique, et une plasticité anormale (Croll *et al.*,

1999). Pour contrer ce problème, certains chercheurs modifient les cellules progénitrices pour qu'elles puissent sécréter des facteurs de croissance (Björklund *et al.*, 2003; Martínez-Serrano and Björklund, 1997) ou encore utilisent les vecteurs viraux pour transduire les cellules du striatum ou de la SN (Kordower *et al.*, 2000; Tuszynski, 2003). Par exemple, Frim *et al.* (1994) a démontré que la transplantation dans la SN de fibroblastes de rat immortalisés et modifiés pour sécréter du BDNF humain permet une protection face au 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) injecté dans le striatum. Ils ont également démontré que ces fibroblastes modifiés augmentaient la survie des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée. Des résultats similaires ont été obtenus par Levivier *et al.* (1995). Ces derniers ont démontré que suite à leur modification génétique, les fibroblastes transplantés au niveau du striatum préviennent la perte des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée causée par l'injection de 6-hydroxydopamine.

Finalement, il est permis de croire que l'administration de BDNF améliore les symptômes reliés à la maladie de Parkinson et fournit une protection aux neurones dopaminergiques du mésencéphale. Toutefois, les limites liées relatives à l'administration systémique du BDNF nous obligent à trouver une méthode alternative permettant une libération régulée et précise du BDNF.

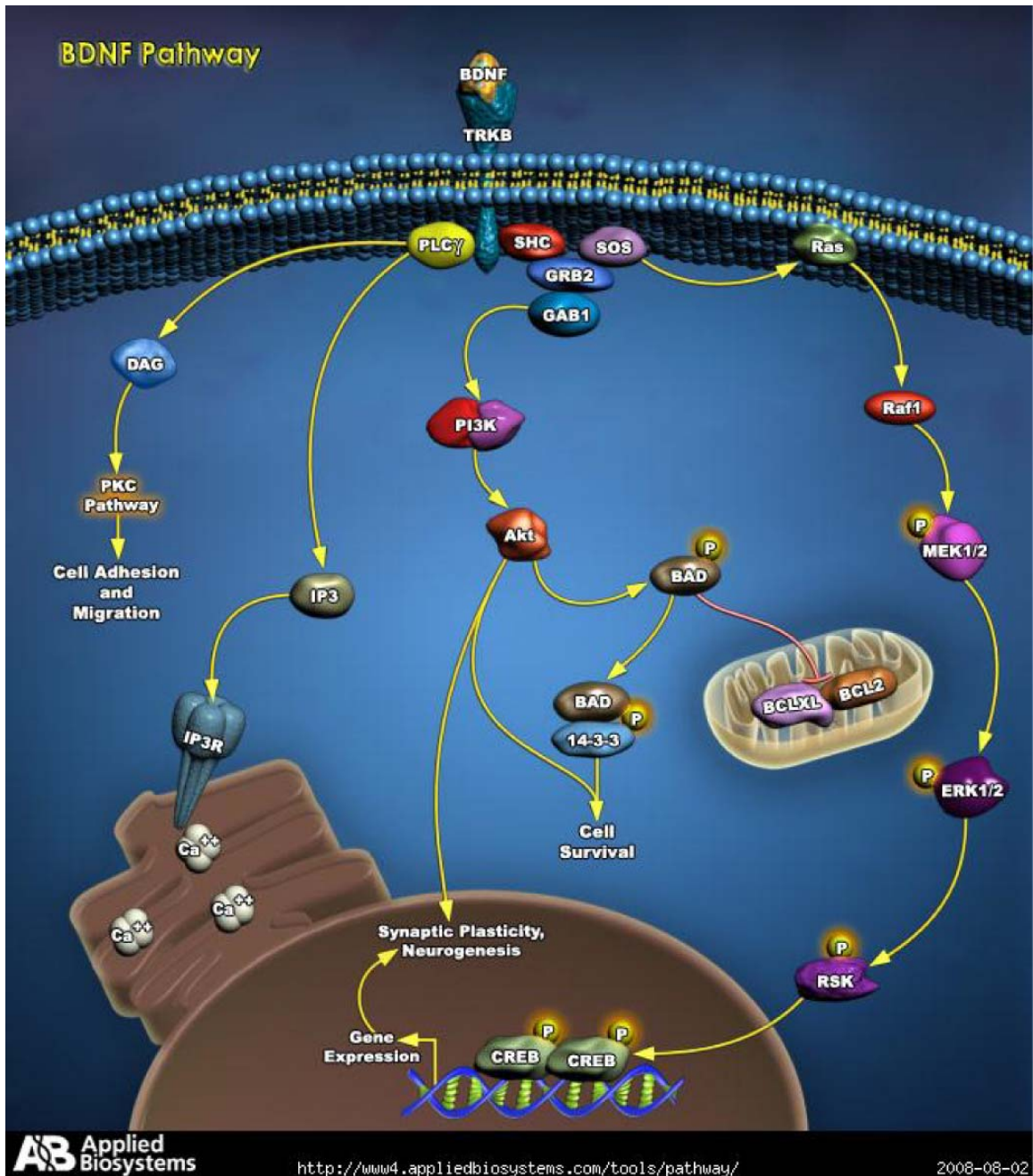


Figure 7 : Quelques voies stimulées par la liaison du BDNF à son récepteur TrkB.
Tiré de Ambion (2008)

1.8.3. Modification des cellules souches hématopoïétiques par l'utilisation de vecteurs lentiviraux

Pour contrer les difficultés concernant l'administration de la neurotrophine BDNF, de nouvelles méthodes d'administration doivent être étudiées. Sachant que les progéniteurs de la moelle osseuse sont recrutés suite à un dommage cérébral et qu'ils infiltrent

principalement les régions endommagées (Beck *et al.*, 2003; Flügel *et al.*, 2001; Priller *et al.*, 2001; Simard and Rivest, 2004a; Simard and Rivest, 2006), il est possible de croire que la modification des cellules souches hématopoïétiques permettra une libération spécifique et locale du facteur BDNF. Les cellules hématopoïétiques peuvent être modifiées par l'intermédiaire de vecteurs viraux. L'utilisation des vecteurs lentiviraux a fait état d'une première étude clinique en 2002. Lors de cette étude, il a été démontré qu'un vecteur lentiviral contenant un gène anti-VIH (virus de l'immunodéficience humaine) a permis de diminuer significativement le titre viral de patients infectés au VIH (Sinn *et al.*, 2005). Parmi l'ensemble des vecteurs viraux pouvant être utilisés, les vecteurs lentiviraux sont avantageux. Premièrement, ils permettent une bonne transduction des cellules. De plus, les lentivirus peuvent pénétrer le noyau des cellules et s'intégrer au niveau des chromosomes et ce, autant dans des cellules en division que dans des cellules quiescentes (Naldini *et al.*, 1996). En effet, pour la modification de cellules souvent amenées à se diviser, telles que les cellules hématopoïétiques, il est impératif d'utiliser un vecteur pouvant s'intégrer au chromosome. Il est également important de noter que les lentivirus basés sur le virus du VIH sont sécuritaires. En effet, les lentivirus ne sont pas reconnus pour leur habilité à causer l'oncogenèse (Sinn *et al.*, 2005). Bien que des millions de personnes soient infectées avec le VIH, le développement d'un cancer relié à ce virus est extrêmement rare (Siliciano *et al.*, 2003).

1.9. Modèles murins

Lors de l'étude de la maladie de Parkinson, plusieurs modèles murins peuvent être utilisés. Ces derniers peuvent être divisés en deux grands groupes : les modèles génétiques et les modèles toxiques. Deux modèles parkinsoniens seront décrits, soit le modèle toxique MPTP et le modèle génétique Pitx3/ak.

1.9.1. Le modèle du MPTP

Le modèle du 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) a été découvert lorsque de jeunes toxicomanes ont développé rapidement et progressivement des symptômes parkinsoniens suite à l'injection intraveineuse de 1-méthyl-4-phenyl-4-propionoxypiperidine (MPPP) contaminé avec un sous-produit, le MPTP (Langston *et al.*,

1983). Les études chez les primates ont démontré que le MPTP cause des dommages neuronaux similaires à ceux présents chez les patients atteints de la maladie de Parkinson à savoir : une perte cellulaire plus importante dans la SNpc comparativement à la VTA et une perte préférentielle des neurones dans les segments ventraux et latéraux de la SNpc (Varastet *et al.*, 1994). Un patron de dégénérescence similaire est observé chez les souris traitées au MPTP (Muthane *et al.*, 1994; Seniuk *et al.*, 1990). Chez les humains et les singes, le MPTP induit le développement sévère et irréversible des symptômes moteurs de la maladie de Parkinson. En plus de présenter des tremblements au repos, une lenteur des mouvements et une instabilité posturale, les humains et les primates non-humains intoxiqués répondent à la L-DOPA et développent les effets secondaires causés par son utilisation à long terme (Langston *et al.*, 1983). Chez les souris, le MPTP cause des dommages à la voie nigrostriée, mais les animaux ne présentent pas les symptômes moteurs représentatifs de la maladie de Parkinson (Heikkila *et al.*, 1984). Il est important de noter que le modèle MPTP ne présente pas l'ensemble des caractéristiques de la maladie de Parkinson. En effet, bien que des inclusions intraneuronales ressemblant aux corps de Lewy aient été décrites (Forno *et al.*, 1986), la présence de corps de Lewy dans le cerveau de patients intoxiqués au MPTP ou de singes exposés à la toxine n'a pas été démontrée catégoriquement (Forno *et al.*, 1993).

Suite à son injection, le MPTP, qui est un composé non toxique et lipophile, passe la BBB (Factor and Weiner, 2002) (Figure 8). Les cellules gliales transforment ensuite le MPTP en MPP⁺ par l'action de la monoamine oxydase (Heikkila *et al.*, 1984; Langston *et al.*, 1984). Le MPP⁺ est un composé toxique reconnu et capté par les transporteurs de la dopamine (DAT) (Javitch and Snyder, 1984). Le MPP⁺ s'accumule donc dans les neurones dopaminergiques, d'où la sélectivité du MPTP pour ce type de neurones. Une fois dans les neurones, le MPP⁺ peut soit : 1) se lier aux transporteurs vésiculaires monoamine-2 (VMAT2) qui transportent le MPP⁺ dans les vésicules synaptosomales (Liu *et al.*, 1992), 2) se concentrer dans les mitochondries (Ramsay *et al.*, 1986) ou 3) demeurer dans le cytosol. La séquestration du MPP⁺ au niveau des vésicules permettrait aux neurones de se protéger contre la toxicité du MPP⁺. Au contraire, lorsque le MPP⁺ s'accumule dans les mitochondries, il inhibe les complexes I de la chaîne de transport des électrons (Vyas *et al.*,

1986). L'inhibition de la chaîne de transport des électrons provoque la mort cellulaire en causant un déficit énergétique, mais également en produisant du stress oxydatif. En effet, par l'inhibition du complexe I, le MPP⁺ augmente la production d'espèces réactives oxygénées, principalement du superoxyde (Hasegawa *et al.*, 1997; Hasegawa *et al.*, 1990). Le superoxyde favorise la production de radicaux hydroxyles et réagit avec l'oxyde nitrique pour former du péroxynitrite (Dauer and Przedborski, 2003). Ces produits toxiques causent des dommages aux cellules en réagissant avec les acides nucléiques, les protéines et les lipides.

Plusieurs auteurs ont observé une activation des microglies chez la souris suite à un traitement aigu au MPTP (Dehmer *et al.*, 2000; Francis *et al.*, 1995; Kohutnicka *et al.*, 1998; Kurkowska-Jastrzebska *et al.*, 1999; Liberatore *et al.*, 1999; Vila *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2002). De plus, Rodriguez *et al.* (2007) ont démontré que les cellules hématopoïétiques infiltrent le cerveau de souris traitées au MPTP. Les cellules hématopoïétiques pénètrent les régions riches en innervations dopaminergiques, tels le striatum, la SN et la VTA (Rodriguez *et al.*, 2007).

1.9.2. Le modèle Pitx3/ak

Pitx3 est un facteur de transcription à homéodomaine impliqué dans le développement moléculaire des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée (Hwang *et al.*, 2003; Nunes *et al.*, 2003). Le gène Pitx3 est exprimé dans l'ensemble des neurones dopaminergiques du mésencéphale (Smits *et al.*, 2006). La souris Pitx3/ak présente une mutation spontanée du gène résultant en une délétion de 652 paires de bases au niveau de la région du promoteur.

Au niveau de la SN, le gène Pitx3 serait principalement impliqué dans la différenciation terminale et l'entretien précoce des neurones (Smidt and Burbach, 2007). Par conséquent, les souris Pitx3/ak présente une perte importante des neurones de la SN (Hwang *et al.*, 2003; Smidt *et al.*, 2004; van den Munckhof *et al.*, 2003). Les neurones dopaminergiques de la VTA ne sont que faiblement affectés par la mutation du gène Pitx3. Ainsi, ce gène aurait une importance moindre en ce qui concerne la survie et la maintenance des neurones de la VTA (Hwang *et al.*, 2003; Smidt *et al.*, 2004; van den Munckhof *et al.*, 2003).

Conséquemment à la perte neuronale au niveau de la voie nigrostriée, le niveau de dopamine dans le striatum dorsal des souris Pitx3-deficientes est diminué d'environ 84 à 93 % (Nunes *et al.*, 2003; van den Munckhof *et al.*, 2003).

L'altération de la voie basale chez les souris Pitx3/ak provoque des troubles locomoteurs, telle une diminution des mouvements ambulatoires spontanés (van den Munckhof *et al.*, 2003), une diminution des mouvements verticaux spontanés, une lenteur des mouvements et une altération des fonctions sensorimotrices (Hwang *et al.*, 2005). Il est important de noter que la perte de neurones dopaminergiques survient principalement lors du stade embryonnaire (van den Munckhof *et al.*, 2003). Ainsi, ce modèle se différencie des patients atteints de la maladie de Parkinson qui présentent une perte de neurones progressive et tardive.

En tant que facteur de transcription, le gène Pitx3 protège les neurones par la régulation de gènes impliqués dans le développement et la survie des neurones dopaminergiques. Peng *et al.* (2007) ont d'ailleurs démontré que l'expression exogène de Pitx3 dans des cellules neuroblastiques SH-SY5Y et dans des cultures primaires de neurones ventraux mésencéphaliques régule l'expression des facteurs neurotrophiques BDNF et GDNF. Par exemple, dans les cellules transfectées avec un vecteur codant pour le gène Pitx3, le niveau d'ARNm de BDNF et de GDNF a été significativement augmenté (Peng *et al.*, 2007). L'augmentation des niveaux de l'ARNm des neurotrophines corrèle avec une augmentation des niveaux protéiques par 10 fois pour le BDNF et par 5,9 fois pour le GDNF (Peng *et al.*, 2007). Bien que le gène Pitx3 régule la transcription et la traduction de certaines neurotrophines, les marqueurs de la dopamine, par exemple la TH et les DAT, ne sont pas affectés par une augmentation de l'expression de Pitx3 (Peng *et al.*, 2007).

Par la perte importante des neurones dopaminergiques du mésencéphale et par la diminution de la dopamine au niveau du striatum, les souris Pitx3/ak semblent posséder les principales caractéristiques des patients atteints de la maladie de Parkinson. De plus, le traitement des souris Pitx3/ak par la L-DOPA renverse la majorité des anomalies motrices (Hwang *et al.*, 2005). Ce modèle permet donc d'étudier les effets thérapeutiques d'un

traitement lors d'un stage avancé de la maladie et suite à une perte importante des neurones dopaminergiques de la SNpc. Cette situation est représentative de la réalité clinique.

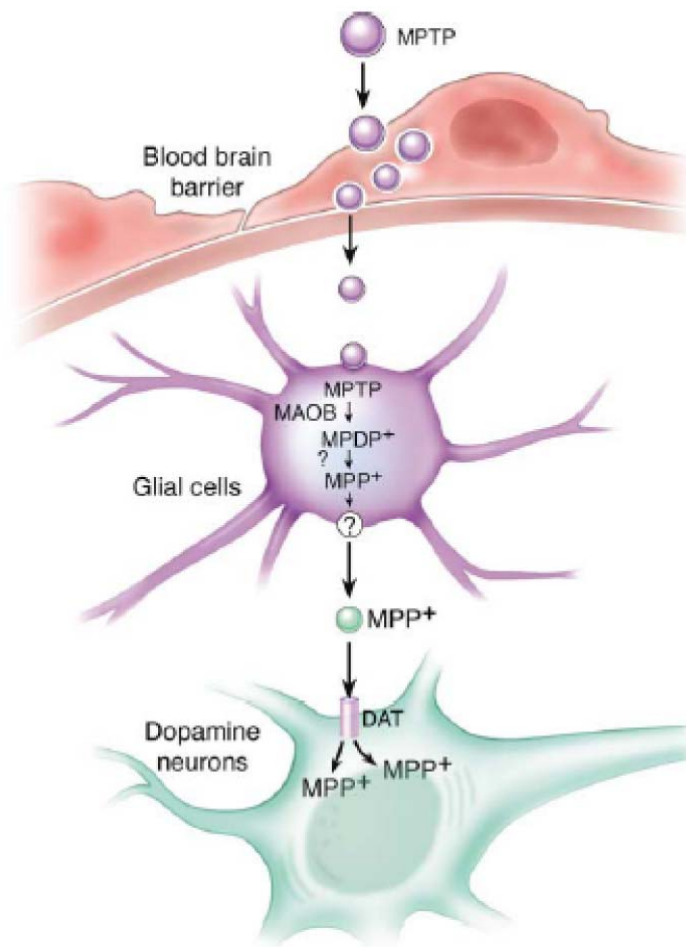


Figure 8 : Représentation du métabolisme du MPTP. Le MPTP traverse la barrière hémato-encéphalique puis est converti en MPDP⁺ par la monoamine oxydase-B (MAO-B) par les cellules gliales ou encore par les neurones sérotoninergiques. Le MPDP⁺ est alors métabolisé en MPP⁺ par un mécanisme encore inconnu. Le MPP⁺ est relâché dans l'espace cellulaire et est ensuite capté par les transporteurs de la dopamine (DAT).

Tiré de Dauer and Przedborski (2003)

1.10. Objectifs du projet

Le BDNF est un facteur neurotrophique d'une grande importance pour la survie, le maintien et la différenciation des neurones dopaminergiques. Le déficit en BDNF observé chez les patients atteints de la maladie de Parkinson pourrait alimenter la cascade pathologique de la maladie. Nous avons donc testé l'hypothèse que la stimulation de la production de BDNF par les cellules hématopoïétiques pourrait améliorer le comportement moteur de souris parkinsoniennes. Dans un premier temps, deux modèles parkinsoniens, soit les souris MPTP et les souris Pitx3/ak, ont été caractérisés. Puis, des lentivirus codant pour le gène BDNF ont été injectés dans la moelle osseuse des fémurs de souris Pitx3/ak. Les effets de la modification des cellules souches hématopoïétiques ont été analysés par l'étude du comportement moteur des souris. Les changements dans l'expression protéique de TH et dans l'expression des ARNm de BDNF ont également été analysés.

1.11. Résumé de la méthodologie

Dans le cadre du projet, deux modèles de la maladie de Parkinson ont été caractérisés, soit le modèle toxique MPTP et le modèle génétique Pit3/ak. Des analyses histologiques incluant le dénombrement des neurones dopaminergiques, l'expression de cytokines, chimiokines, de BDNF ou encore de protéines ont été faites par l'intermédiaire de techniques d'immunohistochimie et d'hybridation *in situ*. Dans le but d'analyser l'infiltration de cellules dérivées de la moelle osseuse dans les modèles murins, des souris chimériques ont été générées. Pour ce faire, des cellules de la moelle osseuse provenant de souris GFP ont été injectées dans des souris ayant subi une irradiation létale. Afin de tester les effets thérapeutiques de la surproduction du BDNF, les cellules souches hématopoïétiques de souris Pitx3/ak ont été génétiquement modifiées par l'injection d'un lentivirus codant pour le gène BDNF. Une série de tests comportementaux ont ensuite été utilisés pour caractériser les dysfonctions motrices des souris Pitx3/ak et pour quantifier les effets thérapeutiques de la modification des cellules souches hématopoïétiques. Certains paramètres histologiques, tels que le niveau de la protéine TH et le niveau d'ARNm de BDNF, ont également été analysés suite à l'injection du vecteur lentiviral.

CHAPITRE II

**Modification des cellules souches hématopoïétiques pour
favoriser la libération du « brain-derived neurotrophic
factor » dans un modèle murin de la maladie de
Parkinson**

Bone Marrow Stem Cells Modification to Deliver Brain-Derived Neurotrophic Factor in mouse model of Parkinson's disease

Marie-Pier Laplante-Campbell, Paul Préfontaine, Mohammed Filali, Martine Lessard et Serge Rivest

Laboratory of Molecular Endocrinology, Centre hospitalier de l'Université Laval Research Center, and Department of Anatomy and Physiology, Laval University, Québec, Québec, Canada, G1V 4G2

2.1. Résumé

Le « brain-derived neurotrophic factor » (BDNF) peut atténuer la perte de neurones dopaminergiques nigrostriées et réguler les fonctions des neurones dopaminergiques. Une diminution du niveau de BDNF est observée chez les patients atteints de la maladie de Parkinson (PD). Considérant le rôle crucial du BDNF pour les neurones dopaminergiques, ce déficit en BDNF pourrait participer à la cascade pathologique de la maladie. Nous avons étudié une nouvelle approche pour libérer spécifiquement et localement le BDNF dans un modèle de la PD. Deux modèles de la PD ont d'abord été caractérisés : les souris MPTP et les souris Pitx3/ak. Nous avons démontré que les souris Pitx3/ak développent des dysfonctions locomotrices représentatives de la PD, telles que la dyskinésie, une diminution de la dextérité et une posture instable. Ces anomalies motrices corrént avec une perte importante de neurones dopaminergiques au niveau de la substance noire pars compacta (SNpc). Au contraire, le modèle du MPTP ne présente qu'une perte transitoire des marqueurs des neurones dopaminergiques dans la SNpc. Les souris Pitx3/ak présentent également un déficit en BDNF. Nous concluons donc que les souris Pitx3/ak sont de bons modèles pour l'étude de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans les deux modèles murins, des cellules dérivées de la moelle osseuse ont infiltré le système nerveux central et plus particulièrement, les régions touchées par la maladie. Nous avons donc utilisé l'habileté naturelle des cellules souches hématopoïétiques à infiltrer les régions endommagées pour délivrer le BDNF. Des lentivirus codant pour le gène BDNF ont été injectés dans la moelle osseuse de souris Pitx3/ak. La modification des cellules souches hématopoïétiques atténue les dysfonctions motrices des souris Pitx3/ak. L'analyse histologique suggère que l'amélioration du comportement moteur est reliée à une augmentation de l'expression de BDNF dans la SNpc, le cortex et le thalamus. L'expression de la tyrosine hydroxylase est également augmentée dans la SNpc suite à la modification des cellules hématopoïétiques. Toutefois, les cellules modifiées n'ont pas été retrouvées au niveau du système nerveux central. Ces résultats suggèrent que la surexpression de BDNF stimule les neurones dopaminergiques de la SNpc. Finalement, la surproduction du BDNF par l'utilisation de la modification des cellules souches hématopoïétiques pourrait être une nouvelle approche thérapeutique intéressante.

2.2. Abstract

Neurotrophic factors have been found to attenuate the loss of nigrostriatal dopaminergic neurons in animal models of Parkinson's disease (PD). In particular, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has been shown to exert neurotrophic and neuroprotective effects on dopaminergic neurons. In Parkinson's patients, a decrease in the expression of BDNF has been demonstrated. The decrease in BDNF may contribute to the loss of dopaminergic neurons and therefore, participate to the pathological processes in PD. The present study investigated a new approach to deliver locally BDNF in PD models. We first characterized two models of PD: MPTP and Pitx3/ak mice. We demonstrated that Pitx3/ak mice develop locomotor dysfunctions characteristic of PD as dyskinesia, postural instability and diminished dexterity. We have also shown that these locomotor abnormalities are related to a severe loss of DA neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc). Pitx3/ak mice also have a BDNF deficit. On the other hand, MPTP mouse model do not have a permanent loss of dopaminergic neurons. We therefore conclude that Pitx3/ak mice are a more appropriate murine model to study therapeutic approaches in PD. In both Parkinson's models, we have observed the infiltration of bone marrow derived cells in brain regions damaged by PD. We have used the natural ability of bone marrow stem cells to infiltrate the brain and to deliver the BDNF in PD mice. Thus, we injected lentivirus coding for BDNF in bone marrow of Pitx3/ak mice. We showed that the modification of hematopoietic stem cells by lentivirus coding for BDNF ameliorates parkinsonian symptoms in Pitx3/ak mice through a mechanism involving an augmentation of BDNF in different brain regions like SNpc, cortex and thalamus. Modification of hematopoietic stem cells causes an augmentation of tyrosine hydroxylase expression in the SNpc. These results suggest that BDNF overexpression stimulates DA neurons in SNpc. Up-regulating BDNF by gene therapy in bone marrow cells using lentiviral constructs may be a potential therapeutic approach for PD.

2.3. Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by an impairment of motor function, caused largely by a loss of dopaminergic (DA) neurons in the substantia nigra. Current treatments for PD improve most of the major signs and symptoms of the disease. However, classic treatments and surgical therapies (including deep brain stimulation and transplantation of foetal dopamine neurons) fail to stop or delay degeneration of DA neurons (Rascol *et al.*, 2002; Yahr *et al.*, 1969). Neurotrophic factors have been found to attenuate the loss of nigrostriatal DA neurons in animal models of PD (Altar *et al.*, 1992; Hyman *et al.*, 1991). Among them, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is important for the development, maintenance and survival of DA neurons (Petersen *et al.*, 2001; Riccio *et al.*, 1999; Shults *et al.*, 1995). In DA neuron culture, treatments with BDNF increase tyrosine hydroxylase (TH) activity, dopamine uptake, dopamine content and cell body size, and enhance neuritic complexity (Beck *et al.*, 1993; Feng *et al.*, 1999; Studer *et al.*, 1995). A reduction of BDNF expression has been observed in the brain of PD patients (Mogi *et al.*, 1999; Nagatsu *et al.*, 2000; Parain *et al.*, 1999). Although the BDNF decrease is partly caused by the loss of DA neurons, studies have demonstrated that remainder neurons of the SNpc express BDNF in lesser quantities (Howells *et al.*, 2000; Parain *et al.*, 1999). Moreover, inhibition of BDNF by antisense oligonucleotides leads to a loss of nigral DA neurons (Porritt *et al.*, 2005). These results suggest that a decrease in the synthesis of BDNF in substantia nigra might contribute to pathological cascade of PD. Considering the crucial function of BDNF on DA neurons and the BDNF deficit in PD, BDNF is a good candidate in the development of a neuroprotective therapy. However, the molecular nature of BDNF prevents efficient penetration into the brain (Fumagalli *et al.*, 2006; Peterson and Nutt, 2008), and therefore makes systemic administration unlikely to be efficient.

Previous studies have demonstrated that bone marrow-derived cells are able to cross the blood-brain barrier and differentiate into fully competent microglia (Hess *et al.*, 2004; Massengale *et al.*, 2005; Simard and Rivest, 2004a). The migration of bone marrow cells into the brain is particularly interesting because it opens up new possibilities to deliver

neuroprotective and therapeutic substances. Richard *et al.* (2008) have recently demonstrated that bone marrow-derived cells can be genetically modified by a lentiviral vector to rescue a deficient gene. Based on these results, we hypothesized that the modification of hematopoietic stem cells by BDNF-coding lentivirus would stimulate the function of damaged DA neurons and would attenuate locomotor dysfunctions of mouse models of PD.

The aims of this study were therefore to find an appropriate murine model of PD, namely MPTP model and genetic Pitx3/ak model. The second aim was to study the therapeutic effects of overproduction of neurotrophic factor BDNF by the genetic modification of hematopoietic stem cells.

2.4. Materials and methods

2.4.1. Animals

The Pitx3/ak mice originate from The Jackson Laboratories. The aphakia allele mutation arose spontaneously on the 129S1/Sv-p⁺ Tyr⁺ Kitl^{Sl-J}/J strain and was subsequently crossed into the C57BL/6 background. Heterozygous Pitx3/ak and C57BL/6 mice were used as controls. All mice were raised in standard laboratory conditions (14 hours light, 10 hours dark cycle) with free access to rodent chow and water. All protocols were conducted according to the Canadian Council on Animal Care guidelines, as administered by the Laval University Animal Welfare Committee.

2.4.2. Irradiation and bone marrow transplantation

Recipient mice (C57BL/6, Pitx3/ak (+/-) and Pitx3/ak) were subjected to a total body irradiation of 10 gray using a cobalt-60 source (Theratron-780 model, MDS Nordion, Ottawa, ON, Canada). Few hours later, animals were injected via a tail vein with 10×10^6 bone marrow cells freshly collected from GFP mice. Bone marrow cell harvest and purification were performed as described previously (Simard and Rivest, 2004a). Briefly, bone marrow cells were harvested by flushing femurs with Dulbecco's Phosphate buffered saline containing 2% fetal bovine serum (DPBS-FBS). The samples were centrifuged, passed through a 25 gauge needle, filtered through a 40 μ m nylon mesh and resuspended in DPBS-FBS. Mice transplanted with this suspension were housed in autoclaved cages and treated with antibiotics (0.2 mg trimethoprine and 1.0 mg sulfamethoxazole/ml of drinking water given for 7 days before and after irradiation).

2.4.3. MPTP treatment

Two months after bone marrow transplantation, chimeric mice were treated with 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). MPTP was obtained from Sigma (Germany) and dissolved in sterile saline. Two different MPTP protocols were used: an acute and a subacute model. In the first experiment (acute treatment), a group of chimeric mice was injected i.p. with four doses of 20 mg MPTP/kg in a single day. Mice were killed two and

five days after MPTP treatment. In the second experiment (subacute treatment), a group of chimeric mice was injected i.p. with seven doses of 20 mg MPTP/kg on a period of five consecutive days (two doses with 12 hours interval in the first two days and one dose the last three days). MPTP-injected mice were sacrificed at different times: 2 days after the first injection, 4, 6, 9, 14, 21 and 30 days after the first injection.

2.4.4. Production and femoral injection of lentiviral vector

The lentiviral GFP-BDNF vector was constructed by using the ViraPower™ Lentiviral Expression Systems (Invitrogen). To visualize transduction, coding sequence of enhanced green fluorescent protein (GFP) and the phosphoglycerate kinase promoter (PGKp) was introduced in the vector pLenti4/TO/V5-DEST between XhoI and KpnI restriction sites. This insert was amplified from pSuperior vector (OligoEngine) (forward, 5'-CACAAGTGGCCTCGAGCCTCGCACACATTCCACATCCAC-3'; reverse, 5'-CTTGTTCAATCATGGTACCTC TAGCCTTAAGTTCGAGAC-3'). Murine BDNF cDNA was amplified (forward, 5'-CAATGTTCCACCAGGTGAGAGGATCCATGACCA TCCTTTTCCTTAC 3'; reverse, 5'-CTATAACAACATAGAATTCCTATCTTCC-3', GenBank accession number NM-007540) and cloned in the pENTRA4 vector between Sall and NotI restriction sites. The BDNF coding sequence was transferred onto the pLenti/GFP vector downstream the cytomegalovirus promoter (CMVp) by homologous recombination, forming the new pLenti/GFP-BDNF vector. To produce virus, 293T cells were co-transfected by pLenti/GFP-BDNF and three auxiliary vectors (pLP1, pLP2 and pLP-vesicular stomatitis virus protein G) using the calcium chloride transfection method. After 72 hours of culture, supernatant were collected, centrifugated (50 000 g for 2 h) and resuspended in DMEM (Sigma). Pitx3/ak mice were anesthetized with isoflurane and after flexing the knee, 20 µL of lentiviral (2×10^8 viruses) was injected in the femur bone marrow using a 30G needle of 8mm. Both femurs were injected. Control mice were injected with empty lentivirus (pLenti/GFP). Three days before and after injection, mice were treated twice a day with buprenorphine (50 µl/30g at 0.03 mg/ml). Mice were tested for locomotor activity prior to injection and 6 and 12 weeks after injection. Mice were sacrificed 12 weeks after lentiviral injection.

2.4.5. Behavioral analysis

The characterization of locomotor abnormalities related to nigrostriatal dysfunction in Pitx3/ak mice were done with different locomotor tests (rotorod, coat-hanger and Flex-Field system). Therapeutic effects of lenti-GFP/BDNF were also assessed with rotorod test and coat-hanger test. Experimenter was blinded as to the genetic and treatment status of animals.

2.4.5.1. Rotorod test

Motor coordination and postural stability was measured using rotorod test (diameter: 3 cm, width: 9.5 cm, height: 45 cm). The mice were placed on top of the already revolving beam at a speed of 5 rpm. The latency to fall from the rod was measured using automated fall detection. Mice were tested on four trial sessions with a 3 minutes cut-off period and 15 minutes interval between trials. The maximal score was recorded.

2.4.5.2. Coat-hanger test

The coordination, dexterity and strength of mice were analysed by using the coat-hanger test. The triangular-shaped coat-hanger consisted of an horizontal steel wire (diameter: 2 mm, length: 41 cm, height: 50 cm from a padded surface) flanked by two diagonal side-bars (length: 19 cm; inclination: 35° from the horizontal axis). The mice were placed upside-down in the middle of the horizontal wire and were released only when all four paws had gripped to it. The time elapsed before the animal grabbed to the horizontal bar with all four paws and the time before the two front paws reached one the side bars were determined. The test was performed in a single three trial session with a two minutes cut-off period and a 15 minutes interval between trials.

2.4.5.3. Flex-Field system

Spontaneous locomotor activity was tested in the Flex Field Activity system (San Diego Instruments, supplied by Dr. Francesca Chicchetti, CHUL, Université Laval, Québec, Québec, Canada), which allows monitoring and real-time counting of horizontal and vertical spontaneous locomotor activity. Mice were placed in the center of the open field

for 1 hour. The counts in the horizontal and vertical axes were summed and analysed. All tests were done in the morning between 9:00 am and 12:00 pm.

2.4.6. Tissue preparation

At the different time points, the mice were deeply anesthetized with a mixture of ketamine hydrochloride and xylazine and transcardially perfused with saline solution 9% and cold paraformaldehyde (PFA) 4% (pH 9.5). Brains were rapidly removed from skulls, postfixed in PFA for 2-4 days, and placed overnight at 4°C in a solution containing 10% sucrose dissolved in PFA. The frozen brains were sectioned into 30 µm-thick coronal sections using a microtome (Reichert-Jung, Cambridge Instruments Company) and slices were collected in a cold cryoprotectant solution (0,05 M sodium phosphate buffer, pH 7.3, 30% ethylene glycol, and 20% glycerol) and stored at -20 °C.

In the case of Pitx3/ak mice injected with lentiviruses, blood, femurs, spleen and liver were also collected. Three months after lentiviral injection, mice were anesthetized with isoflurane and blood was removed from organs by intracardiac puncture. Brains were rapidly removed from skulls and post-fixed as described previously.

2.4.7. *In situ* hybridization

In situ hybridization was performed on every 12th section of the brain using ³⁵S-labeled cRNA probes as described previously (Laflamme *et al.*, 2003; Laflamme and Rivest, 1999). Expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and BDNF was analyzed. After hybridization, slides were exposed on x-ray films (Biomax; Eastman Kodak Rochester, NY, USA) at 4°C. BDNF hybridization signal was quantitatively analysed under a Northern Light Desktop Illuminator (Imaging Research, Ste-Catherine's, ON, Canada) using a Sony Camera Video System (Tokyo, Japan) and the Image J software (version 1.23; W Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). The optical density (OD) for each pixel was calculated using a known standard of intensity and distance measurements from a logarithmic specter adapted from BioImage Visage 110 s (Millipore, Ann Arbor, MI, USA). BDNF analysis was performed in the caudate putamen (CPU), SNpc, thalamus and hippocampus on two slices per mouse.

2.4.8. Immunohistochemistry

2.4.8.1. TH expression and loss of TH neurons

Free-floating sections were immunostained for TH using an avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method and a DAB-immuno-reactive labeling method. Free-floating sections were washed in sterile potassium PBS (KPBS) and then incubated for 30 minutes in KPBS containing 4% goat serum, 1% BSA and 0.4% Triton X-100. The sections were then incubated O/N at 4°C with primary mouse monoclonal anti-TH antibody (1:3000; Incstar, 22941), washed three times for 5 min in KPBS, and then incubated with a secondary goat anti-mouse biotinylated antibody (1:1500; Vector Laboratories, BA-9200) for 2 hours at room temperature. Sections were washed with KPBS and incubated at room temperature for 1 hour with an avidin-biotin-peroxydase complex (Vectastin ABC Elite Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Sections were washed with KPBS. The labeling was visualized with a chromogen solution containing 0.05% 3,3' diaminobenzidine and 0.003% H₂O₂. Ten minutes after, sections were rinsed with KPBS and mounted onto Fisherbrand colorfrost microscope slides. On the same sections, neuron nuclei were stained with NeuN staining using nickel-enhanced DAB (3,3'-diaminobenzidine-4-HCl, Sigma Chemical Co., St-Louis, MO). Prior to TH immunostaining, free-floating sections were incubated with primary monoclonal mouse anti-NeuN antibody (1:2000; Chemicon International, MAB377) O/N at 4°C, washed with KPBS and incubated at room temperature for 2 hours with a secondary goat anti-mouse biotinylated antibody (1:1500; Vector Laboratories, BA-9200). Brains sections were then incubated at room temperature for 1 hour with ABC complex, washed with KPBS and incubated 3 minutes with nickel-enhanced DAB mix (125 mM sodium acetate, 10 mM imidazole, 100 mM nickel II sulphate, 0.03% DAB and 0.003% H₂O₂). In some experiments, cells were stained with the Nissl method. Brains sections were rapidly dehydrated through graded concentrations of alcohol, cleared in xylene, rehydrated through graded concentrations of alcohol, stained with 0.25% thionine, again dehydrated, cleared in xylene and coverslipped with DPX.

In the MPTP protocol, positive neurons for both cytoplasmic TH and nuclear NeuN were counted using Stereo Investigator software (MicroBrightField). The contour of the SNpc

was traced and a pattern of three counting frames was placed on the SNpc with respect of different criteria. All neurons present in counting frame and positive for both TH and NeuN were counted at 40X magnification. Total counts were then divided by SNpc surface area to determine the density of DA neurons in SNpc.

For experiments that death with Pitx3/ak mice, positive neurons for both TH and Nissl staining in the SNpc were counted using Stereo Investigator software (MicroBrightField). The SNpc was traced according to mouse brain atlas (Paxinos and Franklin, 2001). All neurons in the SNpc positive for TH and Nissl were counted at 40X magnification.

2.4.8.2. Infiltrating microglial cells

Free-floating sections were washed in sterile KPBS and incubated for 30 minutes in KPBS containing 4% goat serum, 1% BSA and 0.4% Triton X-100. The sections were then incubated O/N at 4°C with primary antibody (polyclonal rabbit anti-GFP, 1:2000, Molecular Probe, A-6455; rabbit anti-ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba-1), 1:3000, Wako Chemicals, 019-19741). The sections were then washed three times for 5 minutes in KPBS and then incubated with a secondary antibody (anti-rabbit alexa-488, 1:1000; Molecular probe, A11034; anti-rabbit alexa-594, Molecular Probe, A11072) for 2 hours at room temperature. Sections were washed with KPBS and mounted onto Fisherbrand colorfrost microscope slides.

2.4.9. Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad prism 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Group means were first analysed for Gaussian distribution using a Kolmogorov-Smirnov test. Student's t test or one-way ANOVA (or Kruskal-Wallis test) was then performed. Bonferonni post hoc tests or Dunns post hoc test were appropriately used to determine significant differences between groups. Two-factor analysis of variance (ANOVA) with replication was performed using the SAS mixed procedure with F-test (SAS 9.1, SAS institute, Cary, North Carolina, USA).

2.5. Results

2.5.1. Characterization of the MPTP model

To determine whether MPTP is a good model to study the therapeutic effects of genetic modification of hematopoietic stem cells, we first analysed the loss of DA neurons in SNpc. As expected, subacute MPTP treatment (7 doses of 20 mg/kg of MPTP) induced a decrease in the number of DA positive neurons in the SNpc. A significant decrease of 52% in DA neuron density (neurons/ μm^2) was revealed by TH immunostaining 9 days after the first MPTP injection (Figure 9; 0.0007348 ± 0.00002086 vs 0.001533 ± 0.0003628 ; $p < 0.05$). A surprising result is that this loss of DA neurons in the SNpc is transient. No other difference was observed between MPTP mice and control mice after the time 14 days. This means that 9 days after the end of MPTP treatment, the number of DA neurons in the SNpc remained identical to control mice (0.001328 ± 0.00008993 vs 0.001533 ± 0.0003628 ; $p > 0.05$).

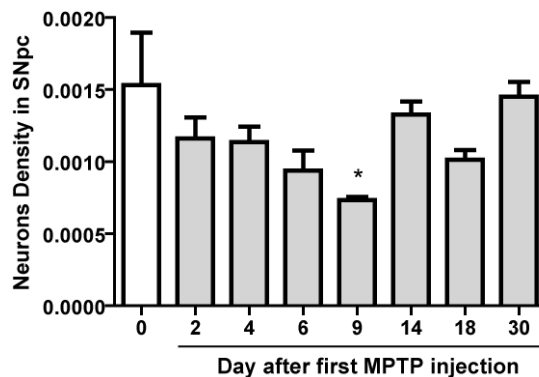


Figure 9: Time course of change in the neuronal density (means \pm SEM) of wild-type chimeric mice without treatment (time 0) and MPTP treated mice (subacute model). Only positive neurons for nuclear NeuN and cytoplasmic TH were counted. Errors bars represent SEM. * $p < 0.05$ compared to wild-type mice; One-way ANOVA and Dunnett's post test.

2.5.2. Hematopoietic stem cells infiltrate MPTP mice

In order to analyze the infiltration of blood-derived cells in MPTP treated mice (acute and subacute treatment), donor-derived GFP cells were qualitatively analyzed in different brain regions. In the acute MPTP experiment, the majority of the mice presented an infiltration of blood-derived cell in the SNpc at two and five days after MPTP injections. In the subacute MPTP experiment, the same type of response was observed, but with less intensity.

Moreover, only a quarter of all mice treated with subacute MPTP treatment showed infiltration of blood-derived cells. Most of the infiltrating microglia were found in the SNpc and differentiated in ramified parenchymal microglial cells. (Figure 10). Infiltration of hematopoietic cells seems to be induced by MCP-1 expression (Figure 11). Two day after MPTP injection (acute treatment), mice expressed MCP-1 mRNA in SN. Nevertheless, MCP-1 signal was not observed in mice five days after MPTP injection.

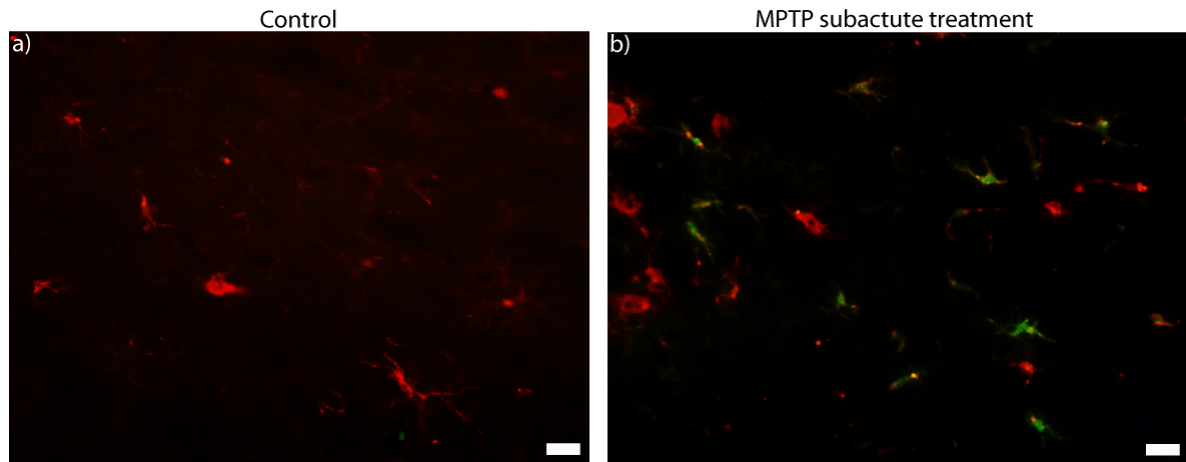


Figure 10: Microglial cells of bone marrow origin infiltrate the SNpc of MPTP mice as from 4 days after the first MPTP injection. Microglial cells in brain sections of chimeric mice treated with MPTP (subacute treatment) were stained with an anti-iba-1 antibody (red). Bone marrow derived microglia were detected by GFP labeling (green). A large proportion of microglial cells in SNpc of MPTP mice expressed GFP, indicating that they originated from bone marrow cells. Scale bars represent 20 μm .

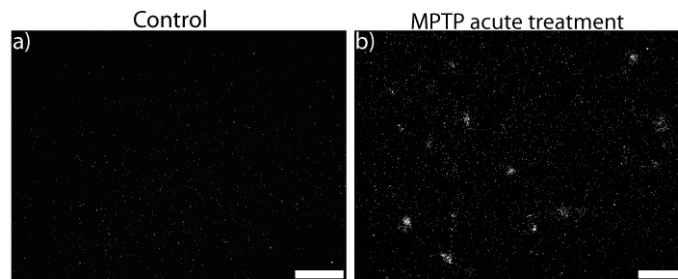


Figure 11: MCP-1 mRNA expression in response to MPTP acute treatment. MCP-1 mRNA is expressed two days after MPTP injection (b) compared to wild-type mice (a). Scales bars represent 100 μm .

Finally, MPTP model presents few histological characteristics of Parkinson's patients as gliosis and inflammation (data not shown). However, only a small proportion of animals treated with subacute MPTP treatment had these characteristics, while a larger proportion of animals receiving acute MPTP treatment presented gliosis and inflammation. It is

important to point out, however, that a majority of animals (approximately 75%) that received acute MPTP treatment had to be sacrificed prematurely as they lost more than 20% of their initial weight and presented sickness behaviours. In summary, we conclude that acute MPTP treatment is very toxic, while subacute treatment has a great variability and does not induce degeneration of DA neurons. For these reasons, we therefore decided to study another mouse model of PD; namely the Pitx3/ak model.

2.5.3. Pitx3/ak post-natal development

In order to examine the development of mesencephalic DA neurons and their projections in Pitx3/ak mice, expression of TH in the SNpc and CPU was analysed in new-born and young mice. TH immunostaining in SNpc indicated a loss of TH positive neurons as early as P1 (Figure 12). In CPU, the data suggested a progressive diminution of TH expression from P7 to P14 (Figure 13b, c). A weak decrease was observed in P1 mice, which reached 68% diminution in P7 mice ($p < 0.01$). TH deficiency was almost completely established in P14 mice (TH diminution of 78%, $p < 0.01$, Figure 13c) and reached a diminution of 82% in P135 mice ($p < 0.001$, Figure 13d).

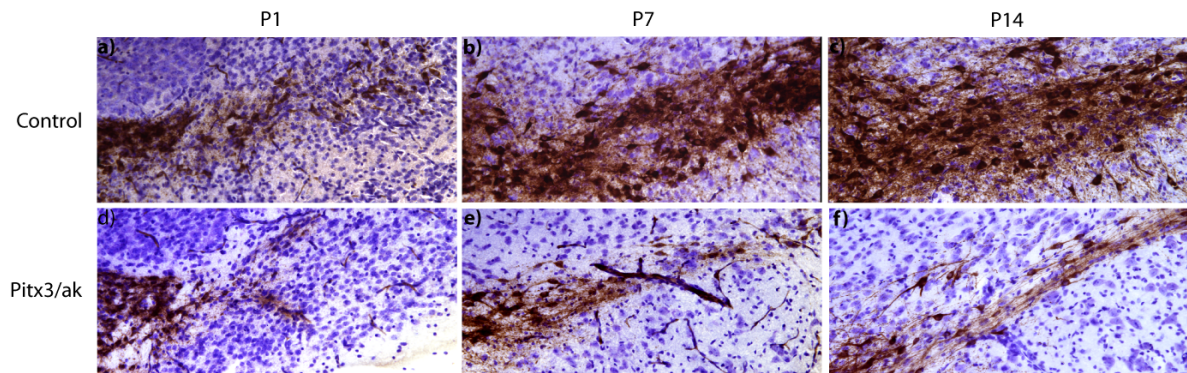


Figure 12: TH immunohistochemistry and Nissl staining of midbrain sections reveal a marked reduction in cell density in the SNpc of P1 (d), P7 (e) and P14 (f) Pitx3/ak mice compared to age-matched control mice (a, b, c).

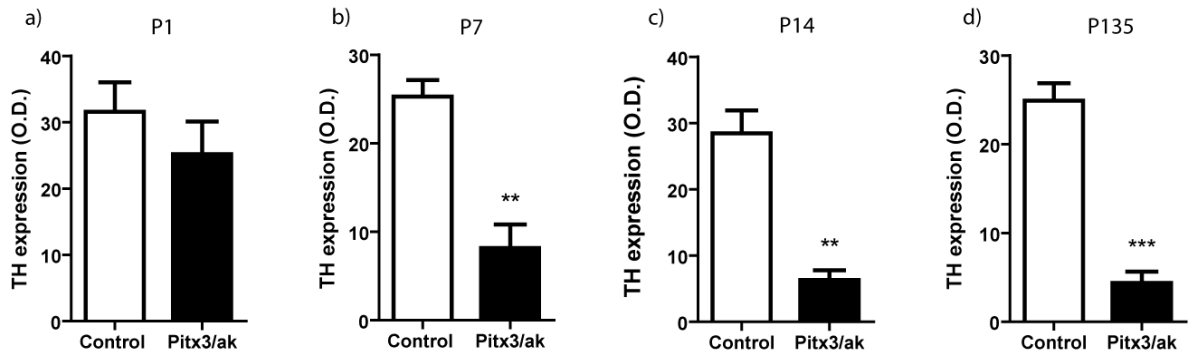


Figure 13: Reduction of tyrosine hydroxylase (TH) level in the caudate putamen during the development of Pitx3/ak mice. Levels of TH protein measured by immunohistochemistry in caudate putamen (CPU) of control and Pitx3/ak mice at different ages: P1 (a), P7 (b), P14 (c), and P135 (d). Note that Pitx3/ak mice have a deficient striatal dopaminergic innervation as early as P7. Error bars represent SEM. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; student's t-test.

2.5.4. Behavioural characteristics of Pitx3/ak adult mice

The study of developmental process of Pitx3/ak mice suggests that adult Pitx3/ak mice have a loss of neurons sufficient to allow locomotor dysfunctions. We analysed sensorimotor coordination and posture stability by the rotarod test. As shown in Figure 14a, large variations in latency to fall were observed between the Pitx3/ak mice and wild-type mice. Pitx3/ak mice remained 5.3 less time on the rotating rod than wild-type mice (30.31 ± 29.87 vs 162.00 ± 29.69 , $p < 0.0001$). To analyse the dexterity and coordination of Pitx3/ak mice we used the coat-hanger test. Pitx3/ak mice reached a stable position on the coat-hanger 2.3 times more slowly than wild-type mice (112.13 ± 22.27 vs 47.89 ± 21.10 , $p < 0.0017$) (Figure 14b). We subsequently determined whether Pitx3/ak mice present an alteration of locomotor activities by measuring spontaneous ambulatory and vertical activities using the Flex-Field system (Figure 14c, d). Pitx3/ak showed less ambulatory and vertical activities, as they walked 80.94 % less (143.38 ± 153.00 vs 752.56 ± 199.20 , $p < 0.0001$) and made 81.26% less vertical movements (112.25 ± 55.64 vs 599.25 ± 193.82 , $p < 0.0001$) than wild-type mice. These results indicate that Pitx3/ak mice display marked akinesia.

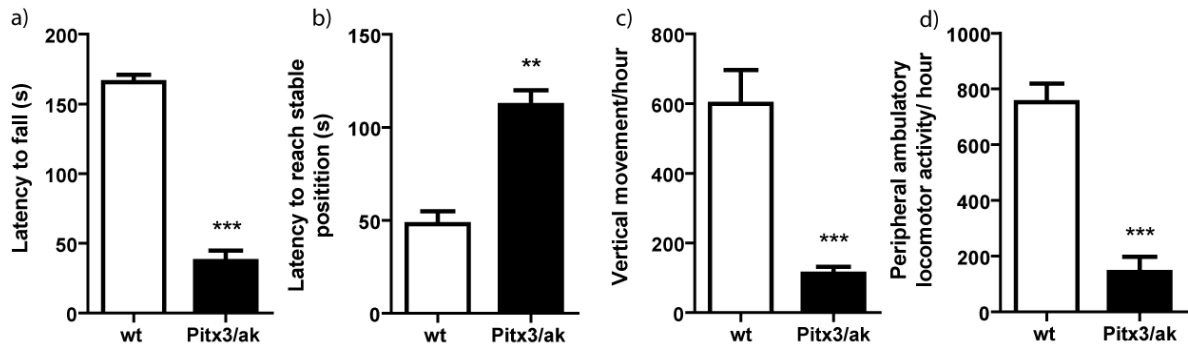


Figure 14: Pitx3/ak mice have impaired locomotor activity. a) Pitx3/ak failed to maintain balance on the rotating rod (rotarod test). b) Pitx3/ak mice showed significantly greater latency to reach stable position (sec) on the coat-hanger test. c) Pitx3/ak mice displayed less vertical movements in one hour. d) Pitx3/ak mice showed less spontaneous peripheral ambulatory activity in one hour. Errors bars indicate SEM. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; student's t-test.

2.5.5. Important loss of SNpc dopaminergic neurons in the Pitx3/ak adult mice

To determine whether Pitx3/ak adult mice may represent a good model for studying PD, we analyzed some of the most important characteristics of this disease. The first criterion was an important loss of DA neurons in the SNpc. SNpc DA neurons expressing TH and positive for Nissl stain were counted by stereology. More than 60% of DA neurons were lost in the Pitx3/ak mice compared to control mice (42.4 ± 8.5 vs 106.3 ± 22.8) (Figure 15e). Student's t test revealed a statistical difference between the two groups ($p < 0.0001$). This loss of neurons in Pitx3/ak mice leads to a diminution of TH-positive striatal DA afferents (Figure 15).

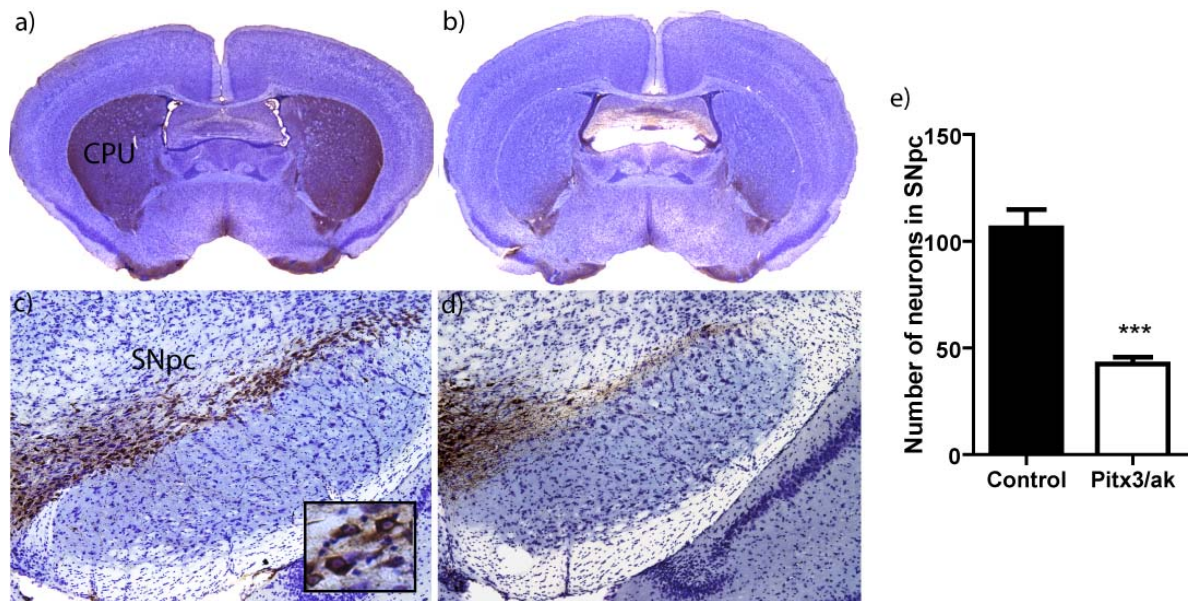


Figure 15: Loss of TH/Nissl positive neurons in the SNpc of Pitx3/ak mice. Representative coronal sections are presented to document the loss of TH/Nissl positive neurons in SNpc of Pitx3/ak mice (d) compared to control mice (c). This loss of DA neurons correlates with a diminution of TH staining in CPU in Pitx3/ak mice (b) compared to control mice (a). Cell counts of TH and Nissl positive neurons in SNpc were averaged (number of DA neurons/slice) (e). Errors bars indicate SEM. *** $p < 0.001$; student's t-test.

2.5.6. Pitx3/ak mice have a BDNF deficit

We also had to assure that Pitx3/ak mice have a deficit in BDNF as in Parkinson's patients. We studied the expression level of the BDNF gene by *in situ* hybridization. BDNF mRNA expression was greatly reduced in Pitx3/ak mice (Figure 16). The quantitative analysis of optical density of BDNF hybridization signal revealed a diminution by more than 30% in Pitx3/ak mice compared to control mice in the thalamus (Figure 16c), hippocampus (Figure 16d), and cortex (Figure 16b) (0.0768 ± 0.0276 vs 0.1129 ± 0.0370 , 0.4311 ± 0.1567 vs 0.6288 ± 0.1220 and 0.2620 ± 0.1070 vs 0.3856 ± 0.0949 respectively). Student's t test analysis showed a significant difference between Pitx3/ak and wild-type mice ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.05$ for the thalamus, hippocampus, and cortex, respectively). Although BDNF mRNA reduction was observed in many brain regions of Pitx3/ak mice, SNpc neurons suffer the most important loss of BDNF mRNA expression (Figure 16a). More specifically, optical density of BDNF mRNA signal in the SNpc was reduced by 68.91% in Pitx3/ak mice (0.0736 ± 0.0357 vs 0.2367 ± 0.0665 , $p < 0.0001$). These results demonstrate

that BDNF mRNA expression is reduced in Pitx3/ak mice as in Parkinson's patients (Mogi *et al.*, 1999; Nagatsu *et al.*, 2000; Parain *et al.*, 1999).

2.5.7. Bone marrow-derived cells infiltrate Pitx3/ak mice brain

To study therapeutic effects of hematopoietic stem cells modification, we have to assure that bone marrow-derived cells infiltrate Pitx3/ak mice brain and then can deliver BDNF in specific dysfunctional regions. Chimeric mice were generated by transplanting bone marrow cells expressing GFP. The labelling of blood-derived cells with GFP immunohistochemistry revealed a great infiltration in the parenchyma of Pitx3/ak mice (Figure 17). Notably, an important proportion of donor-derived cells in Pitx3/ak mice brain had differentiated in parenchymal microglia. Infiltrating microglial cells were observed in various brain regions, namely the thalamus, cortex, subthalamic nucleus, SNpc (Figure 17c, d), and CPU (Figure 17a, b). These results demonstrate that bone marrow cells migrated across the BBB and infiltrated in regions involved in PD. In addition to these parenchymal cells, donor-derived cells were also found in the perivascular space tightly associated with blood vessels. Perivascular microglial cells were observed both in Pitx3/ak and control mice (Figure 17).

2.5.8. Mechanisms implicated in microglial cells infiltration

To study the signal that triggers the infiltration of blood-derived microglia, we analyse the expression of two important chemokine systems: CCL2 (MCP-1)/CCR2 and CX₃CL1 (fractalkine)/CX₃CR₁. MCP-1 and CX₃CR₁ mRNA expression was analyzed by *in situ* hybridization in new-born mice (P1), young mice (P7 and P14), and adult mice (P90). Expression of MCP-1 mRNA was not detected in Pitx3/ak mice and this, at any time. For the chemokine system CX₃CL1/CX₃CR₁, no difference was observed between Pitx3/ak and control mice. The integrity of the BBB was analyzed by immunohistochemistry using an anti-mouse immunoglobuline-G. No difference in optical density was observed between Pitx3/ak and control mice. These results suggest that the integrity of the BBB was not altered in these animals.

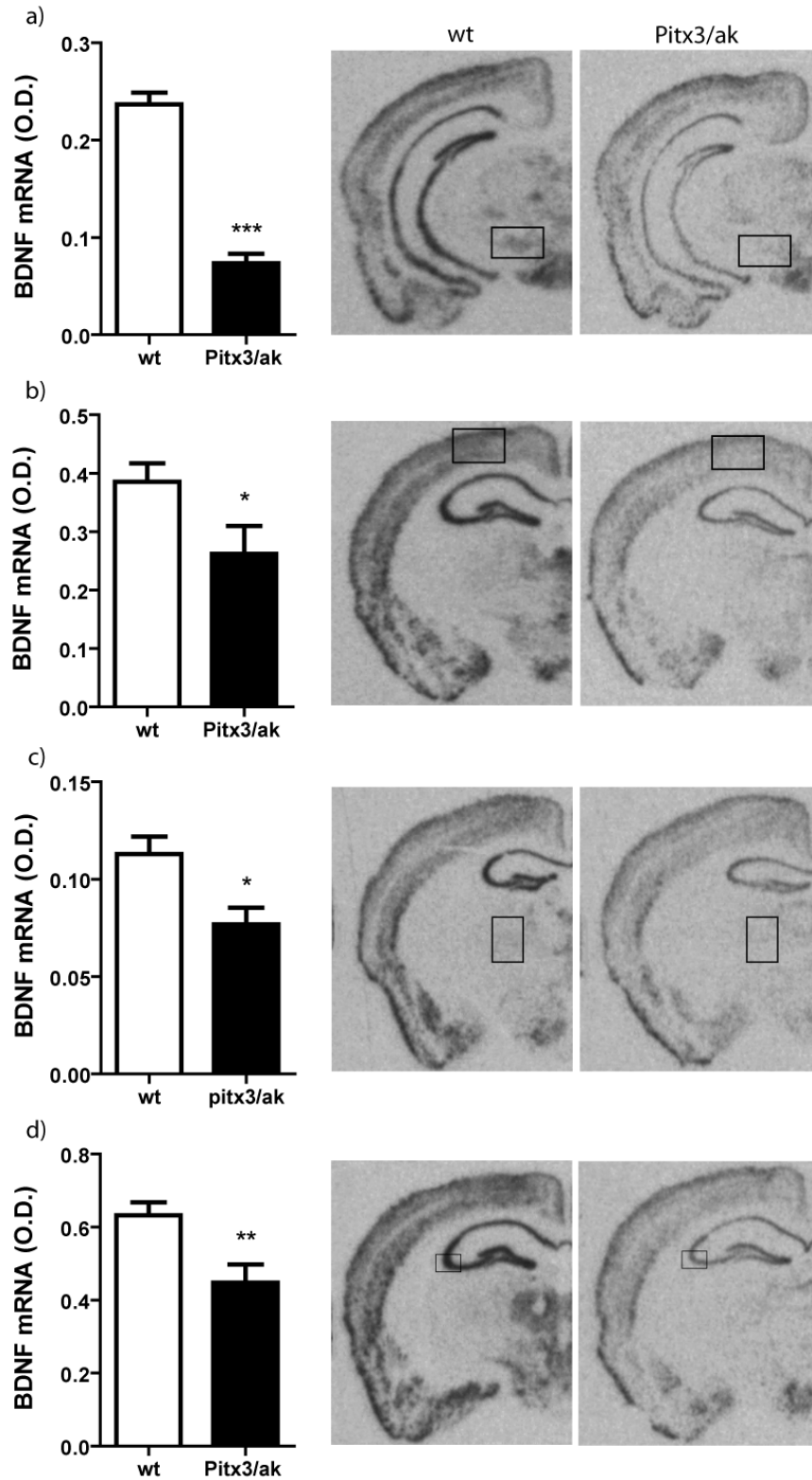


Figure 16: BDNF mRNA expression is significantly reduced in SNpc (a), cortex (b), thalamus (c), and hippocampus (d) of Pitx3/ak mice compared to control mice. Errors bars indicate SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$; t-test.

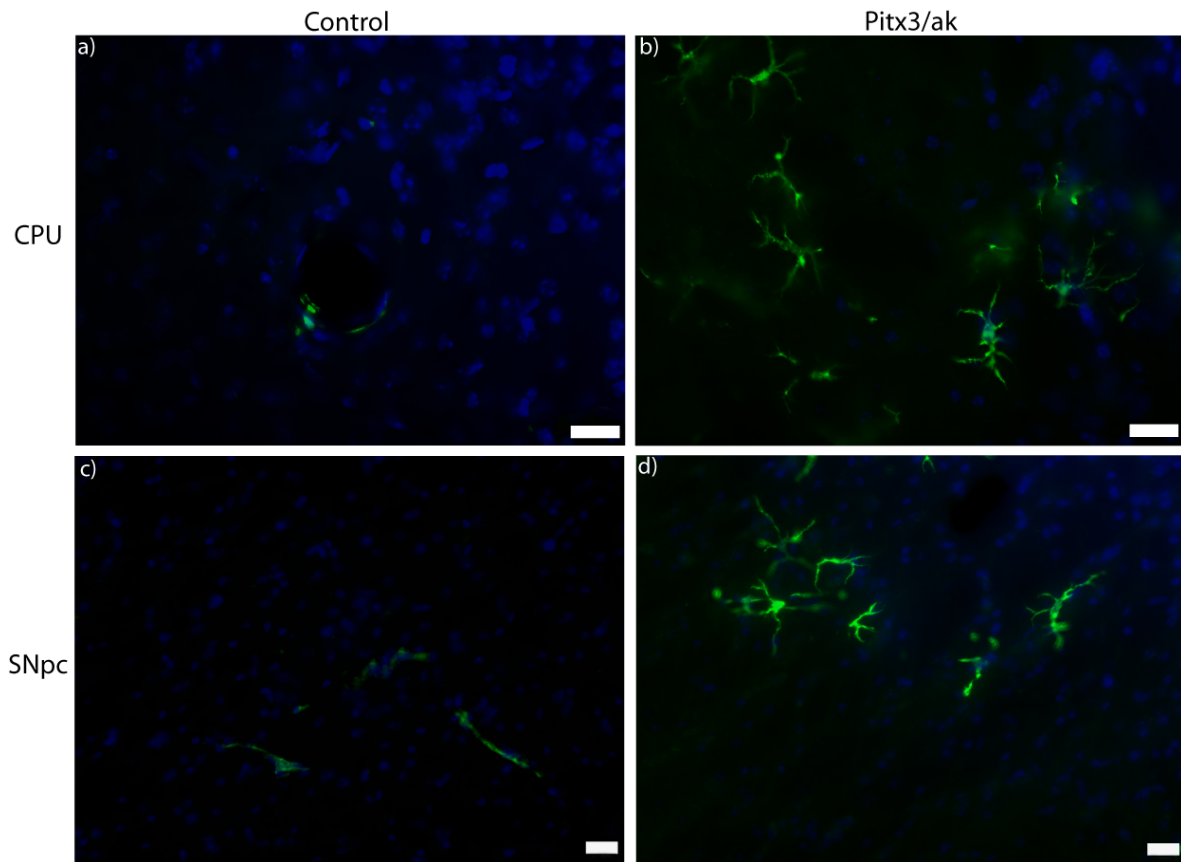


Figure 17: Microglia of bone marrow origin (GFP) infiltrate the SNpc (b) and CPU (d) of adult Pitx3/ak mice. In Pitx3/ak chimeric mice, parenchymal and perivascular blood-derived microglia were detected by an anti-GFP antibody. In the brain of control mice, only perivascular cells were observed (a-c). Scale bars represent 20 μ m.

2.5.9. Lenti-GFP/BDNF treatment improves locomotor activity of Pitx3/ak mice

We next attempted to analyze whether BDNF gene delivery in brain improves locomotor activity in Pitx3/ak mice. To accomplish this goal, lenti-GFP/BDNF or control lenti-GFP was injected in the bone marrow of Pitx3/ak mice. Locomotor activity was tested before the injection and 6 and 12 weeks after the injection. Notably, the locomotor activity in Pitx3/ak-Lenti-GFP/BDNF mice was greatly increased compared to control mice at 6 and 12 weeks post-injection, as demonstrated by the rotorod test ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) (Figure 18a). Improvement of locomotor activity was also demonstrated by the coat-hanger test. After lenti-GFP/BDNF injection, Pitx3/ak mice reached more rapidly a stable position (Figure 18b).

First of all, these results have confirmed that lentiviral constructs can be used to successfully modify bone marrow cells. Secondly, these results showed that BDNF delivery through genetically-modified hematopoietic stem cells can improve locomotor activity in Pitx3/ak mice. It is interesting to note that this therapeutic effect seems to be permanent, as it is still observed 3 months after lentiviral injection. The injection of empty lentiviruses (Lenti-GFP) in the bone marrow did not affect the behaviour of Pitx3/ak mice. Moreover, the weight of Pitx3/ak mice before and after injection remained similar and the locomotor activity of Pitx3-lenti/GFP mice and Pitx3/ak mice were identical (Figure 18).

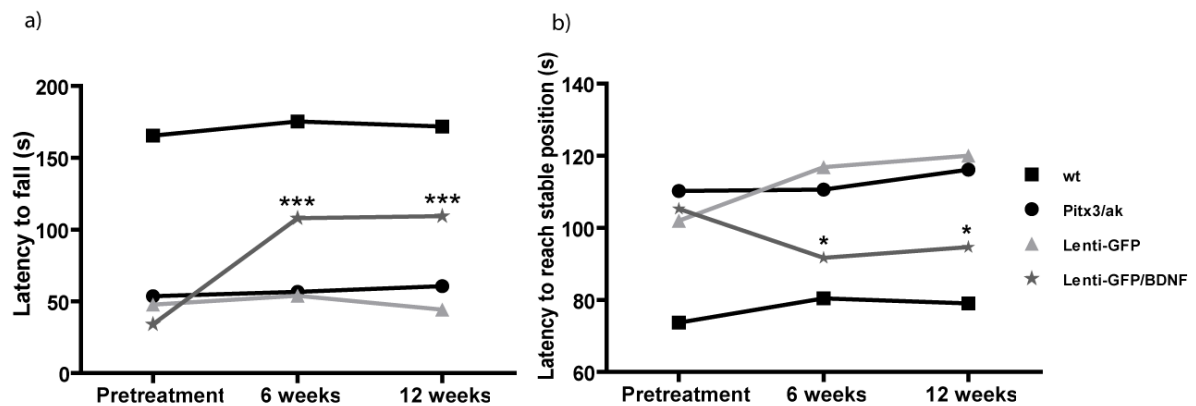


Figure 18: Lenti-GFP/BDNF improves locomotor activity in adult Pitx3/ak mice. a) Rotorod test showed that Pitx3/ak mice are able to stay significantly longer on the rotating rod after injection of lenti-GFP/BDNF. Improvement of coordination and stability are observed as early as the sixth week after lentiviral injection. b) Coat-hanger test showed that Pitx3/ak-Lenti-GFP/BDNF mice reached a stable position more rapidly than Pitx3/ak-Lenti-GFP mice. Therapeutic effects of lenti-GFP/BDNF do not seem to be a transient effect because locomotor improvements are still detected 12 weeks after lentiviral injection. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; two-way ANOVA with replication.

2.5.10. Lenti-GFP/BDNF injection enhances BDNF mRNA expression

To test the hypothesis that beneficial effects of lenti-GFP/BDNF treatment are a consequence of the restoration of BDNF deficiency in Pitx3/ak mice, we analyzed BDNF mRNA expression. BDNF mRNA signal was significantly increased in Pitx3/ak-Lenti-GFP/BDNF mice (Figure 19). The recovery of BDNF expression in Pitx3/ak mice took place in different brain regions. BDNF mRNA expression in SNpc of Pitx3/ak-Lenti-GFP/BDNF mice is 35.87% higher than Pitx3/ak-Lenti-GFP control mice (Figure 19a, e, f). Similar increases in BDNF mRNA levels were measured in cortex (Figure 19b) and

thalamus (Figure 19c). These data indicate that lenti-GFP/BDNF stimulated BDNF production in the brain of this mouse model of PD.

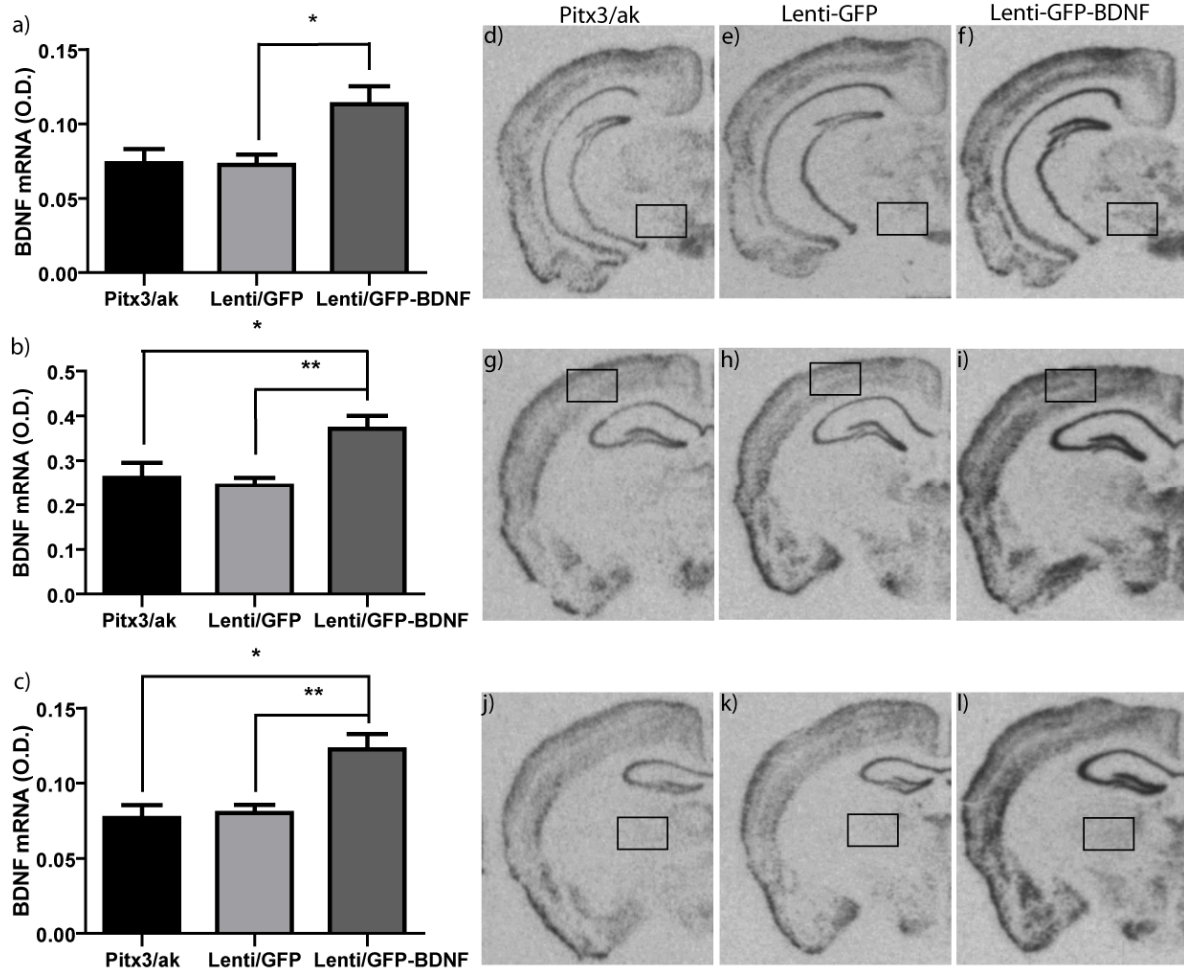


Figure 19 : Expression levels of BDNF mRNA in different brain regions of Pitx3/ak (d-g-j), Pitx3/ak-Lenti-GFP (e-h-k), and Pitx3/ak-Lenti-GFP/BDNF (f-i-l) mice. Relative mRNA expression was quantified in SNpc (a), cortex (b) and thalamus (c). BDNF expression levels were significantly increased by lentiviral-GFP/BDNF injection in SNpc, cortex, and thalamus. Errors bars indicate SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; One-way ANOVA; Bonferroni's post test (SNpc and cortex) and Dunn's post test (thalamus).

2.5.11. Lenti-GFP/BDNF injection enhances TH expression

To analyze whether improvement of locomotor activity was related to TH variations, we measured TH levels in CPU and SNpc. SNpc TH levels were increased by more than 50% in Pitx3/ak-Lenti-GFP/BDNF mice compared to Pitx3/ak-Lenti-GFP mice (Figure 20b). This result demonstrates a beneficial effect of BDNF in the SNpc, although such an increase was not detected in the CPU (Figure 20a). These results underline a beneficial effect of BDNF on neurons of the SNpc.

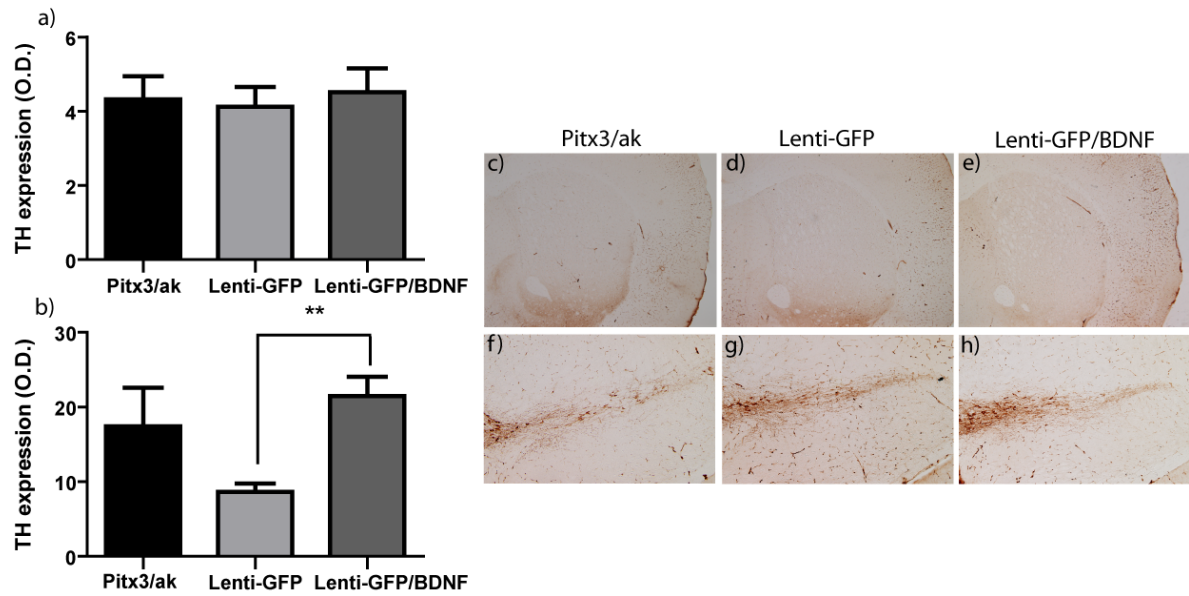


Figure 20 : TH expression levels in the CPU (a) and SNpc (b) of Pitx3/ak (c-f), Pitx3/ak-Lenti-GFP (d-g), and Pitx3/ak-Lenti-GFP/BDNF (e-h). TH expression was significantly increased by Lenti-GFP/BDNF in SNpc but not in CPU. Errors bars indicate SEM. ** $p < 0.01$; One-way ANOVA; Bonferroni's post test.

2.6. Discussion

The beneficial effect of BDNF on DA neurons has been demonstrated by many studies. When injected intrathecally, BDNF is neuroprotective against the toxic action of systemic MPTP in monkeys (Tsukahara *et al.*, 1995). It has also been found that intrastriatal transplantation of fibroblasts genetically modified to produce BDNF protects nerve terminals and cell bodies of the nigrostriatal dopaminergic pathway against damage induced by intrastriatal administration of 6-OHDA (Levivier *et al.*, 1995). Similar results were reported by Frim *et al.* (1994) and Galpern *et al.* (1996) who implanted modified fibroblasts in the SN damaged by intrastriatal injection of MPP⁺. Based on the BDNF deficit observed in PD patients, we used a new method to deliver the neurotrophic factor. We hypothesized that restoring the level of BDNF by the modification of hematopoietic stem cells could solve the deprivation of the trophic support to the affected neurons.

Analysis of therapeutic approaches has to begin with the use of an appropriate model. Murine Parkinson's models are numerous, but few present all of the characteristics normally observed in Parkinson's patients. Clinical symptoms of Parkinson's patients appear when approximately 50% of DA neurons in the SNpc and 80% of the striatal dopamine are lost (Hughes *et al.*, 1992; Rajput *et al.*, 1991). To characterize motor deficit in Parkinson's mouse models and to be representative of Parkinson's patients, the murine model of choice has to show a severe loss of DA neurons in the SNpc. We have demonstrated that MPTP intoxication does not cause death of DA neurons. In fact, it seems that the expression of DA neuronal markers decrease after MPTP intoxication but the total number of neurons does not change over time. Notably, we found that TH expression returned to baseline two weeks after MPTP treatment (Figure 9). The data obtained in the present study are consistent with that of other studies indicating that neurotoxic effects of subacute MPTP treatment in mice are reversible (Hallman *et al.*, 1985; Petroske *et al.*, 2001; Ricaurte *et al.*, 1986). Moreover, mice treated acutely or subacutely with MPTP do not exhibit motor abnormalities (Gerlach and Riederer, 1996; Heikkila *et al.*, 1989; Petroske *et al.*, 2001). Considering these facts, the MPTP model cannot be used to study the therapeutic effect of neurotrophic factors.

On the other hand, we have demonstrated that Pitx3/ak adult mice present a loss of 60,11% in numbers of DA neurons in the SNpc and a decrease of 82.39% of striatal TH (Figure 13 and Figure 15). As in Parkinson's patients (Price *et al.*, 1978), DA neurons in the ventral tegmental area (VTA) are much less affected in Pitx3/ak mice (Hwang *et al.*, 2003; Smidt *et al.*, 2004; van den Munckhof *et al.*, 2003). The severe loss of nigrostriatal neurons in Pitx3/ak mice suggests that a dysfunction of their locomotor system could be observed. As demonstrated in our study by rotarod and coat-hanger tests, Pitx3/ak mice have defective coordination, stability, and dexterity (Figure 14), such as in Parkinson's patients (Hoover and Strick, 1993; Kojima *et al.*, 1997; Miller and DeLong, 1988; Wichmann and DeLong, 1993). Using the Flex-Field system we further demonstrated that Pitx3/ak mice display dyskinesia. More specifically, Pitx3/ak mice showed a significant reduction in ambulatory and vertical activities. Inconsistent results on the general locomotor activity of Pitx3/ak mice that have been reported in the past (Nunes *et al.*, 2003) may therefore be due to measurements of gross motor activity instead of locomotor activity specific to nigrostriatal dysfunction. Because they have the characteristic loss of nigrostriatal DA neurons, we concluded that Pitx3/ak mice are a good model for PD.

Of all the neurotrophic factors influencing DA neurons, only BDNF has been reported to be an effective dopaminergic neurotrophin (Hyman *et al.*, 1991; Levivier *et al.*, 1995; Shults *et al.*, 1995; Tsukahara *et al.*, 1995) and to be expressed in the adult nigrostriatal system under normal conditions (Murer *et al.*, 1999; Parain *et al.*, 1999). Many studies have reported a reduced expression of the BDNF protein in the SN of Parkinson's patients (Mogi *et al.*, 1999; Parain *et al.*, 1999). However, non-significant decreases in cortex and cerebellum BDNF levels were observed (Mogi *et al.*, 1999). In Pitx3/ak mice, a decrease in BDNF mRNA levels was observed in different brain regions such as the SNpc, cortex, thalamus and hippocampus. However, the most important decrease in BDNF mRNA expression was observed in SNpc (Figure 16a). The transcription factor Pitx3 plays an important role in the development and function of nigrostriatal DA neurons (Hwang *et al.*, 2003; Nunes *et al.*, 2003; Smidt *et al.*, 2004; Smidt *et al.*, 2003). Peng *et al.* (2007) have demonstrated that overexpression of Pitx3 in neuroblastoma cell culture increases BDNF mRNA and protein

levels of BDNF. Considering this fact, it was therefore not surprising to observe a reduction of BDNF levels in different brain regions of Pitx3/ak mice.

Studies have shown that there is an accumulation of activated microglia in the SN of Parkinson's patients (Banati *et al.*, 1998; Forno, 1996; McGeer *et al.*, 1988). Several studies including ours have also demonstrated an accumulation of microglia in the SN of MPTP-treated mice (Dehmer *et al.*, 2000; Francis *et al.*, 1995; Kurkowska-Jastrzebska *et al.*, 1999; Langston *et al.*, 1983; Nagatsu and Sawada, 2005; Vila *et al.*, 2001). Here we further demonstrated the infiltration of blood-derived microglia in the brain of PD mouse models (Figure 10 and Figure 17). Although, Rodriguez *et al.* (2007) have recently demonstrated the infiltration of bone marrow-derived cells in the MPTP mouse model, no study has revealed the presence of infiltrating microglia in Pitx3/ak mice. These data corroborate previous studies that have demonstrated infiltration of circulating monocytes in the CNS parenchyma and their differentiation in microglial cells (Hess *et al.*, 2004; Simard and Rivest, 2004a). As demonstrated in this study, these blood-derived cells are preferentially attracted to damaged areas of the brain (Kaur *et al.*, 2001; Priller *et al.*, 2001). It is important to note that in our experiment, cells derived from bone marrow infiltrated PD brain regardless of the aetiology of cell death. However, we were not able to determine which signal triggered the infiltration of blood-derived microglia in Pitx3/ak mice.

In this study, we took advantage of the natural ability of hematopoietic stem cells to infiltrate damaged brain regions in Pitx3/ak mice to deliver a neurotrophic factor, BDNF. We hypothesized that the overproduction of BDNF by modification of monocyte precursors might restore the BDNF deficit in Pitx3/ak mice and then, be an interesting therapeutic strategy to promote survival and maintain function of DA neurons of nigrostriatal pathway.

We report here that modification of hematopoietic stem cells by an intra-femoral injection of lenti-GFP/BDNF can restore locomotor dysfunction of Pitx3/ak mice. Incorporation of the BDNF gene improved the coordination, dexterity and postural stability of Pitx3/ak mice, as demonstrated by rotarod and coat-hanger tests (Figure 18). Improvement of locomotor activity was observed as early as six weeks after lentiviral injection. Importantly,

the therapeutic effect of BDNF seemed to be permanent as the behavioural improvement was also observed at 12 weeks past-treatment. These results are consistent with those of a previous study which demonstrated improvement of locomotor function by direct injection of BDNF in SNpc or striatum (Martin-Iverson *et al.*, 1994; Sauer *et al.*, 1993). Reduced motor symptoms are associated with an overexpression of BDNF in SNpc, cortex, and thalamus (Figure 19). The increase in BDNF expression can act on neuronal survival as well as dopaminergic and GABAergic neurotransmission. We have found that overproduction of BDNF by hematopoietic stem cells gives rise to an increase of TH in the SNpc, as seen in Figure 20b. It appears that BDNF produced by genetically modified microglia exerts a modulatory influence on remaining DA neurons. We can therefore speculate that BDNF treatment may have supported DA neurons in the SNpc, enhance TH expression and, consequently, dopamine level. Previous studies have also demonstrated that direct injection of BDNF in SNpc increases dopamine turnover and the density of TH-positive fibers (Lucidi-Phillipi *et al.*, 1995; Morse *et al.*, 1993). We have to note that TH expression of striatum is not increased. As all basal ganglia signals come from the SNpc and striatum, the absence of TH increase in the striatum is surprising based on the fact that locomotor activities are improved in Pitx3/ak treated by Lenti-GFP/BDNF. Improvement in Pitx3/ak mice can perhaps be explained by the effect of BDNF on GABAergic neurotransmission. Indeed, BDNF regulates the inhibitory neurotransmission by inhibition of gamma-aminobutyric acid (GABA) (Canas *et al.*, 2004). By inhibiting GABA and its receptor, BDNF could decrease the tonic inhibition of thalamocortical neurons. Notably, this tonic inhibition is enhanced in Parkinson's patients (Hoover and Strick, 1993; Kojima *et al.*, 1997; Miller and DeLong, 1988; Wichmann and DeLong, 1993; Wichmann and DeLong, 1996) and responsible for bradykinesia. Although the effect of BDNF on the GABA system will have to be proven experimentally in Pitx3/ak mice, we speculate that regulation of GABA, as regulation of dopamine, could improve locomotor activity in Pitx3/ak-lenti-GFP/BDNF.

The locomotor improvement and increase in BDNF mRNA expression in Pitx3/ak-lenti-GFP/BDNF mice prove that lentiviruses coding for the BDNF gene successfully transduce hematopoietic stem cells. However, we did not detect the presence of GFP-positive

microglia in Pitx3/ak-Lenti-GFP/BDNF and Pitx3/ak-Lenti-GFP mice, even after analyzing brains, blood, femurs, spleens and livers. These results could be explained by variations in the detection of labeled cell over time. Indeed, Liu *et al.* (2005a) have demonstrated that a significant reduction in GFP is observed in systemic organs few months after lentiviral transduction. Another possible explanation for these results could be associated with a peripheral improvement rather than an effect in the central nervous system.

In conclusion, we have demonstrated that Pitx3/ak mice are representative of the late state of PD and are therefore an appropriate model to study the therapeutic effect of neurotrophic factors. Finally, overexpression of BDNF in bone marrow-derived cells represents a good approach to improve the diffusion and administration of BDNF in PD.

CHAPITRE III

Conclusion et perspectives

La maladie de Parkinson compte parmi les maladies dégénératives les plus communes. La perte progressive de neurones dopaminergiques au niveau de la SNpc et la présence de corps de Lewy sont les deux principales caractéristiques pathophysiologiques de la maladie. L'altération de la voie nigrostriée provoque, chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, des dysfonctions motrices incluant la bradykinésie, le tremblement au repos, la rigidité et une posture instable. Les traitements actuels de la maladie de Parkinson améliorent les symptômes moteurs, mais ne permettent pas la neuroprotection des neurones dopaminergiques subsistants (Rascol *et al.*, 2002; Yahr *et al.*, 1969). Une approche thérapeutique intéressante est l'utilisation de facteurs neurotrophiques. Le BDNF atténue la perte de neurones nigrostriés (Altar *et al.*, 1992; Hyman *et al.*, 1991; Patapoutian and Reichardt, 2001; Riccio *et al.*, 1999; Schabitz *et al.*, 2000) et favorise les fonctions des neurones dopaminergiques en régulant la neurotransmission de la dopamine (Altar *et al.*, 1992; Blochl and Sirrenberg, 1996; Studer *et al.*, 1995) et en inhibant la libération du neurotransmetteur inhibiteur GABA (Brunig *et al.*, 2001; Canas *et al.*, 2004; Tapia-Arancibia *et al.*, 2004).

La première étape de ce projet a été de caractériser des modèles murins de la maladie de Parkinson. Nous avons donc analysé deux modèles murins, soit le modèle toxique MPTP et le modèle génétique Pitx3/ak. Les symptômes moteurs chez les patients atteints de la maladie de Parkinson apparaissent lorsque la perte de neurones dopaminergiques de la SNpc est d'environ 50% (Hughes *et al.*, 1992; Rajput *et al.*, 1991). Cette perte de neurones dopaminergiques engendre une diminution massive de dopamine au niveau du striatum. Nous avons démontré que les souris Pitx3/ak présentent une diminution de neurones dopaminergiques de la SNpc d'environ 60%. Cette perte de neurones nigrostriés produit une diminution de plus de 80% de la tyrosine hydroxylase (impliquée directement dans la synthèse de la dopamine, voir Figure 5) au niveau du striatum. Nous avons également démontré que les souris Pitx3/ak présentent des dysfonctions motrices caractéristiques de la maladie de Parkinson, telles la dyskinésie, une faible coordination, une dextérité diminuée et une posture instable. Contrairement au modèle Pitx3/ak, la perte de neurones dopaminergiques de la SNpc n'est pas observée chez les souris traitées MPTP. En effet, nous avons observé une dysfonction des neurones dopaminergiques se traduisant par une

diminution de l'expression des marqueurs de dopaminergiques plutôt qu'une perte de neurones. De plus, les souris traitées au MPTP ne présentent pas d'anormalités motrices (Gerlach and Riederer, 1996; Heikkila *et al.*, 1989; Petroske *et al.*, 2001). Considérant la grande variabilité des résultats obtenus suite à l'analyse des souris MPTP et la perte transitoire des neurones dopaminergiques de la SNpc, le modèle murin MPTP n'est pas adéquat pour l'analyse d'une nouvelle approche thérapeutique. Au contraire, le modèle Pitx3/ak présente une perte importante de neurones nigrostriés et des dysfonctions locomotrices. Dans les deux modèles murins, des cellules hématopoïétiques infiltrent les régions associées à la voie basale. Ces résultats, de même que les études post-mortem de patients atteints de la maladie de Parkinson (Banati *et al.*, 1998; Forno, 1996; McGeer *et al.*, 1988), indiquent que la perte de neurones dopaminergiques induit un signal permettant le recrutement de cellules dérivées de la moelle osseuse.

La deuxième partie de ce projet a consisté à analyser les effets thérapeutiques de la modification des cellules souches hématopoïétiques par l'injection de lentivirus codant pour le BDNF. Pour ce faire, nous avons construit un vecteur lentiviral codant pour le gène BDNF puis, nous avons injecté le lentivirus obtenu au niveau de la moelle osseuse des fémurs. La surproduction du gène BDNF améliore le comportement locomoteur des souris Pitx3/ak. Nous avons démontré une augmentation de la coordination, de la dextérité et de la stabilité des souris Pitx3/ak suite à l'injection des lentivirus. La surexpression de l'ARNm de BDNF a été observée dans diverses structures du cerveau dont, la substance noire, le cortex et le thalamus. Nous avons également démontré que la surexpression du BDNF dans la SNpc est associée à une augmentation de TH.

Bien que le modèle Pitx3/ak présente plusieurs caractéristiques de la maladie de Parkinson, les mécanismes étiologiques et pathogéniques de la maladie de Parkinson ne sont pas reproduits. La mutation du gène Pitx3 provoque la perte de neurones dopaminergiques au niveau de la voie nigrostriée, mais cette perte survient lors du stade embryonnaire. Il est donc impossible d'étudier les mécanismes de mort cellulaire progressive typique de la maladie de Parkinson. De plus, la perte de neurones est causée par la déficience d'un gène impliqué dans le développement neuronal, la dégénérescence n'est donc pas reliée au stress

oxydatif ou encore à l'agrégation protéique. Étant donné que les mécanismes de mort cellulaire diffèrent entre le modèle Pitx3/ak et les patients atteints de la maladie de Parkinson, l'étude d'approches neuroprotectives est limitée. Toutefois, le modèle Pitx3/ak est un modèle intéressant pour l'étude des traitements symptomatiques puisque le traitement à la L-DOPA renverse l'ensemble des dysfonctions locomotrices des souris Pitx3/ak (Hwang *et al.*, 2005). Pour compléter l'analyse des effets neuroprotecteurs de la modification des cellules hématopoïétiques, il aurait donc été intéressant d'utiliser un second modèle parkinsonien, par exemple le modèle toxique 6-hydroxydopamine (6-OHDA). Le 6-OHDA est une molécule toxique relativement sélective pour les neurones monoaminergiques. La toxine est captée par les transporteurs de la dopamine et les transporteurs noradrenergiques (Luthman *et al.*, 1989). Puisque les neurones de la SNpc sont sensibles au 6-OHDA (Jonsson, 1980), le patron de dégénération est donc similaire à celui retrouvé chez les patients atteints de la maladie de Parkinson. Suite à l'injection de 6-OHDA dans la SN ou dans le striatum, la molécule s'accumule dans le cytosol des neurones et génère des espèces réactives oxygénées et des quinones. Les neurones meurent ensuite par apoptose (Jeon *et al.*, 1995). Suite à l'injection de vecteurs lentiviraux chez les souris traitées au 6-OHDA, un dénombrement des neurones dopaminergiques de la SNpc aurait pu être fait. Ce résultat permettrait de statuer sur le rôle neuroprotecteur de la surproduction de BDNF par les cellules hématopoïétiques.

Il serait également intéressant d'analyser plus en détail l'influence de l'augmentation de l'expression de BDNF sur les différents systèmes de neurotransmetteurs. Nous avons démontré que l'augmentation de l'ARNm de BDNF au niveau de la SNpc corrèle avec une augmentation de la TH. Ainsi, il peut être supposé que le rétablissement du niveau de BDNF pourrait permettre une augmentation de la concentration de la dopamine. Toutefois, au cours de la maladie de Parkinson, le patron d'expression des neurotransmetteurs GABA et glutamate est également dérégulé. En résumé, l'augmentation des signaux glutamate excitateurs vers le GPi augmente les signaux GABA inhibiteurs provenant du GPi en direction des noyaux thalamiques (Brunig *et al.*, 2001; Canas *et al.*, 2004; Tapia-Arancibia *et al.*, 2004). Ce dérèglement résulte en une augmentation des signaux inhibiteurs de la voie basale et, conséquemment, à une anormalité motrice. Le BDNF, en inhibant l'expression du

récepteur GABA, pourrait réguler la neurotransmission exagérée de GABA vers le thalamus et ainsi, diminuer les signaux inhibiteurs responsables des dysfonctions motrices. L'étude de la régulation du récepteur de GABA et du neurotransmetteur permettrait d'en savoir plus sur l'action thérapeutique du BDNF dans la maladie de Parkinson. Il est également important de noter que l'effet thérapeutique de BDNF peut être associé à une augmentation des gènes de survie, tel que BCL-2 (Riccio *et al.*, 1999; Schabitz *et al.*, 2000). Il serait donc intéressant d'étudier la régulation de ces gènes dans les neurones dopaminergiques suite à l'injection des lentivirus codant pour le gène BDNF.

Le vecteur lentiviral utilisé code pour le gène BDNF, mais également pour le gène rapporteur GFP. Ainsi, les cellules hématopoïétiques transduites par le lentivirus sont marquées par le gène fluorescent GFP. Par contre, suite à l'injection du lentivirus, aucune cellule GFP n'a été détectée chez nos animaux. La présence de cellules marquées par le gène GFP fut analysée dans le sang, le foie, la rate, les fémurs et le cerveau. Toutefois, ces analyses ont été faites 12 semaines après l'injection des lentivirus. Il serait donc intéressant de suivre les cellules modifiées à différents temps, soit à 1 semaine, à 2 semaines et à 1 mois après l'injection. En effet, il a été démontré que la détection des cellules marquées suite à l'injection d'un lentivirus peut varier dans le temps (Liu *et al.*, 2005a). Une étude plus exhaustive de la transduction et de la mobilité des cellules modifiées pourrait également être faite en étudiant, par des analyses PCR, la présence d'un transgène dans différents organes.

Finalement, l'amélioration du comportement moteur par la modification des cellules souches hématopoïétiques nous permet de croire que l'utilisation du BDNF pourrait être une avenue intéressante dans le développement de thérapies contre la maladie de Parkinson. Bien que la nature neuroprotectrice de la surproduction du BDNF n'ait pas pu être démontrée dans cette étude, il n'en demeure pas moins que le BDNF a des effets bénéfiques sur les neurones dopaminergiques. La libération du BDNF par la modification des cellules souches hématopoïétiques est une approche très intéressante pour le traitement de la maladie de Parkinson. En effet, il est permis de croire que la régulation naturelle de

l'infiltration des cellules dérivées de la moelle osseuse dans le temps et dans l'espace pourrait permettre une régulation ciblée et efficace du facteur neurotrophique.

Bibliographie

- Abbas, A.K., and H.L. Andrew. 2005. Cellular and Molecular Immunology. Elsevier Saunders, Philadelphia.
- Ahlskog, J.E., and M.D. Muentzer. 2001. Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov. Disord.* 16:448-58.
- Alexander, G.E., and M.D. Crutcher. 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.* 13:266-271.
- Altar, C.A., C.B. Boylan, C. Jackson, S. Hershenon, J. Miller, S.J. Wiegand, R.M. Lindsay, and C. Hyman. 1992. Brain-Derived Neurotrophic Factor Augments Rotational Behavior and Nigrostriatal Dopamine Turnover in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:11347-11351.
- Ambion, I.G.P.A. 2008. BDNF pathway. In GeneAssist Pathway Atlas. Vol. 2008, Foster City.
- Andjelkovic, A.V., B. Nikolic, J.S. Pachter, and N. Zecevic. 1998. Macrophages/microglial cells in human central nervous system during development: an immunohistochemical study. *Brain Res.* 814:13-25.
- Ascherio, A., H. Chen, M.G. Weisskopf, E. O'Reilly, M.L. McCullough, E.E. Calle, M.A. Schwarzschild, and M.J. Thun. 2006. Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 60:197 - 203.
- Banati, R.B., S.E. Daniel, and S.B. Blunt. 1998. Glial pathology but absence of apoptotic nigral neurons in long-standing Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 13:221-227.
- Batchelor, P.E., G.T. Liberatore, J.Y.F. Wong, M.J. Porritt, F. Frerichs, G.A. Donnan, and D.W. Howells. 1999. Activated Macrophages and Microglia Induce Dopaminergic Sprouting in the Injured Striatum and Express Brain-Derived Neurotrophic Factor and Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor. *J. Neurosci.* 19:1708-1716.
- Beck, H., R. Voswinckel, S. Wagner, T. Ziegelhoeffer, M. Heil, A. Helisch, W. Schaper, T. Acker, A.K. Hatzopoulos, and K.H. Plate. 2003. Participation of Bone Marrow-Derived Cells in Long-Term Repair Processes After Experimental Stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 23:709-717.
- Beck, K.D., B. Knüsel, and F. Hefti. 1993. The nature of the trophic action of brain-derived neurotrophic factor, des(1-3)-insulin-like growth FACTOR-1, and basic fibroblast growth factor on mesencephalic dopaminergic neurons developing in culture. *Neuroscience.* 52:855-866.

- Benisty, S., F. Boissiere, B. Faucheux, Y. Agid, and E.C. Hirsch. 1998. Tyrosine kinase B messenger RNA expression in normal human brain and in the substantia nigra of parkinsonian patients: an in situ hybridization study. *Neuroscience*. 86:813-826.
- Beric, A., P.J. Kelly, A. Rezai, D. Sterio, A. Mogilner, M. Zonenshayn, and B. Kopell. 2001. Complications of Deep Brain Stimulation Surgery. *Stereotact Funct Neurosurg*. 77:73-78.
- Bessler, H., R. Djaldetti, H. Salman, M. Bergman, and M. Djaldetti. 1999. IL-1[beta], IL-2, IL-6 and TNF-[alpha] production by peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease. *Biomed. Pharmacother*. 53:141-145.
- Björklund, A., S.B. Dunnett, P. Brundin, A.J. Stoessl, C.R. Freed, R.E. Breeze, M. Levivier, M. Peschanski, L. Studer, and R. Barker. 2003. Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2:437-445.
- Blochl, A., and C. Sirrenberg. 1996. Neurotrophins Stimulate the Release of Dopamine from Rat Mesencephalic Neurons via Trk and p75LntR Receptors. *J. Biol. Chem*. 271:21100-21107.
- Boka, G., P. Anglade, D. Wallach, F. Javoy-Agid, Y. Agid, and E.C. Hirsch. 1994. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett*. 172:151-154.
- Brederlau, A., A.S. Correia, S.V. Anisimov, M. Elmi, G. Paul, L. Roybon, A. Morizane, F. Bergquist, I. Riebe, U. Nannmark, M. Carta, E. Hanse, J. Takahashi, Y. Sasai, K. Funa, P. Brundin, P.S. Eriksson, and J.-Y. Li. 2006. Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cells to a Rat Model of Parkinson's Disease: Effect of In Vitro Differentiation on Graft Survival and Teratoma Formation. *Stem Cells*. 24:1433-1440.
- Brundin, P., R.E. Strecker, H. Widner, D.J. Clarke, O.G. Nilsson, B. Astedt, O. Lindvall, and A. Björklund. 1988. Human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease: immunological aspects, spontaneous and drug-induced behaviour, and dopamine release. *Exp Brain Res*. 70:192-208.
- Brunig, I., S. Penschuck, B. Berninger, J. Benson, and J.-M. Fritschy. 2001. BDNF reduces miniature inhibitory postsynaptic currents by rapid downregulation of GABAA receptor surface expression. *Eur. J. Neurosci*. 13:1320-1328.
- Canas, N., I.T. Pereira, J.A. Ribeiro, and A.M. Sebastião. 2004. Brain-derived neurotrophic factor facilitates glutamate and inhibits GABA release from hippocampal synaptosomes through different mechanisms. *Brain Res*. 1016:72-78.
- Casper, D., C. Mytilineou, and M. Blum. 1991. EGF enhances the survival of dopamine neurons in rat embryonic mesencephalon primary cell culture. *J. Neurosci. Res*. 30:372-81.

- Chade, A., M. Kasten, and T. CM. 2006. Nongenetic causes of Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Supplementum* 70:147-51.
- Chamak, B., V. Morandi, and M. Mallat. 1994. Brain macrophages stimulate neurite growth and regeneration by secreting thrombospondin. *J. Neurosci. Res.* 38:221-33.
- Chao, M.V., and B.L. Hempstead. 1995. p75 and Trk: A two-receptor system. *Trends Neurosci.* 18:321-326.
- Croll, S.D., C. Suri, D.L. Compton, M.V. Simmons, G.D. Yancopoulos, R.M. Lindsay, S.J. Wiegand, J.S. Rudge, and H.E. Scharfman. 1999. Brain-derived neurotrophic factor transgenic mice exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity and in vitro hyperexcitability in the hippocampus and entorhinal cortex. *Neuroscience.* 93:1491-1506.
- Dauer, W., and S. Przedborski. 2003. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron.* 39:889-909.
- Dehmer, T., J. Lindenau, S. Haid, J. Dichgans, and J.B. Schulz. 2000. Deficiency of inducible nitric oxide synthase protects against MPTP toxicity in vivo. *J. Neurochem.* 74:2213-2216.
- Del Rio-Hortega, P. 1932. Microglia. In : Penfield W (ed) : Cytology and cellular pathology of the nervous system, New York. 482-534 pp.
- Delwaide, P.J., J.L. Pepin, and A. Maertens de Noordhout. 1993. Contribution of reticular nuclei to the pathophysiology of parkinsonian rigidity. *Adv Neurol.* 60:381-5.
- Dluzen, D.E., G.M. Story, K. Xu, J. Kucera, and J.M. Walro. 1999. Alterations in Nigrostriatal Dopaminergic Function within BDNF Mutant Mice. *Exp. Neurol.* 160:500-507.
- Engele, J., and M.C. Bohn. 1991. The neurotrophic effects of fibroblast growth factors on dopaminergic neurons in vitro are mediated by mesencephalic glia [published erratum appears in J Neurosci 1992 Mar;12(3):685]. *J. Neurosci.* 11:3070-3078.
- Engele, J., and B. Franke. 1996. Effects of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) on dopaminergic neurons require concurrent activation of cAMP-dependent signaling pathways. *Cell Tissue Res.* 286:235-240.
- Factor, A.S., and J.W. Weiner. 2002. Parkinson's Disease : Diagnosis and Clinical Management. 685 pp.
- Fang, H., J. Chartier, C. Sodja, A. Desbois, M. Ribocco-Lutkiewicz, P.R. Walker, and M. Sikorska. 2003. Transcriptional Activation of the Human Brain-derived Neurotrophic Factor Gene Promoter III by Dopamine Signaling in NT2/N Neurons. *J. Biol. Chem.* 278:26401-26409.

- Feng, L., C.Y. Wang, H. Jiang, C. Oho, K. Mizuno, M. Dugich-Djordjevic, and B. Lu. 1999. Differential effects of GDNF and BDNF on cultured ventral mesencephalic neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 66:62-70.
- Fleming, S.M., P.-O. Fernagut, and M.-F. Chesselet. 2005. Genetic Mouse Models of Parkinsonism: Strengths and Limitations. *NeuroRx.* 2: 495–503.
- Flügel, A., M. Bradl, G.W. Kreutzberg, and M.B. Graeber. 2001. Transformation of donor-derived bone marrow precursors into host microglia during autoimmune CNS inflammation and during the retrograde response to axotomy. *J. Neurosci. Res.* 66:74-82.
- Forno, L.S. 1996. Neuropathology of Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55:259-72.
- Forno, L.S., L.E. DeLanney, I. Irwin, and J.W. Langston. 1993. Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations. *Adv Neurol.* 60:600-8.
- Forno, L.S., J.W. Langston, L.E. DeLanney, I. Irwin, and G.A. Ricaurte. 1986. Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. *Ann. Neurol.* 20:449-55.
- Francis, J.W., J. Von Visger, G.J. Markelonis, and T.H. Oh. 1995. Neuroglial responses to the dopaminergic neurotoxicant 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse striatum. *Neurotoxicol Teratol.* 17:7-12.
- Freed, C.R., P.E. Greene, R.E. Breeze, W.-Y. Tsai, W. DuMouchel, R. Kao, S. Dillon, H. Winfield, S. Culver, J.Q. Trojanowski, D. Eidelberg, and S. Fahn. 2001. Transplantation of Embryonic Dopamine Neurons for Severe Parkinson's Disease. *N Engl J Med.* 344:710-719.
- Frim, D.M., T.A. Uhler, W.R. Galpern, M.F. Beal, X.O. Breakefield, and O. Isacson. 1994. Implanted Fibroblasts Genetically Engineered to Produce Brain-Derived Neurotrophic Factor Prevent 1-Methyl-4-Phenylpyridinium Toxicity to Dopaminergic Neurons in the Rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:5104-5108.
- Fumagalli, F., G. Racagni, and M.A. Riva. 2006. Shedding light into the role of BDNF in the pharmacotherapy of Parkinson's disease. *Pharmacogenomics J.* 6:95-104.
- Galpern, W.R., D.M. Frim, S.B. Tatter, C.A. Altar, M.F. Beal, and O. Isacson. 1996. Cell-mediated delivery of brain-derived neurotrophic factor enhances dopamine levels in an MPP+ rat model of substantia nigra degeneration. *Cell Transplant.* 5:225-232.
- Gavaldà, N., E. Pérez-Navarro, E. Gratacòs, J.X. Comella, and J. Alberch. 2004. Differential involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and p42/p44 mitogen activated protein kinase pathways in brain-derived neurotrophic factor-induced trophic effects on cultured striatal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 25:460-468.

- Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman. 2003. Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity*. 19:71-82.
- Gerlach, M., and P. Riederer. 1996. Animal models of Parkinson's disease: An empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J. Neural Transm.* 103:987-1041.
- Givalois, L., S. Arancibia, G. Alonso, and L. Tapia-Arancibia. 2004. Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Its Receptors in the Median Eminence Cells with Sensitivity to Stress. *Endocrinology*. 145:4737-4747.
- Glass, D.J., and G.D. Yancopoulos. 1993. The neurotrophins and their receptors. *Trends Cell Biol.* 3:262-268.
- Graham, D.G. 1978. Oxidative Pathways for Catecholamines in the Genesis of Neuromelanin and Cytotoxic Quinones. *Mol Pharmacol.* 14:633-643.
- Hallman, H., J. Lange, L. Olson, I. Strömberg, and G. Jonsson. 1985. Neurochemical and histochemical characterization of neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on brain catecholamine neurones in the mouse. *J. Neurochem.* 44:117-27.
- Hartmann, A., S.p. Hunot, P.P. Michel, M.-P. Muriel, S. Vyas, B.A. Faucheux, A. Mouatt-Prigent, H.I.n. Turmel, A. Srinivasan, M. Ruberg, G.I. Evan, Y. Agid, and E.C. Hirsch. 2000. Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:2875-2880.
- Hartmann, A., A. Mouatt-Prigent, M. Vila, N. Abbas, C. Perier, B.A. Faucheux, S. Vyas, and E.C. Hirsch. 2002. Increased Expression and Redistribution of the Antiapoptotic Molecule Bcl-xL in Parkinson's Disease. *Neurobiol. Dis.* 10:28-32.
- Hartmann, A., J.-D. Troadec, S. Hunot, K. Kikly, B.A. Faucheux, A. Mouatt-Prigent, M. Ruberg, Y. Agid, and E.C. Hirsch. 2001. Caspase-8 Is an Effector in Apoptotic Death of Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease, But Pathway Inhibition Results in Neuronal Necrosis. *J. Neurosci.* 21:2247-2255.
- Hasegawa, E., D. Kang, K. Sakamoto, A. Mitsumoto, T. Nagano, S. Minakami, and K. Takeshige. 1997. A Dual Effect of 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-Analogues on the Respiratory Chain of Bovine Heart Mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 337:69-74.
- Hasegawa, E., K. Takeshige, T. Oishi, Y. Murai, and S. Minakami. 1990. 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170:1049-1055.

- Heikkila, R.E., A. Hess, and R.C. Duvoisin. 1984. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. *Science*. 224:1451-1453.
- Heikkila, R.E., B.A. Sieber, L. Manzino, and P.K. Sonsalla. 1989. Some features of the nigrostriatal dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse. *Mol. Chem. Neuropathol.* 10:171-183.
- Hess, D.C., T. Abe, W.D. Hill, A.M. Studdard, J. Carothers, M. Masuya, P.A. Fleming, C.J. Drake, and M. Ogawa. 2004. Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Exp. Neurol.* 186:134-144.
- Hirsch, E.C. 2000. Glial cells and Parkinson's disease. *J. Neurol.* 247:II58-II62.
- Hoover, J.E., and P.L. Strick. 1993. Multiple output channels in the basal ganglia. *Science*. 259:819-821.
- Howells, D.W., M.J. Porritt, J.Y.F. Wong, P.E. Batchelor, R. Kalnins, A.J. Hughes, and G.A. Donnan. 2000. Reduced BDNF mRNA Expression in the Parkinson's Disease Substantia Nigra. *Exp. Neurol.* 166:127-135.
- Hughes, A.J., S.E. Daniel, and L.L. Kilford, A. J. 1992. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 55:181-184.
- Hunot, S., B. Brugg, D. Ricard, P.P. Michel, M.-P. Muriel, M. Ruberg, B.A. Faucheux, Y. Agid, and E.C. Hirsch. 1997. Nuclear translocation of NF-kappa B is increased in dopaminergic neurons of patients with Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:7531-7536.
- Hunot, S., N. Dugas, B. Faucheux, A. Hartmann, M. Tardieu, P. Debre, Y. Agid, B. Dugas, and E.C. Hirsch. 1999. Fcepsilon RII/CD23 Is Expressed in Parkinson's Disease and Induces, In Vitro, Production of Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor-alpha in Glial Cells. *J. Neurosci.* 19:3440-3447.
- Hwang, D.-Y., P. Ardayfio, U.J. Kang, E.V. Semina, and K.-S. Kim. 2003. Selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra of Pitx3-deficient aphakia mice. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 114:123-131.
- Hwang, D.-Y., S.M. Fleming, P. Ardayfio, T. Moran-Gates, H. Kim, F.I. Tarazi, M.-F. Chesselet, and K.-S. Kim. 2005. 3,4-Dihydroxyphenylalanine Reverses the Motor Deficits in Pitx3-Deficient Aphakia Mice: Behavioral Characterization of a Novel Genetic Model of Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* 25:2132-2137.
- Hyman, C., M. Hofer, Y.-A. Barde, M. Juhasz, G.D. Yancopoulos, S.P. Squinto, and R.M. Lindsay. 1991. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature*. 350:230-232.

- Hynes, M.A., K. Poulsen, M. Armanini, L. Berkemeier, H. Phillips, and A. Rosenthal. 1994. Neurotrophin-4/5 is a survival factor for embryonic midbrain dopaminergic neurons in enriched cultures. *J. Neurosci. Res.* 37:144-54.
- Javitch, J.A., and S.H. Snyder. 1984. Uptake of MPP(+) by dopamine neurons explains selectivity of parkinsonism-inducing neurotoxin, MPTP. *Eur. J. Pharmacol.* 106:455-456.
- Jeon, B.S., V. Jackson-Lewis, and R.E. Burke. 1995. 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration.* 4:131-7.
- Jonsson, G. 1980. Chemical Neurotoxins as Denervation Tools in Neurobiology. *Annu. Rev. Neurosci* 3:169-187.
- Kaur, C., A.-J. Hao, C.-H. Wu, and E.-A. Ling. 2001. Origin of microglia. *Microsc. Res. Tech.* 54:2-9.
- Kawamoto, Y., S. Nakamura, S. Nakano, N. Oka, I. Akiguchi, and J. Kimura. 1996. Immunohistochemical localization of brain-derived neurotrophic factor in adult rat brain. *Neuroscience.* 74:1209-1226.
- Klein, C., and M.G. Schlossmacher. 2007. Parkinson disease, 10 years after its genetic revolution: Multiple clues to a complex disorder. *Neurology.* 69:2093-2104.
- Knüsel, B., and F. Hefti. 1991. Trophic actions of IGF-I, IGF-II and insulin on cholinergic and dopaminergic brain neurons. *Adv. Exp. Med. Biol.* 293:351-60.
- Kohutnicka, M., E. Lewandowska, I. Kurkowska-Jastrzebska, A. Czlonkowski, and A. Czlonkowska. 1998. Microglial and astrocytic involvement in a murine model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Immunopharmacology.* 39:167-180.
- Kojima, J., Y. Yamaji, M. Matsumura, A. Nambu, M. Inase, H. Tokuno, M. Takada, and H. Imai. 1997. Excitotoxic lesions of the pedunculopontine tegmental nucleus produce contralateral hemiparkinsonism in the monkey. *Neurosci. Lett.* 226:111-114.
- Kontakos, N., and J. Stokes. 1999. Série de monographies sur les maladies liées au vieillissement : XII. Maladie de Parkinson — Percées récentes et nouvelles orientations. *Maladies chroniques au Canada, Direction générale de la protection de la santé, Santé Canada.* 20.
- Kordower, J.H., Y. Chu, R.A. Hauser, T.B. Freeman, and C.W. Olanow. 2008. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med.* 14:504-506.
- Kordower, J.H., M.E. Emborg, J. Bloch, S.Y. Ma, Y. Chu, L. Leventhal, J. McBride, E.-Y. Chen, S. Palfi, B.Z. Roitberg, W.D. Brown, J.E. Holden, R. Pyzalski, M.D. Taylor,

- P. Carvey, Z. Ling, D. Trono, P. Hantraye, N. Deglon, and P. Aebischer. 2000. Neurodegeneration Prevented by Lentiviral Vector Delivery of GDNF in Primate Models of Parkinson's Disease. *Science*. 290:767-773.
- Kordower, J.H., T.B. Freeman, B.J. Snow, F.J.G. Vingerhoets, E.J. Mufson, P.R. Sanberg, R.A. Hauser, D.A. Smith, G.M. Nauert, D.P. Perl, and C.W. Olanow. 1995. Neuropathological Evidence of Graft Survival and Striatal Reinnervation after the Transplantation of Fetal Mesencephalic Tissue in a Patient with Parkinson's Disease. *N Engl J Med*. 332:1118-1124.
- Krack, P., A. Batir, N. Van Blercom, S. Chabardes, V. Fraix, C. Ardouin, A. Koudsie, P.D. Limousin, A. Benazzouz, J.F. LeBas, A.-L. Benabid, and P. Pollak. 2003. Five-Year Follow-up of Bilateral Stimulation of the Subthalamic Nucleus in Advanced Parkinson's Disease. *N Engl J Med*. 349:1925-1934.
- Kriegelstein, K., C. Suter-Crazzolara, W.H. Fischer, and k. Unsicker. 1995. TGF-beta superfamily members promote survival of midbrain dopaminergic neurons and protect them against MPP+ toxicity. *EMBO J*. 14:736-742.
- Kumar, R., A.M. Lozano, E. Montgomery, and A.E. Lang. 1998. Pallidotomy and deep brain stimulation of the pallidum and subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *Mov. Disord.* suppl. 1:73-82.
- Kuppers, E., and C.C.A. Beyer. 2001. Dopamine regulates brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in cultured embryonic mouse striatal cells. *Neuroreport*. 12:1175-1179.
- Kurkowska-Jastrzebska, I., A. Wrońska, M. Kohutnicka, A. Członkowski, and A. Członkowska. 1999. MHC class II positive microglia and lymphocytic infiltration are present in the substantia nigra and striatum in mouse model of Parkinson's disease. *Acta Neurobiol Exp*. 59:1-8.
- Laflamme, N., H. Echchannaoui, R. Landmann, and S. Rivest. 2003. Cooperation between toll-like receptor 2 and 4 in the brain of mice challenged with cell wall components derived from gram-negative and gram-positive bacteria. *Eur. J. Immunol*. 33:1127-1138.
- Laflamme, N., and S. Rivest. 1999. Effects of Systemic Immunogenic Insults and Circulating Proinflammatory Cytokines on the Transcription of the Inhibitory Factor kBa Within Specific Cellular Populations of the Rat Brain. *J. Neurochem*. 73:309-321.
- Langston, J.W., P. Ballard, J.W. Tetrud, and I. Irwin. 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*. 219:979-980.
- Langston, J.W., I. Irwin, E.B. Langston, and L.S. Forno. 1984. 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+): identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. *Neurosci. Lett*. 48:87-92.

- Lawson, L.J., V.H. Perry, P. Dri, and S. Gordon. 1990. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*. 39:151-170.
- Lenz, F.A., J.L. Vitek, and M.R. DeLong. 1993. Role of the Thalamus in Parkinsonian Tremor: Evidence from Studies in Patients and Primate Models. *Stereotact Funct Neurosurg*. 60:94-103.
- Levivier, M., S. Przedborski, C. Bencsics, and U.J. Kang. 1995. Intrastratial implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J. Neurosci*. 15:7810-7820.
- Liberatore, G.T., V. Jackson-Lewis, S. Vukosavic, A.S. Mandir, M. Vila, W.G. McAuliffe, V.L. Dawson, T.M. Dawson, and S. Przedborski. 1999. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med*. 5:1403-1409.
- Limousin, P., P. Krack, P. Pollak, A. Benazzouz, C. Ardouin, D. Hoffmann, and A.-L. Benabid. 1998. Electrical Stimulation of the Subthalamic Nucleus in Advanced Parkinson's Disease. *N Engl J Med*. 339:1105-1111.
- Lin, L.F., D.H. Doherty, J.D. Lile, S. Bektesh, and F. Collins. 1993. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*. 260:1130-1132.
- Linazasoro, G. 2008. Potential applications of nanotechnologies to Parkinson's disease therapy. *Parkinsonism Relat. Disord*. 14:383-392.
- Lindvall, O., H. Widner, S. Rehncrona, P. Brundin, P. Odin, B. Gustavii, R. Frackowiak, K.L. Leenders, G. Sawle, and J.C. Rothwell. 1992. Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: one-year clinical and neurophysiological observations in two patients with putaminal implants. *Ann. Neurol*. 31:155-65.
- Liu, B., J. Daviau, C.N. Nichols, and D.S. Strayer. 2005a. In vivo gene transfer into rat bone marrow progenitor cells using rSV40 viral vectors. *Blood*. 106:2655-2662.
- Liu, B., and J.-S. Hong. 2003. Role of Microglia in Inflammation-Mediated Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Strategies for Therapeutic Intervention. *J Pharmacol Exp Ther*. 304:1-7.
- Liu, Q.-R., D. Walther, T. Drgon, O. Polesskaya, T.G. Lesnick, K.J. Strain, M. de Andrade, J.H. Bower, D.M. Maraganore, and G.R. Uhl. 2005b. Human brain derived neurotrophic factor (BDNF) genes, splicing patterns, and assessments of associations with substance abuse and Parkinson's Disease. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet*. 134B:93-103.

- Liu, Y., D. Peter, A. Roghani, S. Schuldiner, G.G. Prive, D. Eisenberg, N. Brecha, and R.H. Edwards. 1992. A cDNA that suppresses MPP⁺ toxicity encodes a vesicular amine transporter. *Cell*. 70:539-551.
- Lucidi-Phillipi, C.A., F.H. Gage, C.W. Shults, K.R. Jones, L.F. Reichardt, and U.J. Kang. 1995. Brain-derived neurotrophic factor-transduced fibroblasts: production of BDNF and effects of grafting to the adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* 354:361-76.
- Luthman, J., A. Fredriksson, E. Sundström, G. Jonsson, and T. Archer. 1989. Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behav. Brain Res.* 33:267-77.
- Martin-Iverson, M.T., K.G. Todd, and C.A. Altar. 1994. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 activate striatal dopamine and serotonin metabolism and related behaviors: interactions with amphetamine. *J. Neurosci.* 14:1262-1270.
- Martínez-Serrano, A., and A. Björklund. 1997. Immortalized neural progenitor cells for CNS gene transfer and repair. *Trends Neurosci.* 20:530-538.
- Massengale, M., A.J. Wagers, H. Vogel, and I.L. Weissman. 2005. Hematopoietic cells maintain hematopoietic fates upon entering the brain. *J. Exp. Med.* 201:1579-1589.
- McGeer, P.L., S. Itagaki, B.E. Boyes, and E.G. McGeer. 1988. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38:1285-91.
- Miller, W.C., and M.R. DeLong. 1988. Parkinsonian symptomatology. An anatomical and physiological analysis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 515:287-302.
- Mogi, M., M. Harada, T. Kondo, P. Riederer, H. Inagaki, M. Minami, and T. Nagatsu. 1994. Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci. Lett.* 180:147-50.
- Mogi, M., A. Togari, T. Kondo, Y. Mizuno, O. Komure, S. Kuno, H. Ichinose, and T. Nagatsu. 1999. Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 270:45-48.
- Moro, E., M. Scerrati, L.M.A. Romito, R. Roselli, P. Tonali, and A. Albanese. 1999. Chronic subthalamic nucleus stimulation reduces medication requirements in Parkinson's disease. *Neurology.* 53:85-.
- Morse, J.K., S.J. Wiegand, K. Anderson, Y. You, N. Cai, J. Carnahan, J. Miller, P.S. DiStefano, C.A. Altar, and R.M. Lindsay. 1993. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) prevents the degeneration of medial septal cholinergic neurons following fimbria transection. *J. Neurosci.* 13:4146-4156.

- Murer, M.G., F. Boissiere, Q. Yan, S. Hunot, J. Villares, B. Faucheux, Y. Agid, E. Hirsch, and R. Raisman-Vozari. 1999. An immunohistochemical study of the distribution of brain-derived neurotrophic factor in the adult human brain, with particular reference to Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 88:1015-1032.
- Muthane, U., K.A. Ramsay, H. Jiang, V. Jackson-Lewis, D. Donaldson, S. Fernando, M. Ferreira, and S. Przedborski. 1994. Differences in Nigral Neuron Number and Sensitivity to 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57/bl and CD-1 Mice. *Exp. Neurol*. 126:195-204.
- Nagata, K., N. Takei, K. Nakajima, H. Saito, and S. Kohsaka. 1993. Microglial conditioned medium promotes survival and development of cultured mesencephalic neurons from embryonic rat brain. *J. Neurosci. Res*. 34:357-63.
- Nagatsu, T., M. Mogi, H. Ichinose, and A. Togari. 2000. Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Supplementum*. 60:277-90.
- Nagatsu, T., and M. Sawada. 2005. Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines. *Curr. Pharm. Des*. 11:999-1016.
- Nahrendorf, M., F.K. Swirski, E. Aikawa, L. Stangenberg, T. Wurdinger, J.-L. Figueiredo, P. Libby, R. Weissleder, and M.J. Pittet. 2007. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med*. 204:3037-3047.
- Nakajima, K., K. Nagata, M. Hamanoue, N. Takemoto, and S. Kohsaka. 1993. Microglia-derived elastase produces a low-molecular-weight plasminogen that enhances neurite outgrowth in rat neocortical explant cult. *J. Neurochem*. 61:2155-63.
- Naldini, L., U. Blömer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F.H. Gage, I.M. Verma, and D. Trono. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. 272:263-7.
- Nunes, I., L.T. Tovmasian, R.M. Silva, R.E. Burke, and S.P. Goff. 2003. Pitx3 is required for development of substantia nigra dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 100:4245-4250.
- Okazawa, H., M. Murata, M. Watanabe, M. Kamei, and I. Kanazawa. 1992. Dopaminergic stimulation up-regulates the in vivo expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the striatum. *FEBS Lett*. 313:138-142.
- Olanow, C.W., C.G. Goetz, J.H. Kordower, A.J. Stoessl, V. Sossi, M.F. Brin, K.M. Shannon, G.M. Nauert, D.P. Perl, J. Godbold, and T.B. Freeman. 2003. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann. Neurol*. 54:403-414.
- Ono, K., T. Takii, K. Onozaki, M. Ikawa, M. Okabe, and M. Sawada. 1999. Migration of Exogenous Immature Hematopoietic Cells into Adult Mouse Brain Parenchyma

- under GFP-Expressing Bone Marrow Chimera. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262:610-614.
- Parain, K., M.G. Murer, Q. Yan, B. Faucheux, Y. Agid, E. Hirsch, and R. Raisman-Vozari. 1999. Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor protein in Parkinson's disease substantia nigra. *Neuroreport.* 10:557-61.
- Paré, D., R. Curro'Dossi, and M. Steriade. 1990. Neuronal basis of the parkinsonian resting tremor: A hypothesis and its implications for treatment. *Neuroscience.* 35:217-226.
- Park, C.-H., Y.-K. Minn, J.-Y. Lee, D.H. Choi, M.-Y. Chang, J.-W. Shim, J.-Y. Ko, H.-C. Koh, M.J. Kang, J.S. Kang, D.-J. Rhie, Y.-S. Lee, H. Son, S.Y. Moon, K.-S. Kim, and S.-H. Lee. 2005. In vitro and in vivo analyses of human embryonic stem cell-derived dopamine neurons. *J. Neurochem.* 92:1265-1276.
- Patapoutian, A., and L.F. Reichardt. 2001. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11:272-280.
- Paxinos, G., and K.B.J. Franklin. 2001. The mouse brain in stereotaxis coordinates. Academic Press, California.
- Peng, C., S. Fan, X. Li, X. Fan, M. Ming, Z. Sun, and W. Le. 2007. Overexpression of pitx3 upregulates expression of BDNF and GDNF in SH-SY5Y cells and primary ventral mesencephalic cultures. *FEBS Lett.* 581:1357-1361.
- Perlow, M.J., W.J. Freed, B.J. Hoffer, A. Seiger, L. Olson, and R.J. Wyatt. 1979. Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science.* 204:643-647.
- Petersen, A., K.E. Larsen, G.G. Behr, N. Romero, S. Przedborski, P. Brundin, and D. Sulzer. 2001. Brain-derived neurotrophic factor inhibits apoptosis and dopamine-induced free radical production in striatal neurons but does not prevent cell death. *Brain Res. Bull.* 56:331-335.
- Peterson, A.L., and J.G. Nutt. 2008. Treatment of Parkinson's Disease with Trophic Factors. *Neurotherapeutics.* 5:270-280.
- Petroske, E., G.E. Meredith, S. Callen, S. Totterdell, and Y.S. Lau. 2001. Mouse model of Parkinsonism: a comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment. *Neuroscience.* 106:589-601.
- Piccini, P., D.J. Brooks, A. Bjorklund, R.N. Gunn, P.M. Grasby, O. Rimoldi, P. Brundin, P. Hagell, S. Rehncrona, H. Widner, and O. Lindvall. 1999. Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci.* 2:1137-1140.

- Pollak, P., A.L. Benabid, C.L. Gervason, D. Hoffmann, E. Seigneuret, and J. Perret. 1993. Long-term effects of chronic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus in different types of tremor. *Adv Neurol.* 60:408-13.
- Porritt, M.J., P.E. Batchelor, and D.W. Howells. 2005. Inhibiting BDNF expression by antisense oligonucleotide infusion causes loss of nigral dopaminergic neurons. *Exp. Neurol.* 192:226-234.
- Price, K.S., I.J. Farley, and O. Hornykiewicz. 1978. Neurochemistry of Parkinson's disease: relation between striatal and limbic dopamine. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 19:293-300.
- Priller, J., A. Flugel, T. Wehner, M. Boentert, C.A. Haas, M. Prinz, F. Fernandez-Klett, K. Prass, I. Bechmann, B.A. de Boer, M. Frotscher, G.W. Kreutzberg, D.A. Persons, and U. Dirnagl. 2001. Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: Use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med.* 7:1356-1361.
- Przedborski, S., V. Jackson-Lewis, R. Yokoyama, T. Shibata, V.L. Dawson, and T.M. Dawson. 1996. Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:4565-4571.
- Purves, D., D. Fitzpatrick, S.M. William, O.J. McNamara, J.G. Augustine, C.L. Katz, and A.-S. LaMantia. 2001. Neuroscience, United-State.
- Rabchevsky, A.G., and Streit, W. J. . 1997. Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth. *J. Neurosci. Res.* 47:34-48.
- Rajput, A.H., B. Rozdilsky, and A. Rajput. 1991. Accuracy of clinical diagnosis in parkinsonism : a prospective study. *Can J Neurol Sci.* 18:275-278.
- Ramsay, R.R., J.I. Salach, and T.P. Singer. 1986. Uptake of the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) by mitochondria and its relation to the inhibition of the mitochondrial oxidation of NAD⁺-linked substrates by MPP+. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134:743-748.
- Rascol, O., C. Goetz, W. Koller, W. Poewe, and C. Sampaio. 2002. Treatment interventions for Parkinson's disease: an evidence based assessment. *The Lancet.* 359:1589-1598.
- Rezaie, P. 2003. Microglia in the Human Nervous System during Development. *Neuroembryology* 2:18-31.
- Rezaie, P., and D. Male. 2002. Mesoglia & microglia--a historical review of the concept of mononuclear phagocytes within the central nervous system. *J Hist Neurosci.* 11:325-74.

- Ricaurte, G.A., J.W. Langston, L.E. Delanney, I. Irwin, S.J. Peroutka, and L.S. Forno. 1986. Fate of nigrostriatal neurons in young mature mice given 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: a neurochemical and morphological reassessment. *Brain Res.* 376:117-24.
- Riccio, A., S. Ahn, C.M. Davenport, J.A. Blendy, and D.D. Ginty. 1999. Mediation by a CREB Family Transcription Factor of NGF-Dependent Survival of Sympathetic Neurons. *Science.* 286:2358-2361.
- Richard, K.L., M. Filali, P. Prefontaine, and S. Rivest. 2008. Toll-Like Receptor 2 Acts as a Natural Innate Immune Receptor to Clear Amyloid {beta}1-42 and Delay the Cognitive Decline in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* 28:5784-5793.
- Rodriguez, M., L. Alvarez-Erviti, F.J. Blesa, M.C. Rodríguez-Oroz, A. Arina, I. Melero, L.I. Ramos, and J.A. Obeso. 2007. Bone-marrow-derived cell differentiation into microglia: A study in a progressive mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 28:316-325.
- Samii, A., J.G. Nutt, and B.R. Ransom. 2004. Parkinson's disease. *The Lancet.* 363:1783-1793.
- Sauer, H., W. Fischer, G. Nikkhah, S.J. Wiegand, P. Brundin, R.M. Lindsay, and A. Björklund. 1993. Brain-derived neurotrophic factor enhances function rather than survival of intrastriatal dopamine cell-rich grafts. *Brain Res.* 626:37-44.
- Sawada, M., K. Imamura, and T. Nagatsu. 2008. Microglia Activation and Gene Expression of Cytokines in Parkinson's Disease. *In Advances in Alzheimer's and Parkinson's Disease.* 91-95.
- Schabitz, W.-R., C. Sommer, W. Zoder, M. Kiessling, M. Schwaninger, S. Schwab, and S.P. Finklestein. 2000. Intravenous Brain-Derived Neurotrophic Factor Reduces Infarct Size and Counterregulates Bax and Bcl-2 Expression After Temporary Focal Cerebral Ischemia Editorial Comment. *Stroke.* 31:2212-2217.
- Schapira, A., J. Cooper, D. Dexter, J. Clark, P. Jenner, and C. Marsden. 1990. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 54:823-7.
- Schinder, A.F., and M.-m. Poo. 2000. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 23:639-645.
- Seniuk, N.A., W.G. Tatton, and C.E. Greenwood. 1990. Dose-dependent destruction of the coeruleus-cortical and nigral-striatal projections by MPTP. *Brain Res Rev.* 527:7-20.
- Shults, C.W., T. Kimber, and C.A. Altar. 1995. BDNF attenuates the effects of intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroreport.* 6:1109-1112.

- Siegel, G.J., and N.B. Chauhan. 2000. Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Res Rev.* 33:199-227.
- Siliciano, J.D., J. Kajdas, D. Finzi, T.C. Quinn, K. Chadwick, J.B. Margolick, C. Kovacs, S.J. Gange, and R.F. Siliciano. 2003. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med.* 9:727-728.
- Simard, A.R., and S. Rivest. 2004a. Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *FASEB J.* 18:998-1000.
- Simard, A.R., and S. Rivest. 2006. Neuroprotective properties of the innate immune system and bone marrow stem cells in Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry.* 11:327-335.
- Simard, A.R., and S.C.A. Rivest. 2004b. Role of inflammation in the neurobiology of stem cells. *Neuroreport.* 15:2305-2310.
- Sinn, P.L., S.L. Sauter, and P.B. McCray, Jr. 2005. Gene Therapy Progress and Prospects: Development of improved lentiviral and retroviral vectors - design, biosafety, and production. *Gene Ther.* 12:1089-1098.
- Smidt, M.P., and J.P.H. Burbach. 2007. How to make a mesodiencephalic dopaminergic neuron. *Nat Rev Neurosci.* 8:21-32.
- Smidt, M.P., S.M. Smits, H. Bouwmeester, F.P.T. Hamers, A.J.A. van der Linden, A.J.C.G.M. Hellemons, J. Graw, and J.P.H. Burbach. 2004. Early developmental failure of substantia nigra dopamine neurons in mice lacking the homeodomain gene Pitx3. *Development.* 131:1145-1155.
- Smidt, M.P., S.M. Smits, and J.P.H. Burbach. 2003. Molecular mechanisms underlying midbrain dopamine neuron development and function. *Eur. J. Pharmacol.* 480:75-88.
- Smits, S.M., J.P.H. Burbach, and M.P. Smidt. 2006. Developmental origin and fate of meso-diencephalic dopamine neurons. *Prog. Neurobiol.* 78:1-16.
- Soulet, D., and S. Rivest. 2008. Bone-marrow-derived microglia: myth or reality? *Curr Opin Pharmacol.* 8:1-11.
- Squire, L.R., F.E. Bloom, S.K. McConnell, J.L. Roberts, N.C. Spitzer, and M. Zigmond. 2003. *Fundamental Neuroscience.* Academic Press, San Diego. 1426 pp.
- Streit, W.J. 2001. Microglia and macrophages in the developing CNS. *Neurotoxicology.* 22:619-24.
- Streit, W.J., S.A. Walter, and N.A. Pennell. 1999. Reactive microgliosis. *Progress in Neurobiology.* 57:563-581.

- Studer, L., C. Spenger, R.W. Seiler, C.A. Altar, R.M. Lindsay, and C. Hyman. 1995. Comparison of the effects of the neurotrophins on the morphological structure of dopaminergic neurons in cultures of rat substantia nigra. *Eur. J. Neurosci.* 7:223-233.
- Tapia-Arancibia, L., F. Rage, L. Givalois, and S. Arancibia. 2004. Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Front Neuroendocrinol.* 25:77-107.
- Teismann, P., and J.B. Schulz. 2004. Cellular pathology of Parkinson's disease: astrocytes, microglia and inflammation. *Cell Tissue Res.* 318:149-161.
- Thibeault, I., N. Laflamme, and S. Rivest. 2001. Regulation of the gene encoding the monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in the mouse and rat brain in response to circulating LPS and proinflammatory cytokines. *J. Comp. Neurol.* 434:461-477.
- Thobois, S., P. Mertens, M. Guenot, M. Hermier, H. Mollion, M. Bouvard, G. Chazot, E. Broussolle, and M. Sindou. 2002. Subthalamic nucleus stimulation in Parkinson's disease. *J. Neurol.* 249:529-534.
- Toda, T., Y. Momose, M. Murata, G. Tamiya, M. Yamamoto, N. Hattori, and H. Inoko. 2003. Toward identification of susceptibility genes for sporadic Parkinson's disease. *J. Neurol.* 250:iii40-iii43.
- Tsukahara, T.M.D., M.M.D. Takeda, S.M.D. Shimohama, O.P.D. Ohara, and N.M.D. Hashimoto. 1995. Effects of Brain-derived Neurotrophic Factor on 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in Monkeys. *Neurosurgery.* 37:733-741.
- Tuszynski, M.H. 2003. Gene therapy for neurological disease. *Expert Opin Biol Ther.* 3:815-828.
- Uhl, G.R., J.C. Hedreen, and D.L. Price. 1985. Parkinson's disease: loss of neurons from the ventral tegmental area contralateral to therapeutic surgical lesions. *Neurology* 35:1215-8.
- Vallieres, L., and P.E. Sawchenko. 2003. Bone Marrow-Derived Cells that Populate the Adult Mouse Brain Preserve Their Hematopoietic Identity. *J. Neurosci.* 23:5197-5207.
- van den Munckhof, P., K.C. Luk, L. Ste-Marie, J. Montgomery, P.J. Blanchet, A.F. Sadikot, and J. Drouin. 2003. Pitx3 is required for motor activity and for survival of a subset of midbrain dopaminergic neurons. *Development.* 130:2535-2542.
- Varastet, M., D. Riche, M. Maziere, and P. Hantraye. 1994. Chronic MPTP treatment reproduces in baboons the differential vulnerability of mesencephalic dopaminergic neurons observed in parkinson's disease. *Neuroscience.* 63:47-56.

- Vila, M.a., V.a. Jackson-Lewis, C.a. Guegan, D.a. Chu Wu, P.a. Teismann, D.-K.a. Choi, K.a. Tieu, and S.a.b. Przedborski. 2001. The role of glial cells in Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurol.* 14:483-489.
- Vingerhoets, F.J.G., J.G. Villemure, P. Temperli, C. Pollo, E. Pralong, and J. Ghika. 2002. Subthalamic DBS replaces levodopa in Parkinson's disease: Two-year follow-up. *Neurology.* 58:396-401.
- Viswanath, V., Y. Wu, R. Boonplueang, S. Chen, F.F. Stevenson, F. Yantiri, L. Yang, M.F. Beal, and J.K. Andersen. 2001. Caspase-9 Activation Results in Downstream Caspase-8 Activation and Bid Cleavage in 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Induced Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* 21:9519-9528.
- von Bohlen und Halbach, O., L. Minichiello, and K. Unsicker. 2005. Haploinsufficiency for trkB and trkC receptors induces cell loss and accumulation of alpha-synuclein in the substantia nigra. *FASEB J.* 19:05-3845fje.
- Vyas, I., R.E. Heikkila, and W.J. Nicklas. 1986. Studies on the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: inhibition of NAD-linked substrate oxidation by its metabolite, 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J. Neurochem.* 46:1501-1507.
- Wetmore, C., Y. Cao, R.F. Pettersson, and L. Olson. 1991. Brain-Derived Neurotrophic Factor: Subcellular Compartmentalization and Interneuronal Transfer as Visualized with Anti-Peptide Antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:9843-9847.
- Wichmann, T., and M.R. DeLong. 1993. Pathophysiology of parkinsonian motor abnormalities. *Adv. Neurol.* 60:53-61.
- Wichmann, T., and M.R. DeLong. 1996. Functional and pathophysiological models of the basal ganglia. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6:751-758.
- Wolfgang, J.S. 2002. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia.* 40:133-139.
- Wu, D.C., V. Jackson-Lewis, M. Vila, K. Tieu, P. Teismann, C. Vadseth, D.-K. Choi, H. Ischiropoulos, and S. Przedborski. 2002. Blockade of Microglial Activation Is Neuroprotective in the 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine Mouse Model of Parkinson Disease. *J. Neurosci.* 22:1763-1771.
- Xia, Y., and J.L. Zweier. 1997. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:6954-6958.
- Yahr, M.D., R.C. Duvoisin, M.J. Schear, R.E. Barrett, and M.M. Hoehn. 1969. Treatment of parkinsonism with levodopa. *Arch. Neurol.* 21:343-54.
- Yan, Q., M.J. Radeke, C.R. Matheson, J. Talvenheimo, A.A. Welcher, and S.C. Felstein. 1997. Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat. *J. Comp. Neurol.* 378:135-157.

- Youdim, M.B.H., D. Edmondson, and K.F. Tipton. 2006. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci.* 7:295-309.
- Ziegler-Heitbrock, L. 2007. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol.* 81:584-592.