

MARIE-EVE TREMBLAY

**POTENTIEL NEUROPROTECTEUR DE LA CYSTAMINE CHEZ UN MODÈLE
DE SOURIS PARKINSONIENNE**

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

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

Mai 2007

RÉSUMÉ

La maladie de Parkinson est caractérisée par une dégénérescence des cellules dopaminergiques, laquelle est soupçonnée d'être, en partie, l'aboutissement de phénomènes d'oxydation. Des traitements véhiculés par des anti-oxydants pourraient donc avoir des effets neuroprotecteurs sur cette population neuronale. Nous avons exploré cette hypothèse par l'intermédiaire de la cystamine - un anti-oxydant aux propriétés neuroprotectrices chez un modèle animal de la maladie de Huntington - chez des souris parkinsoniennes générées par la toxine 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP), une molécule qui reproduit la plupart des symptômes parkinsoniens. Nous avons ici soumis des souris âgées de 16 mois à un traitement de 10 ou 50 mg/kg/jour de cystamine commençant 2 jours avant (pré-traitement) ou pendant (traitement) les injections de MPTP et se poursuivant durant 14 jours. Les résultats obtenus ont démontré que le pré-traitement d'une faible dose de cystamine (10 mg/kg) permet de protéger, de façon significative, le système dopaminergique. Ces travaux suggèrent que la cystamine possède des propriétés neuroprotectrices chez un modèle animal de la maladie de Parkinson.

AVANT-PROPOS

Tout au long de ma maîtrise, j'ai été entourée de personnes extraordinaires qui m'ont permis de réaliser mes travaux dans une ambiance de travail très agréable.

J'aimerais particulièrement remercier ma directrice de recherche, Dre Francesca Cicchetti, qui m'a donné la chance incroyable de faire partie de son équipe et d'avoir un projet de grande envergure. Je lui dis également merci pour sa patience, son écoute, son support et sa disponibilité pour répondre à mes questions et pour chercher avec moi des solutions à mes problèmes. Son savoir et sa détermination sont des qualités inestimables. De plus, je lui suis très reconnaissante de m'avoir donné l'opportunité de partager mes résultats au congrès de l'« European Behavioural Pharmacology Society » qui a eu lieu à Cracovie, en Pologne, au début du mois de septembre 2006. Cette expérience fut des plus enrichissantes et des plus motivantes.

L'ambiance du laboratoire fut des plus agréable grâce à mes collègues Martine Saint-Pierre (assistante de recherche) et Janelle Drouin-Ouellet (étudiante à la maîtrise). Leurs diverses connaissances et expériences dans le domaine m'ont permis d'apprendre énormément.

Je remercie également les Dr Claude Rouillard et Dr Daniel Lévesque ainsi que leur équipe de laboratoire (François Gilbert, Emmanuelle Bourhis et Jérôme Maheux) qui, à de nombreuses reprises, ont répondu à mes questions. De plus, je tiens à remercier ces deux chercheurs en tant que membres de mon jury de mémoire.

Aussi, j'aimerais remercier deux personnes qui ont quitté le laboratoire, Antoine Roberge-Tremblay et Mathieu Lafontaine-Lacasse, qui ont su apporter beaucoup d'humour dans ce domaine difficile et souvent décourageant.

Finalement, je veux particulièrement remercier mon copain Anton ainsi que ma famille pour leurs encouragements et leur support tout au long de ma maîtrise.

Ce mémoire est présenté à la Faculté des Études Supérieures de l'Université Laval pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc) sous forme d'un article scientifique. Celui-ci a été publié en Juin 2006 par le journal *Neurobiology of Aging* (facteur d'impact de 5.5). En tant que première auteur, je suis l'instigatrice des expériences effectuées ainsi que des analyses statistiques. J'ai aussi participé à la première ébauche de ce manuscrit. Je suis également deuxième auteure de l'article scientifique « Temporal effects of paraquat/maneb on microglial activation and dopamine neuronal loss in older rats » publié par *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. J'ai complété les manipulations ainsi que les analyses statistiques de cette étude. Celui-ci n'est, par contre, pas présenté dans le cadre de ce mémoire.

TABLES DES MATIÈRES

	Page
<i>Résumé</i>	ii
<i>Avant-propos</i>	iii
<i>Table des matières</i>	iv
<i>Liste des abréviations</i>	vi
<i>Liste des figures et tableaux</i>	viii
 PRÉAMBULE	 1
 CHAPITRE 1	
INTRODUCTION GÉNÉRALE	2
1.1 La motricité chez un individu sain.....	2
1.1.1 Organisation anatomique.....	2
1.1.2 Organisation fonctionnelle.....	3
1.1.2.1 Voie directe facilitatrice.....	3
1.1.2.2 Voie indirecte inhibitrice.....	3
1.1.3 La voie nigrostriée.....	4
1.2 La maladie de Parkinson.....	7
1.2.1 Aspect clinique.....	7
1.2.2 Aspect fonctionnel.....	7
1.2.3 Aspect pathologique.....	8
1.2.4 Le stress oxydatif : une implication possible dans la neurodégénérescence.....	11
1.2.4.1 La mitochondrie.....	11
1.2.4.2 Les systèmes antioxydants.....	12
1.3 Le modèle MPTP : une représentation du stress oxydatif dans la maladie de Parkinson.....	14
1.3.1 Modèle classique.....	15
1.3.2 Modèle chronique	15
1.4 Traitements.....	19
1.4.1 Thérapies par médication.....	19
1.4.2 Thérapies chirurgicales.....	19
1.4.3 Thérapies réparatrices.....	21
1.4.4 Thérapies neuroprotectrices : la cystamine.....	22
1.4.4.1 L'anti-oxydant GSH.....	23
1.4.4.2 La transglutaminase (Tgase).....	23
1.4.4.3 L'expression de BDNF.....	24
1.5 Problématique de recherche.....	28
1.6 Présentation.....	28

CHAPITRE 2	
NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF CYSTAMINE IN AGED PARKINSONIAN MICE.....	29
2.1	Résumé.....30
2.2	Abstract.....31
2.3	Introduction.....32
2.4	Materials and methods.....33
2.4.1	Animals and MPTP lesion.....33
2.4.2	Cystamine treatment.....34
2.4.3	Post-mortem histological evaluation.....34
2.4.4	Fluoro-Jade coloration and DAPI.....36
2.4.5	In situ hybridation.....36
2.4.6	Densitometric measurements of striatal TH fibers.....38
2.4.7	Stereological counts of TH neuronal loss and DAT expressing neurons.....38
2.4.8	Densitometric measurements of Nurr1 and DAT levels in the SNpc.....39
2.5	Results.....40
2.5.1	Health-related effects of cystamine.....40
2.5.2	Histological confirmation of neural protection.....40
2.5.3	Investigation of cell protection mechanisms.....41
2.6	Discussion.....41
CHAPITRE 3	
3.1	Discussion.....53
3.1.1	L'aspect pathologique.....53
3.1.2	L'aspect comportemental.....54
3.1.3	L'âge des souris.....55
3.1.4	Comment expliquer l'efficacité d'une faible dose en pré-traitement ?.....55
3.1.5	Comparaison des effets de la cystamine dans la maladie de Huntington et de Parkinson.....56
3.2	Perspectives futures.....57
3.3	Conclusion générale.....58
BIBLIOGRAPHIE.....	60

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AIF	Facteurs induisant l'apoptose (apoptosis inducing factors)
α - syn	Alpha-synucléine
BDNF	Facteur neurotrophique dérivé du cerveau (Brain Derived Neurotrophic Factor)
BHE	Barrière hémato-encéphalique
DA	Dopamine
DAergique	Dopaminergique
DAT	Transporteur de la dopamine
DBS	Stimulation à haute fréquence (Deep brain stimulation)
DYN	Dynorphine
ENK	Enképhaline
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GLU	Glutamate
GPe	Globus pallidus externe
Gpi	Globus pallidus interne
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione disulfide
HSJ1b	Protéine de choc thermique 1b contenant de l'AdnJ (Heat shock DNA-J-containing protein 1b)
ip	Intrapéritonéal
L-dopa	Levodopa
MAO-B	Monoamine oxydase B
MPTP	1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
MPP+	1-méthyl-4-phénylpyridinium
NA	Noyau accumbens
NC	Noyau caudé
NM	Neuromélanine
NST	Noyau sous-thalamique
PUT	Putamen

ROS	Dérivés actifs oxygénés
SN	Substantia nigra (substance noire)
pc	Pars compacta (pars compacte)
pr	Pars réticulata (pars réticulée)
SOD	Superoxide dismutase
SP	Substance P
STR	Striatum
Tgase	Transglutaminase
TH	Tyrosine hydroxylase
VTA	Aire ventrale tegmentaire (ventreal tegmental area)

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

	Page
FIGURE 1.1 Schématisation anatomique et organisationnelle des ganglions de la base.....	6
FIGURE 1.2 Schématisation des principales caractéristiques neuropathologiques de la maladie de Parkinson.....	10
FIGURE 1.3 Schématisation de l'action de la molécule de MPTP dans le cerveau.....	18
FIGURE 1.4 Mécanismes putatifs de la cystamine.....	27
FIGURE 2.1 Time line and experimentation.....	46
FIGURE 2.2 Neuroprotection of the DA system by low dose cystamine pre-treatment..	48
FIGURE 2.3 Neuroprotection of nigral Nurr1 levels by low dose cystamine pre-treatment.....	50
FIGURE 2.4 Neuroprotection of nigral DAT expressing cells by low dose cystamine pre-treatment.....	52

PRÉAMBULE

La maladie de Parkinson est un désordre neurodégénératif progressif affectant plus de 1% de la population âgée de plus de 60 ans (Tanner, 1992). Les causes exactes de cette maladie demeurent encore ambiguës. Bien qu'une faible proportion des cas soit héréditaire et reliée à une mutation de la protéine alpha-synucléine (α -syn) ou parkin, la cause de plus de 90% des cas reste jusqu'à ce jour inconnue. Une plus grande prévalence de cette maladie en milieu agricole laisse croire que les toxines environnementales sont largement impliquées dans la genèse du Parkinson. Des expositions à l'eau de puits (Di Monte et coll., 2002), aux pesticides (paraquat), aux herbicides et aux fongicides (Gorell et coll., 1998) sont toutes soupçonnées d'être impliquées dans l'induction de la maladie.

Puisque les causes de la maladie de Parkinson sont en grande partie inconnues, il est difficile de cibler et de développer des traitements efficaces; aucun des traitements actuels n'est d'ailleurs curatif. De nos jours, deux types de thérapie sont applicables selon l'état du patient et le choix de l'intervenant. Elles sont de types médicamenteuse (ex : levodopa (L-dopa)) ou chirurgicale (stimulation à haute fréquence (DBS)). Jusqu'à présent, elles ont pour effet de cibler les symptômes de la maladie sans toutefois ralentir son évolution.

Sur le plan expérimental, les études actuelles visent deux approches distinctes. L'une fait appel à la neuroprotection et a pour but d'agir dès le diagnostic de la maladie. La deuxième est de type réparatrice et est principalement conçue pour les patients affichant des stades avancés de la maladie.

Dans la thématique de développement de stratégies thérapeutiques pour la maladie de Parkinson de notre laboratoire, nous avons ici axé nos recherches sur un composé soupçonné de posséder des propriétés neuroprotectrices chez des modèles animaux atteints de d'autres désordres neurodégénératifs. Les résultats de cette étude vous seront présentés au chapitre 2 de ce mémoire. En introduction à ces données expérimentales, je présenterai d'abord les principes de base essentiels à la compréhension de cette étude.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 Motricité chez l'individu normal

1.1.1 Organisation anatomique

Le cortex moteur est le siège du contrôle du mouvement volontaire normal. La commande motrice se fait en étroite collaboration avec une région enfouie profondément sous le cortex et identifiée par les termes de ganglions de la base. Ces deux composantes forment alors une circuiterie neuronale fermée appelée la boucle cortico-ganglion de la base-thalamo-corticale. Les ganglions de la base comprennent : 1) le striatum (STR), constitué du noyau caudé (NC) et du putamen (PUT); 2) le pallidum, formé du globus pallidus externe (GPe), interne (GPi) et d'un segment ventral; 3) le noyau sous-thalamique (NST) et 4) la substance noire composée de la pars compacta (SNpc) et de la pars réticulata (SNpr) (Parent et Hazrati, 1995a).

Le STR est la cible majeure des afférences corticales : le PUT reçoit des informations du cortex sensori-moteur, le NC des aires associatives temporo-pariéto-occipitales et le noyau acumbens (NA) du cortex limbique. Le STR constitue ainsi la porte d'entrée des ganglions de la base. Les neurones striataux sont majoritairement (90%) de projections GABAergiques eux-mêmes ségrégués en deux populations distinctes de proportions présumées équivalentes, soient les neurones GABAergiques exprimant la substance P/dynorphine (SP/DYN) et le récepteur dopaminergique (DAergique) de type 1 (D1), et d'autres exprimant l'enképhaline (ENK) et le récepteur D2. Ces deux types de neurones donnent lieu à une organisation en deux boucles parallèles : la voie directe facilitatrice, favorisant le mouvement, et la voie indirecte inhibitrice, inhibant le mouvement (Parent et Cicchetti, 1997; Parent et coll., 2000). La voie directe est constituée de projections émergeant du STR et convergeant vers le GPi et la SNpr (structure de sortie des ganglions de la base) qui font synapse avec les neurones du thalamus. Quant à la voie indirecte, elle

est composée des afférences striatales projetant sur le GPe, qui, à son tour, fait un relais avec le NST. Les neurones de ce dernier se rendent au GPi et à la SNr pour aboutir dans le thalamus. Enfin, il y a projection des neurones excitateurs du thalamus vers le cortex où il y a libération de glutamate (GLU). Il y a ainsi fermeture de la boucle donnant lieu à des mouvements normaux et contrôlés. Tous les neurones impliqués dans ces deux voies utilisent le GABA comme neurotransmetteur inhibiteur, sauf ceux du NST, qui libèrent le GLU (voir Figure 1.1).

1.1.2 Organisation fonctionnelle

1.1.2.1 Voie directe facilitatrice (voir Figure 1.1a)

Au repos, les neurones du GPi et de la SNpr exercent une inhibition soutenue sur les neurones thalamo-corticaux, empêchant ainsi toutes décharges neuronales erronées d'être traitées. Par contre, lorsqu'un mouvement moteur est préparé, les projections striatales GABAergiques inhibent le GPi et la SNpr et lèvent ainsi l'inhibition qu'exercent ces structures sur le thalamus. Il y a excitation du cortex et le mouvement planifié peut alors être exécuté (voir revue par Parent et Hazrati, 1995a).

1.1.2.2 Voie indirecte inhibitrice (voir Figure 1.1a)

Normalement, les afférences striatales GABAergiques atteignent et inhibent de façon tempérée les neurones du GPe, qui à leur tour inhibent le NST. Les neurones excitateurs du NST font par la suite synapse avec les neurones GABAergiques du GPi et de la SNpr; ces neurones vont ainsi inhiber le thalamus. Lors de l'initiation d'une action motrice, l'inhibition des neurones GABAergiques striataux active le GPe et désinhibe le STN. Ce dernier peut ainsi exciter le GPi et la SNr qui inhiberont le thalamus et le cortex. L'effet global se traduit par une diminution de l'activité corticale (voir revue par Parent et Hazrati, 1995a).

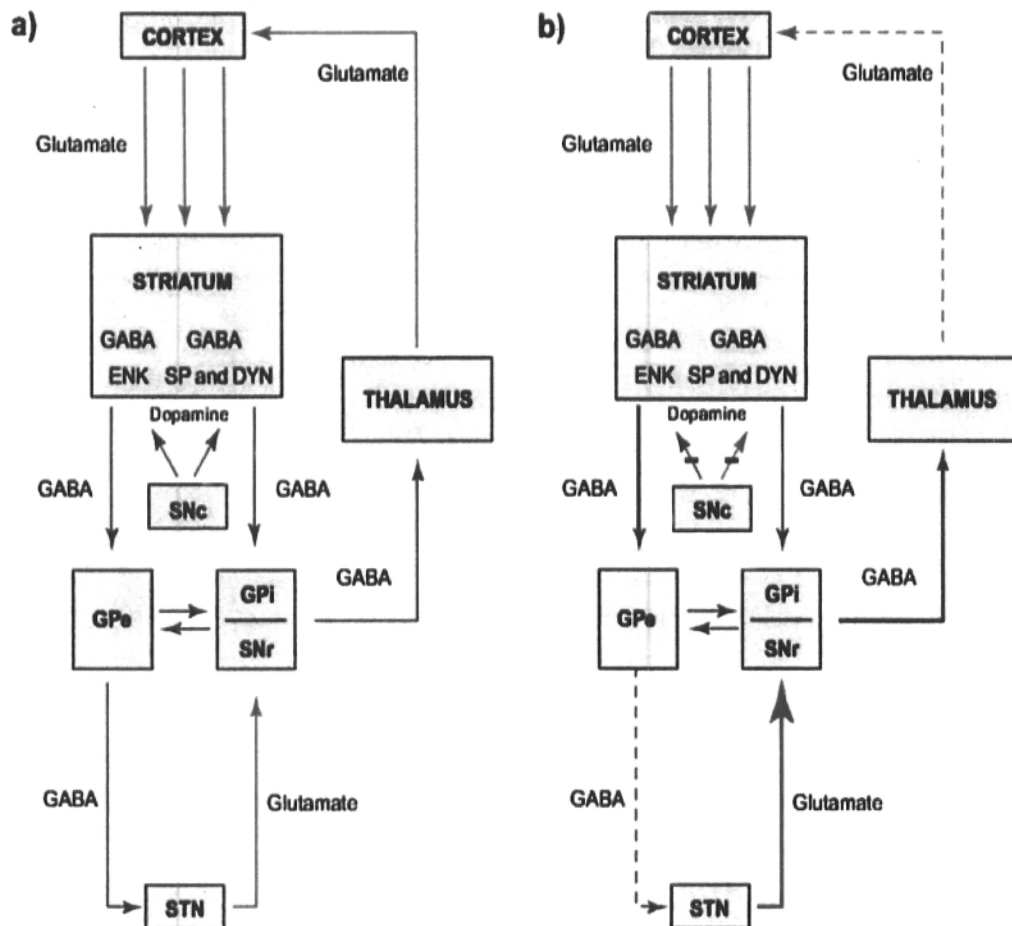
1.1.3 La voie nigrostriée

Le STR reçoit aussi des afférences importantes de la SNpc ventrale, connu sous l'appellation de voie nigro-striée. La DA, neurotransmetteur des neurones de la SNpc, joue un rôle important dans la régulation de la relâche du GLU dans le STR. En effet, elle inhibe fortement les neurones striataux GABA/ENK (voie indirecte) via les récepteurs DAergiques de type D2 et active modérément les neurones GABA/SP (voie directe) par l'intermédiaire des récepteurs de type D1 (voir revue par Parent et Hazrati, 1995a) (voir Figure 1.1a).

FIGURE 1.1 :

Schématisation anatomique et organisationnelle des ganglions de la base.

A) Chez un individu normal, les neurones du STR donne lieu à deux voies distinctes et intactes, soient directe et indirecte, responsables du contrôle des mouvements via leur action sur le thalamus qui projette à son tour au cortex. B) Chez un patient atteint de la maladie de Parkinson, la diminution de DA (en pointillé) entraîne une forte inhibition des neurones du GPe provoquant alors l'hyperactivité du NST. Les neurones du GPi et du SNpr sont surexcités inhibant ainsi le thalamus. Le cortex moteur ne reçoit donc plus d'informations excitatrices ce qui engendre l'apparition de mouvements incontrôlés.



Tiré de Parent et coll., TINS 2000

1.2 La maladie de Parkinson

1.2.1 Aspect clinique

La maladie de Parkinson touche plus de 4 000 000 de personnes dans le monde, dont environ 400 000 nouveaux diagnostics chaque année mondialement. Au Canada, on compte actuellement 100 000 individus atteints de la maladie (Société Parkinson du Québec, 2002). La grande majorité des cas de Parkinson répertoriés sont de causes inconnues et dits idiopathiques alors qu'environ 5% seraient liés à des mutations génétiques sur des protéines tels qu' α -syn ou parkin (Dauer et Przedborski, 2003). Les premiers symptômes cliniques qui constituent le stade primaire de la maladie sont les tremblements au repos, la pauvreté de mouvement (hypokinésie) et la rigidité. Dans les stades avancés, ces deux derniers font place à l'absence de mouvement (akinésie). Aussi, des troubles cognitifs (démences) accompagnent parfois les lacunes motrices qui caractérisent la maladie (Birmayer et coll., 1983).

1.2.2 Aspect fonctionnel

La maladie de Parkinson est caractérisée par une dégénérescence des neurones DAergiques de la SNpc. Cette perte entraîne une diminution de la relâche de DA dans la structure cible de la SNpc, le STR, créant ainsi un déséquilibre entre les voies directe et indirecte (voir Figures 1.1 et 1.2). Normalement, la DA inhibe les neurones striataux impliqués dans la voie indirecte. Une déplétion de ce neurotransmetteur soulève donc cette inhibition striatale et provoque une plus grande inhibition des neurones du GPe. Ainsi, ces derniers ne peuvent plus effectuer leur inhibition sur le NST. Celui-ci devient hyperactif, ce qui cause une surexcitation des neurones du GPi et de SNpr qui eux sont GABAergiques. À leur tour, ils inhibent fortement les neurones excitateurs du thalamus. L'activation thalamique étant inhibée, le cortex moteur ne reçoit plus de signal excitateur se traduisant soit par une difficulté à initier le mouvement et/ou par la genèse de mouvements imprécis et incontrôlés (voir Figure 1.1b) (Parent et Hazrati, 1995a; Parent et coll., 2000).

1.2.3 Aspect pathologique

Mise à part la dégénérescence DAergique marquée, les patients parkinsoniens affichent également, au niveau du cerveau, la présence d'agrégats protéiques appelés corps de Lewy. Ceux-ci sont définis comme étant des inclusions éosinophiles rondes présentes en grande quantité dans le soma et les neurites des neurones nigraux (Lotharius et Brundin, 2002). Elles résultent de mutations dans les gènes codant pour les protéines α -syn et parkin.

La protéine α -syn joue un rôle dans le recyclage des vésicules synaptiques ainsi que dans la transmission DAergique. Lorsqu'une mutation se produit dans le gène codant pour l' α -syn, la structure de cette protéine se retrouve abîmée et forme ultérieurement des enchevêtrements de protéines dont la précipitation forme les corps de Lewy (voir Figure 1.2). Le mécanisme exact par lequel les agrégats d' α -syn se forment dans la maladie de Parkinson demeure incompris (Recchia et coll., 2004).

La parkin est une ubiquitine ligase qui cible les protéines pour la dégradation. Une mutation dans le gène codant pour cette protéine est relativement commune dans la forme familiale de maladie de Parkinson. Ce type de mutation est retrouvé dans 50% des cas de la maladie (Moore et coll., 2005).

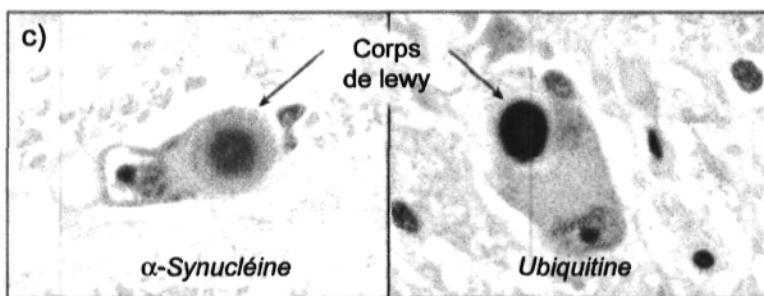
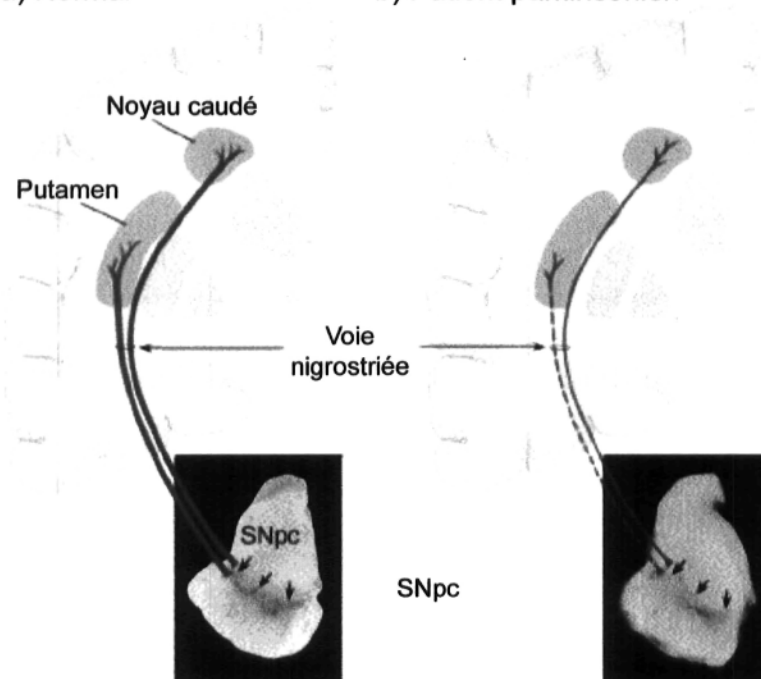
Les protéines parkin et α -syn sont donc intimement reliées en une voie biochimique commune qui pourrait contribuer à la biogenèse des corps de Lewy, et ainsi jouer un rôle important dans la pathogenèse de la maladie de Parkinson (Spillantini et coll., 1997; Baba et coll., 1998). Pour le moment, il reste encore incertain si l'apparition des inclusions neuronales est une cause ou une conséquence de la dégénérescence neuronale associée à la maladie (Rajagopalan et Andersen, 2001; Kirik et coll., 2002; Manning-Bog et coll., 2002).

FIGURE 1.2 :**Schématisation des principales caractéristiques neuropathologiques de la maladie de Parkinson.**

A) Schéma de la voie nigrostriée chez un individu normal où les apports en DA au STR fournissent un niveau normal du neurotransmetteur. B) La voie nigrostriée chez un individu parkinsonien, quant à elle, affiche un déséquilibre en DA suite à une dégénérescence significative des neurones DAergiques de la SNpc. Ce phénomène produit un diminution des niveaux de DA traduit par des troubles moteurs. C) Les inclusions neuronales présentes dans la maladie de Parkinson et appelées « Corps de Lewy » sont une caractéristique neuropathologique importante de la maladie. Elles se composent principalement des protéines ubiquitine et α -syn, lesquelles forment des agrégats par le travail d'une enzyme appelée tissue transglutaminase.

a) Normal

b) Patient parkinsonien



Tiré de Dauer et Przedborski, Neuron 2003

1.2.4 Le stress oxydatif : une implication possible dans la neurodégénérescence

Le stress oxydatif est un phénomène anormal durant lequel les cellules ou tissus de notre organisme doivent faire face à un flux accru de dérivés actifs oxygénés (ROS), comprenant les ions oxygènes, les radicaux libres (superoxydes, radicaux hydroxyl) et les peroxydes. Dans les circonstances quotidiennes normales, des ROS sont produits continuellement en faible quantité comme des médiateurs tissulaires ou des résidus de réaction énergétiques ou de défense. Dans ces conditions, les défenses antioxydantes sont capables de détruire les ROS produits pour maintenir leur flux cellulaire à des niveaux normaux pour ainsi créer un équilibre entre la balance antioxydants/prooxydants. Quand cet équilibre est perturbé, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction de radicaux libres, il y a apparition du stress oxydatif (Djordjevic, 2004).

Les concepts actuels de la pathologie de la maladie de Parkinson focalisent sur la formation de ROS et sur l'apparition du stress oxydatif menant à un dommage de la SNpc. Des études post-mortem ont rapporté des évidences de l'implication du stress oxydatif dans la pathogenèse de la maladie. Les fonctions mitochondriales et les systèmes antioxydants pourraient jouer un rôle dans la neurodégénérescence de la maladie (Jenner, 1993; Jenner et Olanow, 1998; Zhang, 1999).

1.2.4.1 La mitochondrie

La chaîne mitochondriale de transport d'électrons consiste en cinq enzymes multimériques, soient les complexes I à V. Ce système de phosphorylation oxydative joue un rôle prépondérant dans les voies métaboliques qui sont primordiales à la survie (génération de ROS et d'ATP par la phosphorylation oxydative) et la mort cellulaire (apoptose).

Des mutations de l'ADN mitochondrial, soit génétiques ou acquises (toxines), mènent à une atteinte à la chaîne de transport d'électrons, le plus souvent au niveau du complexe I. Cela a pour conséquence de diminuer la production d'ATP et d'augmenter la formation de ROS. Ces derniers peuvent alors causer de sérieux dommages mitochondriaux en réagissant

avec les acides nucléiques, les lipides et les protéines des mitochondries. Une des cibles de ces espèces réactives est la chaîne de transport d'électrons elle-même (Cohen, 2000) menant à des dommages mitochondriaux et à une plus grande production de ROS. Le stress oxydatif engendré provoque une transition dans la perméabilité de la mitochondrie libérant ainsi des facteurs pro-apoptotiques tels que le cytochrome c et l'«apoptosis inducing factors» (AIF). Ceux-ci activent la chaîne de caspases entraînant alors l'apoptose.

Plusieurs études ont identifié des anomalies dans le complexe I mitochondrial des patients parkinsoniens (Bindoff et coll., 1991; Mann et coll., 1992; Greenamyre et coll., 2001). En effet, une diminution de 35% de l'activité du complexe I est observée chez des personnes atteintes de la maladie de Parkinson (Schapira, 2000). Cette baisse n'est pas seulement observée dans le cerveau (Schapira, 2000), mais aussi dans les plaquettes des patients parkinsoniens (Parker et coll., 1989) ainsi que dans les cellules cybrides, lignée cellulaire modifiée pour contenir des mitochondries dérivées des plaquettes chez ces patients (Swerdlow et coll., 1996). Cette dernière observation suggère que le déficit en complexe I provient d'une altération au niveau du génome mitochondrial soit par hérédité ou suite à une toxicité systémique. Jusqu'à ce jour, aucune mutation de l'ADN mitochondrial n'a été encore identifiée chez les personnes atteintes de la maladie de Parkinson.

1.2.4.2 Les systèmes antioxydants

Les systèmes d'antioxydants sont composés principalement de la glutathione (GSH) et de la superoxyde dismutase (SOD).

La GSH joue un rôle important dans le cerveau humain en éliminant les oxydants formés par le métabolisme cellulaire normal tel que l'utilisation de l'oxygène par la mitochondrie. Il a été démontré que la diminution de sa disponibilité dans le cerveau mène à un dommage mitochondrial (Jain et coll., 1991). Par conséquent, la GSH semble être un important antioxydant requis pour la survie de nombreux types cellulaires incluant les neurones (Ratan et coll., 1994). Lorsque des cellules sont exposées à un haut niveau de stress oxydatif, la GSH est modifiée en glutathione disulfide (GSSG) par l'enzyme GSH peroxydase. Le ratio

GSH/GSSG diminue suite à l'accumulation de GSSG. Ainsi, la mesure des niveaux de GSSG ou de la détermination du ratio GSH/GSSG est un indicateur de stress oxydatif (Yang et coll., 2006).

La maladie de Parkinson chez les humains est caractérisée par une diminution des niveaux de GSH et de GSSG totaux dans la SNpc, sans atteinte des autres régions du cerveau (Perry et coll., 1986; Sofic et coll., 1992; Sian et coll., 1994a; Sian et coll., 1994b; Pearce et coll., 1997). La GSH est ainsi un des indicateurs biochimiques bien connus de la dégénérescence nigrale qui apparaît bien avant la perte mesurable de l'activité du complexe I mitochondrial ou des neurones DAergiques striataux (Perry et coll., 1986; Sian et coll., 1994b). Une injection de GSH chez un petit groupe de patients parkinsoniens non-traités sur une période de plus d'un mois a permis une amélioration significative de leur motricité, suggérant que la diminution précoce des niveaux de GSH pourrait être une cible thérapeutique pour la maladie (Perry et coll., 1986; Sechi et coll., 1996; Fitzmaurice et coll., 2003).

La SOD, quant à elle, est une enzyme qui catalyse la dissociation de l'ion superoxyde (O_2^-) de l'eau (H_2O) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ainsi, sa présence protège les cellules des dommages que pourraient causer les radicaux libres. Dans la maladie de Parkinson, elle serait plus spécifiquement impliquée dans la formation des inclusions neuronales (Kim et coll., 2002).

La nature des radicaux libres responsables de la mort neuronale dans la maladie de Parkinson reste encore inconnue, mais les radicaux hydroxyl (OH^\cdot), les peroxydinitrites ($ONOO^\cdot$) et les oxydes nitriques (NO^\cdot) sont soupçonnés d'être impliqués dans la neurodégénérescence. Ceux-ci sont formés au cours de la réduction métabolique incomplète de l'oxygène (O_2) en eau (H_2O). Tous ces dérivés actifs peuvent interagir avec des composés cellulaires, tels que des protéines, des lipides et de l'ADN. Par exemple, l'oxydation d'acides gras peut mener à la formation de peroxydes lipidiques et ainsi troubler la membrane plasmique et les membranes cellulaires de certains organelles, tels que les mitochondries. L'hypothèse sur la nature des radicaux libres impliqués dans le

Parkinson repose ainsi sur l'observation de niveaux élevés de marqueurs de peroxydation lipidique ainsi que de nitration protéique dans la SNpc et les corps de Lewy chez des patients parkinsoniens (Andersen, 2004).

1.3 Le modèle MPTP : une représentation du stress oxydatif dans la maladie de Parkinson

La molécule de 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) a été découverte dans les années 70 alors que de jeunes héroïnomanes présentaient des symptômes semblables à la maladie de Parkinson suite à l'injection intraveineuse de ce composé (Davis et coll., 1979; Langston et coll, 1983; Lang et Blair, 1984).

Le MPTP est un composé hautement lipophile qui traverse aisément la barrière hémato-encéphalique (BHE). Une fois dans le cerveau, la toxine est transformée en 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP+) par les cellules gliales suite à l'action de la monoamine oxydase B (MAO-B), une enzyme impliquée dans la dégradation des catécholamines (Beal, 2001). Une fois chargé le MPP+ se lie efficacement au transporteur membranaire de la dopamine (DAT) et étouffe littéralement la cellule en inhibant le complexe I de la chaîne respiratoire des mitochondries ce qui engendre la production de ROS (voir Figure 1.3). Il a d'ailleurs été démontré que des souris transgéniques (C57BL/129s Vj, hétérozygote [DAT +/-] et homozygote [DAT -/-]), dépourvus de ce transporteur, sont protégées contre la toxicité du MPTP (Bezard et coll., 1999). En plus de ce mécanisme d'action, le MPTP lui-même produit des ROS par oxydation enzymatique ou non-enzymatique des catécholamines provoquant alors un stress oxydatif et une neurotoxicité au cerveau (Wong et coll., 1999). Il est à noter que le rat ne possède pas l'enzyme MAO nécessaire pour transformer le MPTP en MPP+ et ne peut donc pas être affecté par cette toxine (Willoughby et coll., 1988) contrairement au singe et à la souris, chez qui la molécule de MPTP est toxique.

1.3.1 Modèle classique

Le modèle classique consiste en des injections systémiques intrapéritonéales (ip) de MPTP. Plus spécifiquement, nous utilisons un régime de 7 injections ip de MPTP (20 mg/kg) données durant cinq jours, soient deux fois par jour les deux premiers jours et une fois par jour les trois jours subséquents (Costantini et coll., 2001). Ce dosage engendre une dégénérescence plus lente et spécifique des neurones DAergiques de la SN et une diminution significative des fibres DAergiques du STR, tels qu'observé dans la pathologie. Ce modèle est couramment utilisé chez le singe puisque cet animal, du en grande partie à ses propriétés bipèdes, présente la plupart des symptômes comportementaux associés au Parkinson (akinésie, rigidité, tremblements), en plus de provoquer les mêmes caractéristiques neuropathologiques. Il permet aussi d'étudier les dyskinésies induites suite à l'administration du précurseur direct de la DA, la L-dopa (Moratalla et coll., 1992; Varastet et coll., 1994).

Les souris traitées au MPTP peuvent, quant à elles, parfois montrer une diminution de la tyrosine hydroxylase (TH), enzyme responsable de la conversion de l'acide aminé L-tyrosine en DOPA (précurseur de la DA), plutôt qu'une mort des neurones DAergiques, puisque après un certain temps, une récupération des facultés motrices peut être observée. Mais l'utilisation de souris C57bL/6, plus vulnérable au MPTP, combinée à un régime de dose de 5 jours assure une perte de neurones DAergiques irréversible (Muthane et coll., 1994). Toutefois, ce modèle a aussi ses limites : il ne permet pas d'observer de façon constante les inclusions neuronales, une caractéristique pathologique importante de la maladie humaine (Forno et coll., 1993).

1.3.2 Modèle chronique

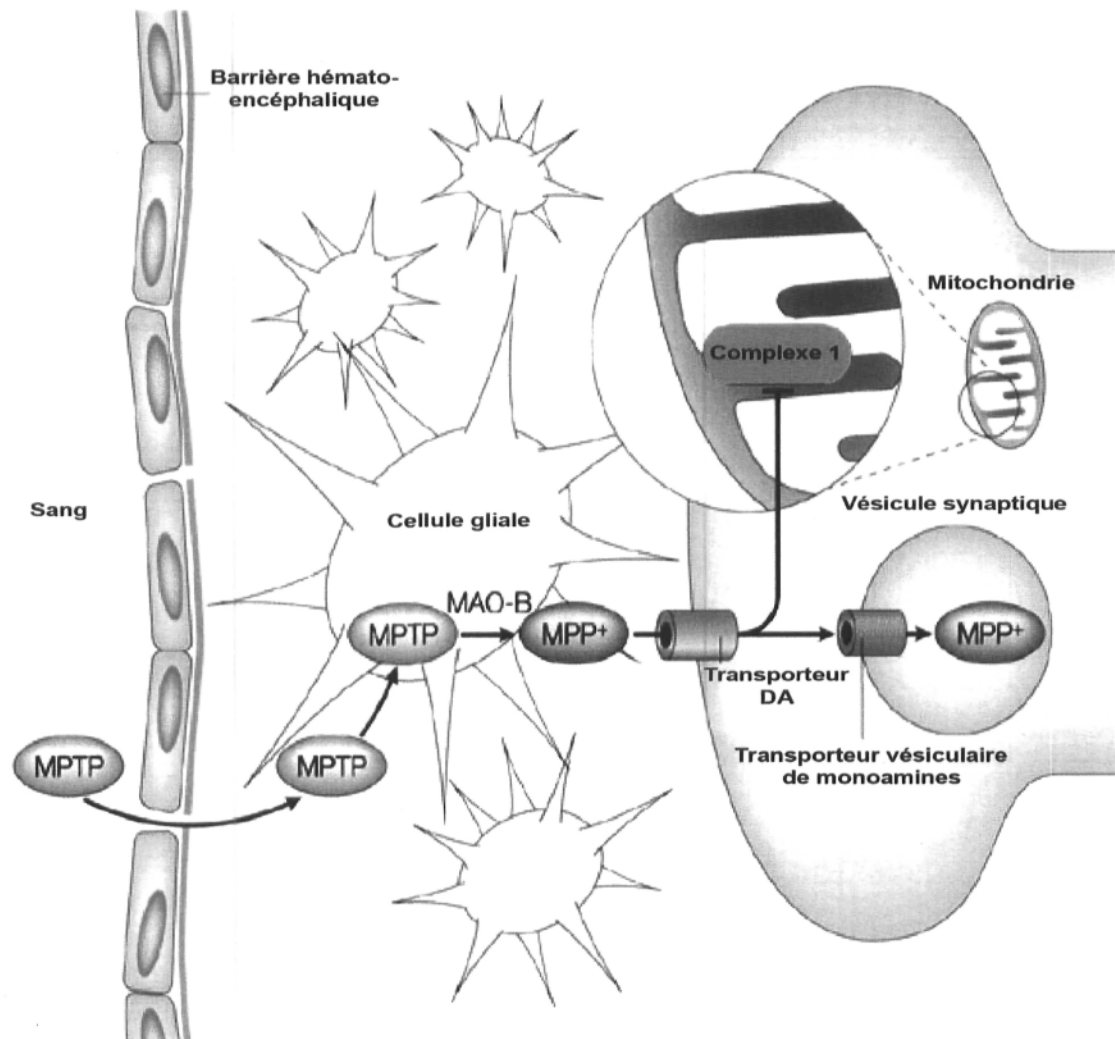
Le modèle chronique a été élaboré par Fornai en 2005 (Fornai et coll., 2005). Il consiste en l'insertion ip d'une pompe osmotique chez des souris. La pompe libère de façon constante

30 mg/kg/jour pendant environ 28 jours (tout dépendamment du type de pompe utilisé, c'est-à-dire la durée de vie de la pompe). Ainsi, ce nouveau modèle semble engendrer une injure soutenue ciblant les neurones DAergiques et provoquant ainsi une dégénérescence permanente. L'administration continue de MPTP produit également des changements progressifs de comportements et l'apparition d'inclusions neuronales. Ces résultats suggèrent donc que l'exposition continue au MPTP chez des souris recrée les caractéristiques du Parkinson d'une manière dépendante de la formation des inclusions neuronales. Ce modèle semble proposer une évolution plus fidèle et plus semblable à celle de la maladie.

FIGURE 1.3 :

Schématisation de l'action de la molécule de MPTP dans le cerveau

La neurotoxine MPTP est utilisée pour induire une dégénérescence du système DAergique. Avec une injection ip, le MPTP traverse rapidement la barrière hémato-encéphalique et est métabolisé en MPP^+ , composé toxique actif, par l'enzyme MAO-B des cellules gliales. Puis, le MPP^+ pénètre dans la cellule DAergique via le DAT. Une fois à l'intérieur du neurone, ce composé altère la chaîne respiratoire mitochondriale en inhibant le complexe I de la chaîne de transport d'électrons. L'inhibition du complexe I entraîne une augmentation de la production de radicaux libres, provoquant alors un stress oxydatif et l'activation de la voie moléculaire de la mort cellulaire programmée.



Tiré de Vila et Przedborski, Neuroscience 2003

1.4 Traitements

1.4.1 Thérapies par médication

Plusieurs thérapies sont actuellement à l'essai ou en développement afin de guérir, ou du moins, contrôler les symptômes de la maladie de Parkinson tout en ralentissant le processus neurodégénératif qui caractérise cette maladie. La première thérapie habituellement appliquée par les médecins à la suite d'un diagnostic positif est la thérapie médicamenteuse. Celle-ci vise à ramener le niveau de DA de la SNpc et le STR à la normale. Le principal médicament faisant partie de cette catégorie est un précurseur de la DA, la L-dopa (Lawrence et coll., 2003). La L-dopa, contrairement à la DA elle-même, passe la BHE, et peut dès lors subir une décarboxylation pour devenir de la DA (Pardridge, 2005). De plus, elle est souvent administrée avec un inhibiteur de la DA décarboxylase (ex. carbidopa), qui réduit le métabolisme périphérique de la L-dopa et permet d'employer une dose plus faible. On y ajoute également un inhibiteur de la MAO (ex. sélégiline) pour inhiber sélectivement le métabolisme cérébral de la DA. Le traitement par L-dopa améliore la condition du patient parkinsonien durant les premières années, mais plusieurs années de traitement laissent souvent place à des effets secondaires importants tels que des dyskinésies et des problèmes neuropsychiatriques (Olanow et Jankovic, 2005; Mercuri et Bernardi, 2005; Balàs et coll., 2006). Dans la même catégorie de médicaments que la L-dopa, on retrouve les agonistes des récepteurs DAergiques, comme la bromocriptine et le pramipexole, qui eux aussi tendent à augmenter le taux de DA dans la voie nigrostriée.

1.4.2 Thérapies chirurgicales

Les premières chirurgies pour la maladie de Parkinson, apparues dans le milieu des années 60, sont la thalamotomie (lésion du thalamus) et la pallidotomie (lésion du GP) (Sanchez Juan, 1958; Phillips, 1961). La thalamotomie supprime les tremblements et contribue à augmenter et à améliorer l'agilité ainsi que les mouvements fins des mains. En plus d'améliorer les symptômes parkinsoniens fondamentaux, la pallidotomie, quant à elle,

améliore la pronation, la supination, l'agilité des mains et des doigts et le mouvement des bras; la dextérité générale s'en retrouve donc partiellement rétablie (Balàs et coll, 2006).

Au début des années 90, ce fut la lésion du NST qui vu le jour. Se basant sur le fait que le NST est hyperactif dans la maladie de Parkinson, H. Bergman (Bergman et coll., 1990) a démontré que ce genre de lésion chez le singe rendu parkinsonien par le MPTP induisait une amélioration des troubles moteurs. Par contre, cette méthode était très invasive et a été abandonnée pour une technique réversible : la stimulation à haute fréquence (DBS) du NST.

Le DBS est un autre type de chirurgie, plus efficace et plus sécuritaire. Plusieurs sites peuvent être soumis à cette chirurgie, mais la cible la plus commune est le NST. Elle consiste en l'insertion d'une électrode dans une zone spécifique du cerveau, le NST, qui est relié à un stimulateur continu de haute fréquence installé au niveau du thorax. Cette approche a été appliquée pour la première fois en 1993 chez des singes traités au MPTP, puis transférée avec succès chez les humains par Limousin P. et coll. en 1995 (Limousin et coll., 1995).

À court terme, la stimulation sous-thalamique à haute fréquence améliore grandement l'ensemble des signes majeurs de la maladie de Parkinson, soit la rigidité, la bradykinésie et le tremblement (Temperli et coll., 2003; Limousin et coll., 1998). Cette amélioration de la fonction motrice permet une diminution de la médication anti-parkinsonienne telle que la prise quotidienne de L-dopa (Vingerhoets et coll., 2002; Moro et coll., 1999).

À long terme (5 ans), les effets sur le tremblement et la rigidité sont toujours observables. Par contre, les troubles axiaux, la dysarthrie et la bradykinésie tendent à progresser. En plus des effets moteurs négatifs, il y a apparition d'effets thymiques et comportementaux chez certains individus (dépression, apathie, manies, troubles anxieux, psychose/hallucinations) (Anderson et Mullins, 2003).

1.4.3 Thérapies réparatrices

Les thérapies réparatrices visent l'amélioration de l'état du patient en remplaçant la population de cellules endommagées. Ceci implique que ces nouvelles cellules survivent, établissent des synapses fonctionnelles et s'intègrent dans les tissus de l'hôte pour ainsi exécuter les fonctions perdues conséquemment à la maladie (Levy et coll., 2004). Dans la maladie de Parkinson, le but de la transplantation cellulaire est bien sûr de rétablir les niveaux de DA striatale (Redmond, 2002). Plusieurs approches ont été expérimentées, dont la transplantation de cellules fœtales humaines dérivées de la partie ventrale du mésencéphale, structure renfermant une forte concentration de neurones DAergiques (Lidvall, 2003).

La transplantation de cellules foetales s'est avérée très prometteuse au niveau clinique vers le milieu des années 80, mais l'enthousiasme a éventuellement fait place à la déception à la suite des résultats négatifs obtenus lors d'un essai clinique placebo à double insu (Correia et coll., 2005). Les études cliniques qui ont suivi, utilisant différentes méthodes de transplantation, ont donné lieu à une survie de greffes et des résultats trop variables, ce qui a eu pour effet de freiner l'ardeur avec laquelle la recherche dans ce domaine avait débuté (Redmond, 2002). Quelques 20 années plus tard, certains problèmes critiques doivent encore être résolus avant d'obtenir une thérapie acceptable à l'échelle clinique. En effet, la transplantation de cellules d'origine embryogénique humaine amène des questionnements éthiques quant à l'utilisation de fœtus humain, ainsi que des problèmes d'accessibilité et de manque de standardisation du matériel cellulaire.

C'est en raison de toutes ces limitations qu'a surgi la nécessité de développer un autre type de thérapie cellulaire basé sur l'utilisation de cellules non-humaines, la xénotransplantation (greffe dans laquelle le donneur et l'hôte proviennent de deux espèces différentes) (Schumacher et Isacson, 1997). En effet, la xénotransplantation contourne les principaux problèmes éthiques, puisque les cellules transplantées proviennent de fœtus animal. De plus, l'accès à ce type de cellules est plus facile et les réserves, abondantes. Pour le

moment, l'étude de la possibilité d'avoir recours à la xéno greffe dans l'optique de traiter les patients parkinsoniens demeure au stade expérimental, car le rejet de greffe demeure un obstacle difficile à surmonter (Cicchetti et coll., 2003).

L'utilisation de cellules souches pluripotentes, soient des cellules aptes à former tous les tissus de l'organisme, s'avère une option intéressante pour remédier aux problèmes que la greffe foetale peut apporter. Les études sur ce sujet ont débuté par des cellules souches pluripotentes de souris, puis plus récemment avec des cellules souches humaines; présentement, plusieurs groupes travaillent sur le développement de protocoles pour la génération de progéniteurs cellulaires DAergiques qui pourraient avoir un potentiel clinique dans le traitement de la maladie de Parkinson.

1.4.4 Thérapies neuroprotectrices : la cystamine

Les thérapies neuroprotectrices visent l'utilisation d'agents qui préviennent la dégénérescence des neurones DAergiques de la SNpc et qui ralentissent ainsi l'évolution de la maladie. Ce concept de neuroprotection s'est popularisé au milieu des années 80 avec la molécule de sélégiline (deprenyl) qui avait pour effet de protéger les neurones des dommages que pouvaient engendrer les radicaux libres et les neurotoxines exogènes (Prethuis et Hajba, 1983). C'est ainsi qu'a pris naissance cet engouement pour les anti-oxydants et leur pouvoir de neuroprotection face au stress oxydatif. Depuis, de nombreuses molécules ont été pressenties pour leur effet anti-oxydant dans la maladie de Parkinson (LeWitt, 2006), dont la cystamine, faisant l'objet de mes recherches.

La cystamine est une molécule qui fut utilisée pour la première fois en 1955 pour ses effets radioprotecteurs (Ramioul, 1955). C'est en 1979 qu'on lui associa des propriétés anti-oxydantes (Kovarova et Pulpanova, 1979). En 2002, Karpuj et son équipe furent les premiers à observer les effets neuroprotecteurs de la cystamine chez un modèle de souris souffrant de la maladie de Huntington, une maladie neurodégénérative se traduisant par des troubles moteurs (Karpuj et coll., 2002). Plus tard, ces observations furent corroborées et

enrichies par Wang, en collaboration avec notre laboratoire, en rapportant que l'administration de cystamine chez des souris atteintes de la maladie de Huntington avaient pour effet de diminuer leurs mouvements anormaux, de diminuer leur perte de poids et de prolonger leur durée de vie (Wang et coll., 2005). Les mécanismes possibles pouvant expliquer cette neuroprotection restent encore ambiguës. Trois mécanismes ont été proposés (voir Figure 1.4) :

1.4.4.1 L'anti-oxydant GSH

Un des métabolites de la cystamine est la L-cystéine, une protéine anti-oxydante en soi. La L-cystéine s'avère être un précurseur majeur de la GSH, un anti-oxydant naturel tel que mentionné précédemment. Ainsi, l'administration de cystamine augmenterait les niveaux de la L-cystéine dans le cerveau qui accroîtrait subséquentement la synthèse de la GSH (Lesort et coll., 2003; Fox et coll., 2004; Pinto et coll., 2005). Le ratio GSH/GSSG serait alors renversé et permettrait une neuroprotection des cellules de la SNpc face aux radicaux libres.

1.4.4.2 La transglutaminase (Tgase)

La Tgase est une enzyme thiol-dépendante qui catalyse la formation de liens γ -glutamyl isopeptide entre la polyglutamine dérivée de la protéine huntingtine et des protéines contenant de la lysine (Greenberg et coll., 1991). Dans la maladie de Huntington, il y a mutation du gène chargée de la synthèse de la protéine huntingtine causant alors l'agrégation de celle-ci. Le rôle pathologique de la Tgase dans la maladie de Huntington est soutenue par les résultats obtenus à la suite de la délétion génétique de Tgase chez des souris R6/2 qui entraîna des dysfonctions moteurs et la mort (Mastroberardino et al., 2002; Bailey et Johnson, 2006). En inhibant la Tgase, la cystamine prévient la formation d'agrégats protéiques γ -glutamyl-L-lysine insolubles (ou inclusions neuronales) en compétitionnant avec la huntingtine pour le site actif de la Tgase et empêche ainsi l'évolution de la maladie. Dans la maladie de Parkinson, la protéine α -syn est une des principales composantes des inclusions neuronales. Le mécanisme proposé pour cette maladie est une compétition entre la cystamine et la protéine α -syn pour le site actif de la

Tgase qui empêcherait alors la formation d'inclusions neuronales et protégerait les neurones contre la dégénérescence, tel que suggéré dans la maladie de Huntington (Wang et coll., 2005).

1.4.4.3 L'expression de BDNF

Le « Brain Derived Neurotrophic Factor » (BDNF) appartient à la famille des neurotrophines présent au niveau du cerveau. Ce facteur pourrait jouer un rôle important dans la neuroprotection des neurones DAergiques dans la maladie de Parkinson (Fumagalli et coll., 2006). Les évidences de ce rôle spécifique sont les suivantes: 1) il y a l'expression de BDNF dans les neurones dopaminergiques du mésencéphale (SNpc et l'aire ventrale tegmentaire (VTA)) (Seroogy et coll., 1994), 2) l'inhibition de l'expression de BDNF par un oligonucléotide anti-sens mène à une perte de neurones DAergiques (Porritt et coll., 2005), 3) le BDNF est requis pour établir adéquatement le nombre de neurones DAergiques dans la SN (Baquet et coll., 2005) et 4) la délétion partielle du récepteur trkB à haute affinité pour le BDNF mène à la réduction du nombre de neurones DAergiques, à une diminution de l'expression de TH et la formation marquée de dépôts d' α -syn chez des souris âgées (von Bohlen und et coll., 2005). Le rôle du BDNF est d'autant plus évident puisque la greffe de fibroblastes surexprimant BDNF prévient la perte des corps cellulaires DAergiques de la voie nigro-striée par l'injection intracrânienne de 6-hydroxydopamine (6-OHDA), une toxine qui engendre la production de radicaux libres dans le milieu immédiat du site d'injection et ainsi la mort neuronale (Levivier et coll., 1995). L'implantation supranigrale de fibroblastes génétiquement modifiées pour sécréter du BDNF atténue également la perte de neurones DAergiques dans la SNpc associée à l'infusion striatale de MPP+ chez des rats adultes (Galpern et coll., 1996).

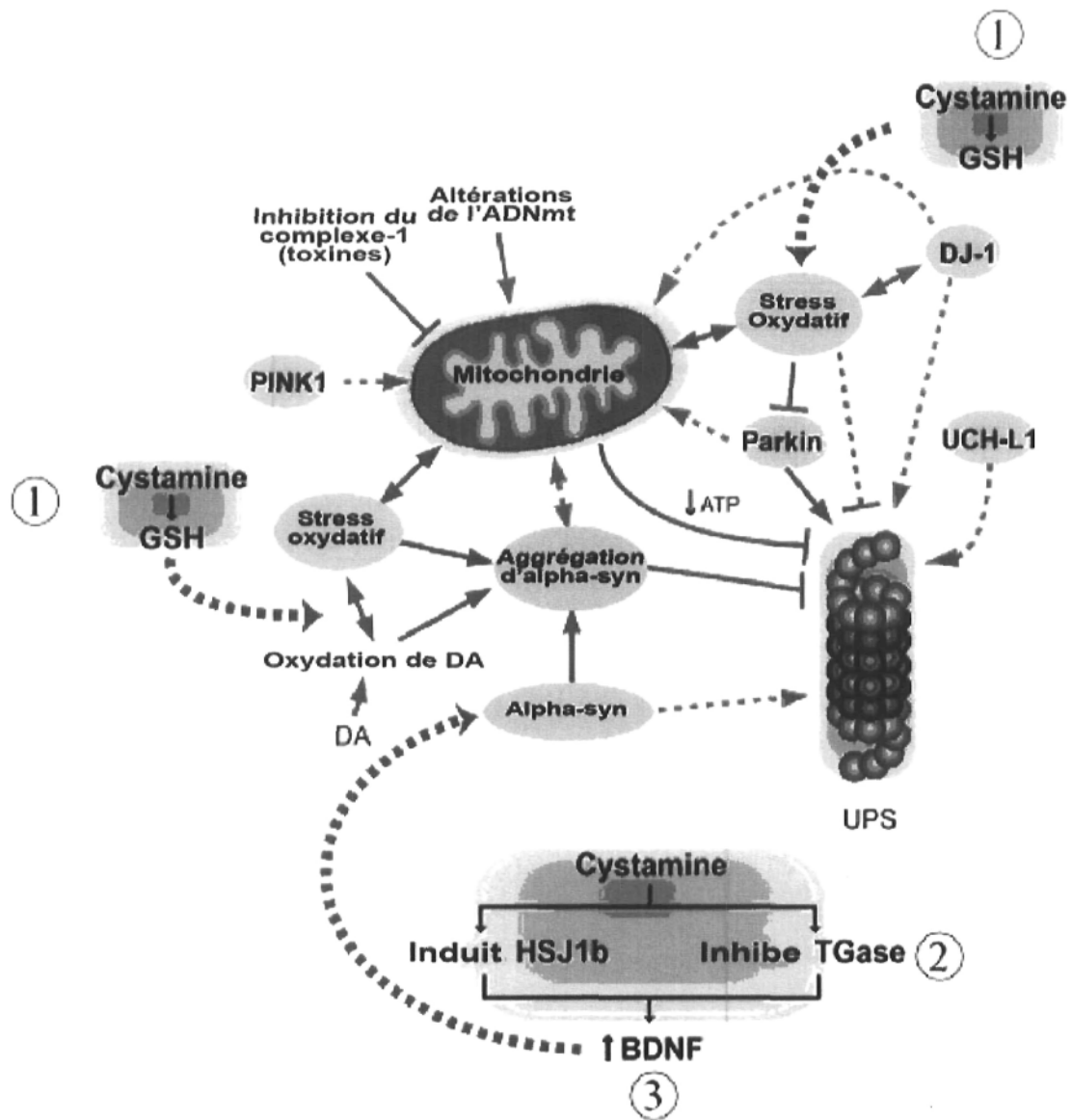
Le mécanisme proposé de la cystamine est une diminution de la mort neuronale et une réduction des symptômes chez un modèle de souris huntingtonienne par une augmentation des niveaux de BDNF dans le cerveau via l'augmentation de l'expression de la « heat shock DNA-J-containing protein 1b » (HSJ1b), molécule jouant un rôle dans la dégradation des agrégats protéiques anormaux, et via l'inhibition de la Tgase (Borrelli-Pages et coll., 2006).

D'autres mécanismes sont potentiellement impliqués dans les fonctions neuroprotectrices de la cystamine, mais j'ai choisi de me concentrer sur les plus plausibles et ceux pour lesquels il y a déjà des évidences dans la littérature.

FIGURE 1.4 :

Mécanismes putatifs de la cystamine

Les mécanismes d'action des effets neuroprotecteurs de la cystamine sont en encadrés bleus. Ainsi, l'administration de cystamine augmenterait le niveau de synthèse de la molécule anti-oxydant GSH (1). Aussi, la cystamine aurait pour effet d'inhiber la Tgase (2), enzyme responsable de l'apparition des agrégats α -syn. Enfin, la cystamine augmenterait les niveaux de BDNF (3), un facteur neurotrophique important dans le maintien de la survie des neurones DAergiques, via l'augmentation de l'expression de HSN1b et l'inhibition de la Tgase, prévenant ainsi la formation d'agrégats protéiques.



1.5 Problématique de recherche

En l'absence de traitements capable d'agir sur l'évolution de la maladie de Parkinson, il devient fondamental d'étudier de nouvelles approches thérapeutiques. Dans la thématique générale du laboratoire, qui vise le développement de stratégies thérapeutiques, nous avons ciblé l'aspect de neuroprotection en testant le potentiel neuroprotecteur de la cystamine chez des souris âgées parkinsoniennes. Les résultats présentés ici portent sur des analyses histologiques post-mortem.

1.6 Présentation

Le mode de présentation utilisé pour ce mémoire est celui de l'article de recherche. Celui-ci a été publié en juin 2006 dans le « Neurobiology of Aging » et il constitue le deuxième chapitre de ce manuscrit. La version originale anglaise a été conservée.

CHAPITRE 2

Tremblay ME, Saint-Pierre M, Bourhis E, Lévesque D, Rouillard C, Cicchetti F(2006)
Neuroprotective effects of cystamine in aged parkinsonian mice. *Neurobiology of Aging*.

NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF CYSTAMINE IN AGED PARKINSONIAN MICE (Tremblay et al., 2006)

¹Tremblay Marie-Eve, ¹Saint-Pierre Martine, ¹Bourhis Emmanuelle, ^{1,2}Lévesque Daniel,
^{1,2}Rouillard Claude, ^{1,2}Cicchetti Francesca

¹Centre de Recherche en Neurosciences, CHUL, RC-9800, 2705, Boulevard Laurier,
Sainte-Foy, QC, Canada, G1V 4G2; ²Département de Médecine, Université Laval, Sainte-
Foy, QC, G1K 7P4

Key words : Parkinson disease, Aging, MPTP, Dopamine, Neuroprotection

Corresponding author : Francesca Cicchetti, Centre de recherche en Neurosciences,
CHUL, RC-9800 2705 Blvd Laurier, Sainte-Foy, Canada G1V 4G2; E-mail :
Francesca.Cicchetti@crchul.ulaval.ca

Acknowledgments : This study was supported by the *Fondation Canadienne pour l'innovation (FCI)*, the *Fonds d'Exploitations des Infrastructures (FEI)*, the *Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ)* to Francesca Cicchetti and the *Canadian Institutes of Health Research* to Claude Rouillard and Daniel Lévesque.

2.1 Résumé

Nous avons investigué les effets de la cystamine – un anti-oxydant aux propriétés neuroprotectrices chez un modèle animal de la maladie de Huntington – chez des souris parkinsoniennes générées par la toxine MPTP injectée de façon systémique ip pendant 5 jours. Des souris âgées (16 mois) ont reçu 10 ou 50 mg/kg/jour de cystamine administrée : 1) 2 jours avant, durant et 14 jours après le traitement MPTP ou 2) pendant le traitement MPTP et les 14 jours subséquents. Le pré-traitement avec une faible dose de cystamine (10 mg/kg) a rétabli significativement les niveaux de fibres striatales dopaminergiques (DA) ($p < 0,01$), de cellules DA ($p < 0,01$), d'ARNm de Nurr1 (gène inducteur de DA) ($p < 0,001$), et le nombre de cellules exprimant le transporteur de la DA ($p < 0,001$) au niveau nigral en comparaison aux souris traitées au MPTP seul. Ces résultats suggèrent que la cystamine possède des propriétés neuroprotectrices chez un modèle animal de la maladie de Parkinson.

2.2 Abstract

Accumulating evidence suggests an important role of oxidation in pathologies such as Parkinson's disease. Here, we investigated the effect of cystamine - which has shown neuroprotection in animal models of Huntington's disease - in a parkinsonian mouse generated by the toxin MPTP. Aged mice (16 months of age) were assigned to either a 10mg/kg/day or 50mg/kg/day cystamine treatment administered 1) 2 days prior, during and 14 days after MPTP lesioning or 2) beginning on the day of the MPTP lesion and for the subsequent 14 days. Pre-treatment with lower doses of cystamine (10mg/kg) revealed increased levels of tyrosine hydroxylase positive (TH) striatal fiber ($p < 0.01$), increased number of TH-immunoreactive cells ($p < 0.01$), increased substantia nigra Nurr1 mRNA levels ($p < 0.001$), and increased number of substantia nigra cells expressing the dopamine transporter ($p < 0.001$) as compared to MPTP treated mice. These results provide strong evidence for neuroprotective properties of cystamine in this animal model of Parkinson's disease.

2.3 Introduction

Although neurodegenerative diseases such as Huntington (HD), Alzheimer and Parkinson (PD) are each characterized by a particular cell-type loss, these brain pathologies may share common cell degeneration mechanisms such as those related to hydrogen peroxidase and oxygen radicals (Bel and al., 1995; Coyle and Puttparcken, 1993). Some of the most powerful antioxidant scavengers include glutathione (GSH). The GSH system is largely involved in controlling cellular redox states and acts as a primary defense mechanism from H_2O_2 and peroxide removal in the brain. Recent work has provided evidence that GSH depletion *in vivo* specifically results in dystrophic axons in dopaminergic (DA) neurons and enhances the neurotoxicity of 6-hydroxydopamine (6-OHDA), 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP^+) and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) (Nakamura and al., 1997; Pileblad and al., 1989; Wullner and al., 1996). In humans, GSH is significantly depleted in the substantia nigra (SN) of PD patients (Ambani and al., 1975; Kish and al., 1985), as in incidental Lewy body disease (Dexter and al., 1994). Cystamine is an inhibitor of transglutaminase (Tgase) (Ientile and al., 2003) involved in the formation of cellular aggregates and has been demonstrated to reduce abnormal movement, halt weight loss and prolong lifespan in transgenic mouse models of HD (Dedeoglu and al., 2002; Karpuj and al., 2002). This compound further holds anti-oxidant and anti-apoptotic properties (Lesort and al., 2003; Oliverio and al., 1999), which may potentially reduce neuronal degeneration by stimulating GSH synthesis (Jokay and al., 1998).

MPTP is a toxin that reproduces parkinsonian-like features in rodents and nonhuman primates by specifically targeting presynaptic DA terminals (Burns and al., 1983; Heikkila and al., 1984). MPTP-induced neurotoxicity is associated with DA and tyrosine hydroxylase (TH) activity decreases, as well as decreases in [3H]mazindol-labeled DA uptake binding sites (Burns and al., 1983; Javitch and al., 1985; Sonsalla and al., 1989) and more recently has been shown to induce irreversible apoptotic cell death of DA neurons in the SN pars compacta (SNpc) of mice treated with the toxin (Serra and al., 2002). More specifically, MPTP penetrates the blood-brain-barrier and is converted into MPP^+ via the monoamine oxidase B (MAO-B). MPP^+ , which has a high affinity for DA transporters

(DAT), can then easily access DA cells and cause death through the mitochondrial complex 1. In addition to this mechanism, data exist to suggest that MPTP-induced neurotoxicity may also involve the production of reactive oxygen species (ROS) by the nonenzymatic or enzymatic oxidation of catecholamines (Adams and Odunze, 1991; Chiueh and al., 1993; Heikkila and al., 1984; Poirier and Barbeau, 1985). Another interesting aspect is that MPTP-induced neurotoxicity may be age-related (for review see (Irwin and al., 1993; Irwin and al., 1992). The aging processes are thought to be secondary to free radical-induced damage to the brain, supporting again that the association between aging and MPTP may be related to ROS-mediated events.

In light of the existing data, it is reasonable to think that the therapeutic benefits of cystamine observed in HD can be seen in PD where similar oxidative and programmed cell death are occurring. Here, we investigated the neuroprotective effects of cystamine in aged animals treated with MPTP as a model of PD.

2.4 Materials and methods

2.4.1 Animals and MPTP lesion

A total of 48 aged (16 month old) male C54BL/6 mice were purchased from Harlan Breeding Laboratories (Harlan, Indianapolis, IN). The mice were housed 2 per cage under standard conditions with free access to food and water, randomized and handled under the same conditions by one investigator. All experiments were performed in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Institutional Policy of the Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL). In total, 40 mice received 7 intraperitoneal (i.p.) injections of MPTP-HCl (20 mg/kg free base; Sigma, St.Louis, MO) dissolved in saline 0.9% prepared fresh. MPTP was administered twice on the first 2 days of the experimental protocol at an interval of 12 hours (h) and once a day on 3 subsequent days. Animals were ultimately sacrificed 14 days after the last injection. The remaining 8 control mice did not receive any injections.

2.4.2 Cystamine treatment

Cystamine's neuroprotective effects (Cystamine dihydrochloride, Sigma, St. Louis, MO) were evaluated with 2 different doses of 10 mg/kg (low concentration) or 50 mg/kg (high concentration) dissolved in sterile saline 0.9% and prepared fresh for daily i.p. injection 1h before MPTP administration. Doses of cystamine were selected based on prior publications (Karpuj and al., 2002) and our own work in HD mice models (Wang and al., 2005). Data of cystamine use in other disease models such as PD is not currently available. Drug administration was performed according to 2 different regimens for either doses: 1) Cystamine was given 2 days prior, during and 14 days after MPTP treatment (pre-treatment groups) or 2) beginning on the day of the MPTP treatment and for the subsequent 14 days. Group assignment was as follows: Low dose cystamine 2 days prior to MPTP injections (n=8) (pre-treatment) (group 1); High dose cystamine 2 days prior to MPTP injections (n=8) (pre-treatment) (group 2); Low dose cystamine beginning with MPTP injections (n=8) (group 3); High dose cystamine beginning with MPTP injections (n=8) (group 4); MPTP treated animals receiving vehicle injections only (n=8) (group 5) and a control group which did not receive any injections (n=8) (group 6) (see Figure 2.1). Weight fluctuations were closely monitored in all groups and overall weight variations between groups were assessed by repeated measures ANOVA using the "StatView" program version 4.51 (SAS Institute, Cary, NC).

2.4.3 Post-mortem histological evaluation

Animals were sacrificed under deep anesthesia with sodium pentobarbital [60mg/ml, i.p. (0.1 ml/100g)] and perfused via intracardiac infusion with heparinized saline (0.9%) followed by 4% paraformaldehyde (PFA) with Borax (Sodium tetraborate) in milliQ water, pH 9.5, 14 days after the last MPTP injection. After intracardiac perfusion, brains were collected and post-fixed in 4% PFA for 6h and transferred to 20% sucrose in 0.1M phosphate buffer saline (PBS) for cryoprotection. Coronal brain sections of 30 μ m thickness were cut on a freezing microtome (Leica Microsystems, Montreal, QC), serially collected

in anti-freeze solution (monophosphate sodium monobasic 0.2M, monophosphate sodium dibasic 0.2M, ethylene glycol 30%, glycerol 20%) and subsequently retrieved for each experiment.

At the beginning of each immunostaining protocol, sections were washed in PBS 0.1M and then placed in 3% peroxide for 30 min at room temperature (RT). Slices were transferred in 0.1M PBS for several washes and then preincubated in a 0.1M PBS solution containing 0.1% Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO) and 5% normal goat serum or normal donkey serum (NGS or NDS, Wisent Inc., St-Jean-Baptiste de Rouville, QC) for 30 min at RT. Sections were incubated overnight at 4°C with either rabbit anti-TH (DA cells) (Pel-Freez, Rogers, AR; 1:5000), rabbit anti-Caspase 3 (detecting fragment of activated caspase-3 involved in apoptosis) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA; 1:1000), goat anti-8-OHdG (8-hydroxydeoxyguanosine) (detecting hydroxyl radicals formed oxidative stress) (Chemicon, Temecula, CA; 1:1000) or anti- α -synuclein (marker of cellular aggregates) (Chemicon, Temecula, CA; 1:1500).

After overnight incubation at 4°C with the primary antibody, sections were washed in PBS 0.1M and incubated for 1h at RT in a PBS solution containing 0.1% Triton X-100, 5% NGS or NDS, and biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlington, ON; 1:1500) for TH, Caspase-3 and α -synuclein or biotin-sp donkey anti-goat (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA; 1:2000) for ROS-related activity (anti-8-OHdG). Following 3 washes in PBS, sections were placed in a solution containing avidin-biotin peroxidase complex (ABC Elite kit; Vector Laboratories, Burlington, ON) for 1h at RT. The bound antibodies were visualized by placing the sections in a Tris 0.05M buffer solution containing 0.5mg/ml of 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma, St. Louis, MO) and 0.1% of 30% hydrogen peroxide (Sigma, St. Louis, MO) at RT. The reaction was stopped by washing in 0.05M Tris buffer and subsequent PBS washes. Note that following the TH DAB reaction, sections were mounted on gelatin-coated slides and counterstained with cresyl violet (Sigma, St. Louis, MO). Other sections were treated as above except that the primary antibody was omitted from the incubation medium. These

sections remained virtually free of immunostaining and served as negative controls. All sections were ultimately air-dried, dehydrated in ascending grades of ethanol, cleaned in xylene, and coverslipped with DPX mounting media (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA).

2.4.4 Fluoro-Jade coloration and DAPI

The brain sections were mounted on gelatin-coated slides (Brain Research Laboratories, Newton, MA) and air-dried overnight. They were dehydrated in ascending grades of ethanol, hydrated in descending grades of ethanol and finally rinsed in milliQ water. Afterwards, the sections were dipped in a 0.06% potassium permanganate solution bath for 10 min and washed in milliQ water. They were then incubated in a milliQ solution containing 0.0002% (v/v) DAPI (Molecular Probes, Eugene, OR), 0.1% (v/v) acetic acid glacial and 0.0004% (v/v) Fluoro-Jade B (Chemicon, Temecula, CA) for 20 min (Schmued and al., 1997). After a few rinses in milliQ water, they were completely air-dried, dipped in xylene and coverslipped with DPX. Degenerating neurons and fibers appeared green and nuclei emerged blue in fluorescence.

2.4.5 In situ hybridization

A specific [³⁵S]UTP-labeled complementary RNA (cRNA) probe was used to assess tissue mRNA levels of Nurr1, a nuclear receptor associated with the DA system. The cRNA probe for Nurr1 stems from a 403 bp EcoRI-BamHI fragment of a full-length mouse Nurr1 cDNA subcloned into pBluescript SK+ and linearized with *Xba*I. The cRNA probes were synthesized and labeled by using Promega riboprobe kit (Promega, Madison, WI), [³⁵S]UTP (Perkin Elmer Inc., Boston, MA) and the RNA polymerase T7 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Brain sections were hybridized following previously published protocols (Beaudry and al., 2000; Langlois and al., 2001; Lapointe and al., 2004). Autoradiograms were developed following a 72h exposure.

The DAT probe, a 2238 bp length fragment, was cloned into pBluescript II SK+ plasmid. Linearization was made with *NotI* enzyme. Antisense probe was synthesized with [³⁵S]UTP and T7 RNA polymerase. For this particular probe, slides were mounted onto Snowcoat X-tra™ slides (Surgipath, Winnipeg, Canada) and stored under vacuum overnight before use. Brain sections were fixed in 4% PFA in 100 mM phosphate buffer at 4°C for 20 min, as previously described (Rivest R and al., 1995). Pre-treatment was made with various consecutive baths: phosphate buffer 100 mM twice for 5 min, Proteinase K 0.1µg/ml for 10 min at 37°C, acetylation bath (0.25% acetic anhydride, triethanolamine 100 mM) for 10 min and twice for 5 min in standard saline citrate (SSC) (300 mM NaCl, 30 mM sodium citrate). Successive dips in ethanol baths (30%, 60%, 100%, 100%; 3 min each) were performed for dehydration. *In situ* hybridization of the riboprobes on tissue sections was performed at 58°C overnight in a standard hybridization buffer (deionised formamid 50%, sodium chloride 5 M, Tris 1 M, EDTA 0.5 M, Denhart's solution 50X, dextran sulfate 50%, tRNA 10mg/mL, DTT 1M, S³⁵ 2.10⁷ cpm/ml). Post-treatment was conducted using the following solutions: SSC 4X (30 min) (removing coverslips), SSC 2X twice (5 min), RNase A 20 µg/mL (1h) at 37°C, milliQ water twice (15 sec), SSC 2X (15 min), SSC 0.5X (30 min) at 60°C, SSC 0.1X (30 min) at 60°C, SSC 0.1X (5 min). Consecutive baths of ethanol solutions (30%, 60%, 100%, 100%; 3 min each) were used for further dehydration. Tissue sections were ultimately placed against BiomaxMR (Kodak, New Haven, CT) radioactive sensitive film for 5h.

Deffating was performed with 4 baths of ethanol, 2 baths of xylene and 3 baths of ethanol. Following these steps, slides were dipped in NTB emulsion (Kodak, New Haven, CT) prepared at 42°C, air-dried for 4h and stored in the dark for 5 days at 4°C. The emulsion was then developed (3.5 min) in D-19 developer (Kodak, New Haven, CT), rinsed in deionised water and fixed (5 min) in Rapid Fixer solution from Kodak. Slides were rinsed in deionised water for 1h and then coloured. Coloration was performed using thionine (1 min), followed by water and ethanol dips and an additional 3 ethanol (1 min) and 3 xylene baths (3 min). Slides were coverslipped with DPX mounting media.

2.4.6 Densitometric measurements of striatal TH fibers

Digitized brain images of the striatum were obtained with a CCD camera model XC-77 (Sony Electronics Inc, NY) equipped with a 60mm f/2.8D magnification lens (Nikon Canada Inc., Mississauga, ON). The density of striatal DA fibers was analyzed on a MacIntosh computer using the Image NIH software (Image 1.63, W. Rasband, NIH). The average labeling for each area was calculated from 4 adjacent brain sections of the same animal at the level of the anterior commissure (AP levels: +0.2 to -0.8 mm in the atlas of Paxinos and Watson) (Paxinos G and Watson C, 1986). All rostro-caudal levels of analysis were comparable across animals. All images were acquired at the same magnification (10x) to allow the visualization of the entire striatum in a single field. Striatal images converted to gray scale were then delineated and the intensity of staining was thus assessed for the entire region of the 4 sections sampled, subsequently averaged for each animal. Background intensities taken from the corpus callosum devoid of TH staining were subtracted from every measurement.

2.4.7 Stereological counts of TH neuronal loss and DAT expressing neurons

The loss of DA neurons was determined by counting TH-immunoreactive cells under bright-field illumination. After delineation of the SNpc at low magnification (10x), 3 sections from the entire region were sampled at higher magnification (20x) using Stereo investigator software (Microbrightfield, Colchester, VT) attached to a E800 Nikon microscope (Nikon Instruments, Toronto, Canada). Section sampling was performed based on the achievement of the desired coefficient of error (Glaser and Glaser, 2000), which insured the correct representations of cell counts on 3 sections of the same brain (AP levels: -5.3 to -6.04 mm) (Paxinos and al., 1986). The optical fractionator method (Glaser and al., 2000) was used to count TH positive (TH+ and cresyl violet+ neurons) and TH negative (cresyl violet+ only) or DAT expressing cells. The entire depth of the field was sampled ignoring the upper and lower 2 μ m to avoid counting cells that might be missing nuclei. Cell counts were performed blindly by 2 independent investigators. Note that these analyses was restricted to the SNpc

and thus excluded the ventral tegmental area (VTA). The average number of TH-immunoreactive or DAT expressing neurons, derived from the analysis of 3 SNpc sections, was ultimately plotted.

2.4.8 Densitometric measurements of Nurr1 and DAT levels in the SNpc

Levels of autoradiographic labeling for Nurr1 and DAT were quantified by computerized densitometry. Digitized brain images and their analysis were made with the same equipment as mentioned above. Optical density of the autoradiograms was translated in $\mu\text{Ci/g}$ of tissue using ^{14}C radioactivity standards (ARC 146- ^{14}C standards, American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, MO). Nurr1 and DAT were measured in the SNpc using the same area for all sections. The average labeling for each area was calculated from 3 adjacent brain sections of the same mouse. Background intensities taken from white layer of the superior colliculus devoid of Nurr1 and DAT mRNA levels were subtracted from every measurement.

All data derived from the striatum and SNpc analysis are expressed as group mean \pm s.e.m. and statistical analyses were performed by one-way ANOVA using the “StatView” program (version 4.5, SAS Institute, Cary, NC). Photomicrographs were taken using a Hamamatsu digital CCD camera (model C4742-96-12G04) (Sunayama-cho, Hamamatsu city, Japan) linked to a i90 Nikon microscope using the imaging software Simple PCI 5.3 (Imaging Systems, Compix Inc., Cranberry Township, PA). Images were finalized for illustration using Adobe Photoshop 7.0.

2.5 Results

2.5.1 Health-related effects of cystamine

Throughout the experiment, the health status of treated mice was closely monitored by weight. Out of 48 animals comprised in the study, a total of $n=7$ animals died. These mice were distributed across all experimental groups (group 1: $n=1$; group 2: $n=2$; group 3: $n=2$; group 4: $n=0$; group 5: $n=1$; and group 6: $n=1$). Their time of death was neither consistent as most of these animals died early in the study (first day of pre-treatment or treatment) while others died as far as 10 days into the experimental protocol. Given that one control mouse also died, we suspect that causes of death were either due to cardiac arrest related to old age or stress of the injections. General autopsy did not reveal any abnormalities in these mice. Overall, control animals maintained their weight and showed slight weight gain tendencies throughout the study (weight variation between 37.2 and 40.1g) whereas mice exposed to MPTP, with or without cystamine treatment, showed an overall decrease weight pattern. None of the average weights per group was statistically different (data not shown).

2.5.2 Histological confirmation of neural protection

Endpoint histological evaluation was conducted in all mice comprised in this study to investigate the neuroprotective effects of cystamine using several specific markers related to the DA system. MPTP treatment generated a loss of neurons immunoreactive for TH that was associated with a concomitant loss of Nissl-stained neurons in the SNpc, consistent with a degeneration of DA neurons as opposed to a downregulation of TH expression. No evidence of degeneration within or outside the SNpc was observed as assessed by Fluoro-Jade B staining (data not shown), although this method is only sensitive to acute degeneration. Drug administration at lower doses of cystamine (10mg/kg) preceding the MPTP lesioning revealed both increased levels of striatal TH fiber immunoreactivity ($p < 0.01$, see Figure 2.2) and increased TH-immunoreactive cell counts ($p < 0.01$, see Figure 2.2) as compared to MPTP animals. Further, post-mortem analysis of the DA system in low dose cystamine pre-treated mice revealed normalization of Nurr1 mRNA levels (see Figure

2.3) as well as the number of neurons expressing DAT (see Figure 2.4) in the SNpc. Overall, evaluations of these 3 specific markers related to the DA system yielded similar patterns and showed the beneficial effects of cystamine, pointing to the low dose pre-treatment as the most effective neuroprotective paradigm against MPTP-induced neurotoxicity.

2.5.3 Investigation of cell protection mechanisms

Alpha-synuclein cellular aggregates were not detected in this paradigm. Blockade of apoptotic and oxidative processes by cystamine was also investigated. Both anti-ROS and anti-caspase 3 staining were absent in the brains of all animals comprised in this study (data not shown).

2.6 Discussion

Exhaustive post-mortem histological evaluation of DA related markers in aged MPTP lesioned mice treated with different doses and regimes of cystamine revealed that the status of the DA system returned to normal levels with lower doses (10mg/kg/day) of the compound given 2 days prior to and during MPTP lesioning. This was confirmed by assessing striatal TH fiber levels, SNpc TH cell counts, SNpc Nurr1 mRNA levels as well as the number of SNpc DAT expressing cells. Although more specific data addressing the mechanisms related to cystamine neuroprotection in MPTP mice has yet to be produced, this is the first evidence of neuroprotective properties of cystamine in an animal model of PD. The present results indicate that cystamine administration can prevent MPTP-induced DA cell loss and displays a maximal effect given prior to and during the induction of the brain lesion. Taken together, the results demonstrate the preventive therapeutic potential of cystamine in aged parkinsonian mice.

It has been abundantly reported that the risk of developing PD is dramatically increased with age; statistics indicate that 1 out of 100 person over 60 has PD. Accordingly, greater

levels of MPP^+ are found in brains of older mice, which may hint to an increased susceptibility to MPTP toxicity on the DA system with age (Mandavilli and al., 2000). Additional work has shown an age-dependant increase in ROS after MPTP treatment (Ali and al., 1993) as well as an age-related increase in DNA damage in mitochondria (Mandavilli and al., 2000). The similarity between the MPTP model and PD raises the possibility that both types of ROS may play a significant role in the early pathogenesis of DA neurodegeneration in PD (Zhang and al., 2000), a response strongly modulated by age. Although we failed to identify apoptotic markers in the paradigm used here, implication of apoptotic phenomenon in aged MPTP treated mice cannot be ruled out solely on the absence of ROS or caspase-3 staining. Activation of the apoptotic pathway occurs early on after MPTP injections (Kühn and al., 2003). It is thus very likely that we have not observed this response because of the only later time point evaluated here, corresponding to 14 days post-MPTP lesion.

Further, while Fluoro-Jade B staining did not show evidence of degeneration in the SNpc of animals treated with MPTP, we report a concomitant loss of Nissl-stained neurons in the same brain region which argues against a down-regulation of the TH enzyme, results similar to those obtained by Kühn *et al.* (Kühn and al., 2003). In accordance with this view, assessment of Nurr1 mRNA levels in our study revealed similar patterns to those obtained for TH fiber and cell loss in the SNpc. Nurr1 colocalizes with TH and its expression is involved in the development (Zetterstrom and al., 1997) and maintenance (Sauxedo-Cardenas and al., 1998) of a DA phenotype in neurons of the midbrain (SN and VTA). Given the recently characterized regulatory role of Nurr1 and DAT (Smits and al., 2003) in TH expression (Kim and al., 2003), the decrease in Nurr1 mRNA levels reinforces the observations of DA neurons targeting. In accordance, variations in Nurr1 expression have indeed been suggested to be a susceptibility factor for DA neurodegeneration in PD (Lee and al., 2002). It has recently been shown that reduced Nurr1 expression increases the vulnerability of mesencephalic DA neurons to MPTP-induced injury (Le and al., 1999). Taken together, our results indicate that several components of the DA system are protected by low dose cystamine pre-treatment from MPTP toxicity.

Aside from the significant DA cell loss of the SN characteristic of PD, cell aggregates containing the protein α -synuclein are another important neuropathological hallmark of the disease. Recent evidence has linked tissue Tgase to the generation of aggregates such as those formed by α -synuclein (Junn and al., 2003). Cystamine is more specifically a competitive inhibitor of Tgase and its neuroprotective effects have been demonstrated in other neurodegenerative diseases such as HD (Green, 1993; Green, 1994; Lorand and Conrad, 1996). Tgase is calcium-dependent enzyme, which catalyzes a reaction between a polypeptide-bound glutamine and a polyamine to form a (γ -glutamyl)polyamine bond and ϵ -(γ -glutamyl)lysine isopeptide bond (crosslinking) (Greenberg and al., 1991; Lorand and al., 1984). As a result, it has been suggested that Tgase may contribute to the formation of insoluble nuclear and cytoplasmic aggregates that appear in many neurodegenerative diseases. It has also been reported that Tgase inhibitors, like cystamine, suppress aggregate formation and reduce cell death in cultured cell models (Igarashi and al., 1998; Oliverio and al., 1999). The MPTP mice model, which has failed to consistently reproduce cell aggregates as additionally reported here, does not offer the possibility to investigate the neuroprotective properties of cystamine against this pathological component, although a recent study by *Kühn et al.* (Kühn and al., 2003) has demonstrated that the only gene that was exclusively up-regulated in the MPTP animals with cell loss was α -synuclein. Even with the lack of α -synuclein detection in our experimental paradigm, cystamine blockade of Tgase, involved in cell aggregation, could be beneficial in patients diagnosed with PD where nuclear inclusions are found in Lewy bodies.

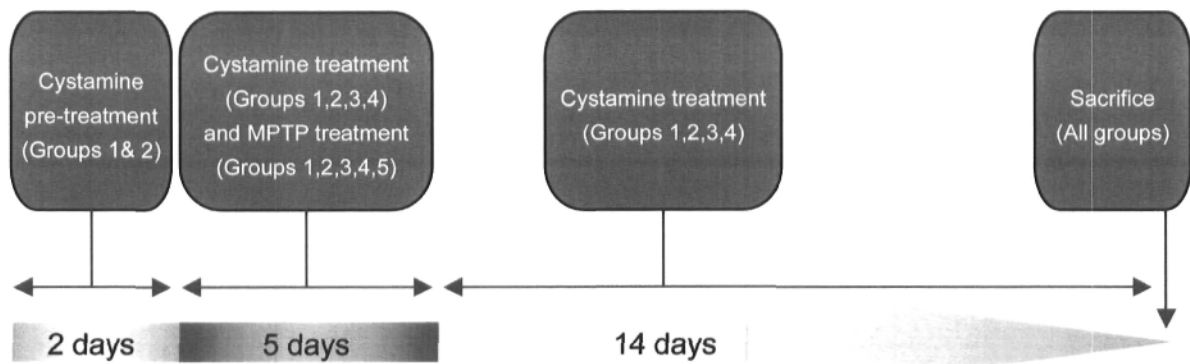
At this stage, it is not possible to identify the causes underlying the efficacy of low dose cystamine pre-treatment. Several factors such as the pharmacological window or drug interaction (cystamine and MPTP vs cystamine administered to genetically modified mice for HD) may feasibly determine the efficiency of one particular drug dose. In HD mice models, several doses - ranging from 7.5 to 225 mg/kg/day (Dedeoglu and al., 2002; Karpuj and al., 2002; Wang and al., 2005) - have been reported to produce neuroprotective effects. Here, our results relate to smaller doses of cystamine as being optimal for neuroprotection of the DA system in MPTP treated mice. Although none of the animals receiving higher

cystamine doses (50mg/kg) died or demonstrated any peripheral toxicity related to this agent, previous work has reported that high doses of cystamine are in fact toxic to mice and lead to early death (Dedeoglu and al., 2002). A dose-response curve evaluating the effects of cystamine (112, 225 and 400mg/kg given daily i.p. for several months to HD mice) revealed that only the higher dose of 400mg/kg was toxic. In our paradigm, and in our previous work with HD mice, cystamine used at 50 and 100mg/kg were not toxic. Here, similar doses (50mg/kg) were neither toxic nor optimal for neuroprotection of DA neurons.

The symptoms that characterize PD - including bradykinesia, postural reflex impairment, resting tremor, and rigidity (Fearnley and Lees, 1991; Marsden, 1994) - are perceived only when DA neuronal degeneration reaches 50% and that 75-80% of the striatum is denervated. Although several treatments have proven effectiveness for a number of years, their usefulness declines over time and is accompanied by unacceptable side effects such as dyskinetic involuntary movements (Chase and al., 1994; Tarsy and Baldessarini, 1984). There is thus an enormous demand for further scientific investigation and development of therapeutic approaches, including those designed to target different stages of the disease. Beneficial effects of cystamine have only been reported in HD murine models where chronic use of this neuroprotective agent was well-tolerated. Indeed, earlier publications reported cystamine treatment for several weeks to months in HD mice (Dedeoglu and al., 2002; Karpuj and al., 2002; Wang and al., 2005). Since PD is a progressive neurodegenerative disorder with a presymptomatic period which might last for several years (Jankovic, 2005), it is evident that cystamine as any effective treatment, in this neuropathological context, will need to be administered chronically in order to stop or delay the progression of the disease. However, the main difficulty will be to diagnose PD preferentially during the presymptomatic period or as early as possible during the symptomatic phase of the disease in order to maximize the beneficial effects of the treatment. Here, we provide strong evidence in favor of a neuroprotective role of cystamine, which certainly warrants further investigation of the mechanisms involved in the sparing of DA cells by this compound and its potential clinical use.

FIGURE 2.1

Time line and experimentation.



- Group 1 : Cystamine low dose pre-treatment + MPTP
- Group 2 : Cystamine high dose pre-treatment + MPTP
- Group 3 : Cystamine low dose + MPTP
- Group 4 : Cystamine high dose + MPTP
- Group 5 : MPTP alone
- Group 6 : Naïve mice

FIGURE 2.2

Neuroprotection of the DA system by low dose cystamine pre-treatment

Post-mortem histological evaluation revealed a significant decrease in striatal TH fibers in MPTP-treated mice as compared to control mice ($p < 0.01$; see bar graph a). This was also observed in animals pre-treated with high doses of cystamine, failing to reveal any protective effects of this drug dose and schedule ($p < 0.01$). Pre-treatment of low doses of cystamine prior to MPTP toxin administration and throughout the study showed significant and beneficial effects on TH striatal fibers in comparison to MPTP treated animals ($p < 0.01$). Similar results were obtained with the average number of TH-immunoreactive neurons per section at the specified level (AP: -5.3 to -6.04) (see bar graph b). Both MPTP and pre-treated high dose cystamine animals revealed significantly less TH nigral neurons ($p < 0.05$), whereas pre-treated low dose cystamine mice had significantly more TH neurons than MPTP-treated animals ($p < 0.01$). The low dose administration regime, given during MPTP treatment, also showed a significant increase in the number of TH immunoreactive nigral neurons as compared to MPTP treated mice ($p < 0.05$). Photomicrographs illustrate frontal sections through the striatum at the level of the anterior commissure and of the substantia nigra pars compacta (SNpc) in control (c,f), MPTP (d,g) and pre-treated low dose cystamine mice (e,h). Analysis of both structures (striatum and SN) for TH immunostaining illustrates beneficial effects of low dose cystamine pre-treatment in protecting TH striatal fibers (c,d,e) and TH neurons (f,g,h). Note the similar TH expression patterns of treated animals and controls (e,h – c,f) as compared to animals subjected to MPTP treatment alone (d,g). Insets further reveal a normal and healthy appearance of TH nigral neurons in control and low dose cystamine pre-treated animals (f,h) as opposed to MPTP animals of which remaining TH neurons of the nigra seemed morphologically unhealthy in showing a weak decrease in dendritic arborization (g). †Significant difference with the control group ($p < 0.05$); *significant difference with the MPTP group ($p < 0.05$); †† or ** = $p < 0.01$. Scale bar in c = 1mm; f = 200 μ m; inset = 25 μ m.

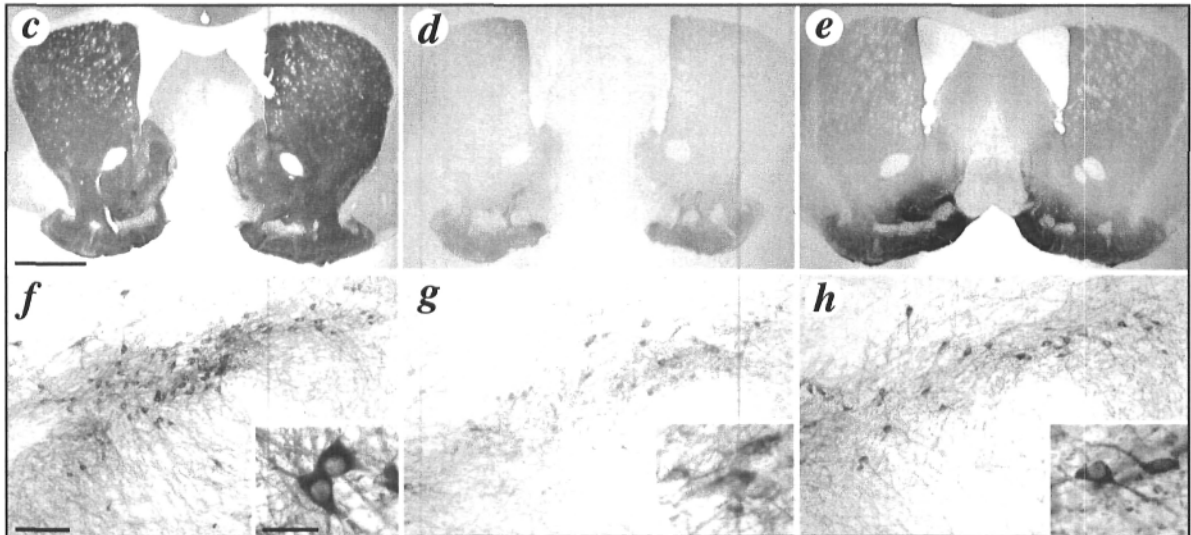
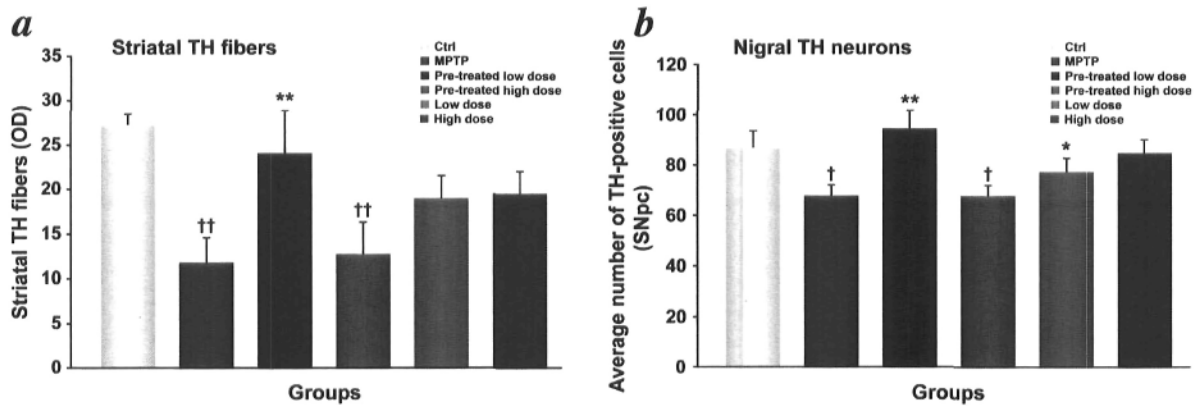


FIGURE 2.3

Neuroprotection of nigral Nurr1 levels by low dose cystamine pre-treatment.

At the level of the SNpc, we observed a significant decrease in Nurr1 mRNA expression in MPTP-treated animals ($p < 0.001$; see bar graph d) and pre-treated high dose animals ($p < 0.05$; see bar graph d). (a) Basal Nurr1 expression in low dose cystamine pre-treatment closely resembled those evaluated in control animals (c) ($p < 0.001$; also see d). Overall, patterns of Nurr1 mRNA expression were similar to TH nigral cell counts (see Fig. 2) although low dose cystamine treatment during MPTP administration also significantly improved nigral Nurr1 levels ($p < 0.01$; see bar graph d) whereas similar high dose scheduling showed significantly lower Nurr1 levels than controls ($p < 0.05$; d). †Significant difference with the control group ($p < 0.05$); *significant difference with the MPTP group ($p < 0.05$); †† or ** = $p < 0.01$; ††† or *** = $p < 0.001$. Scale bar a,b,c = 1mm.

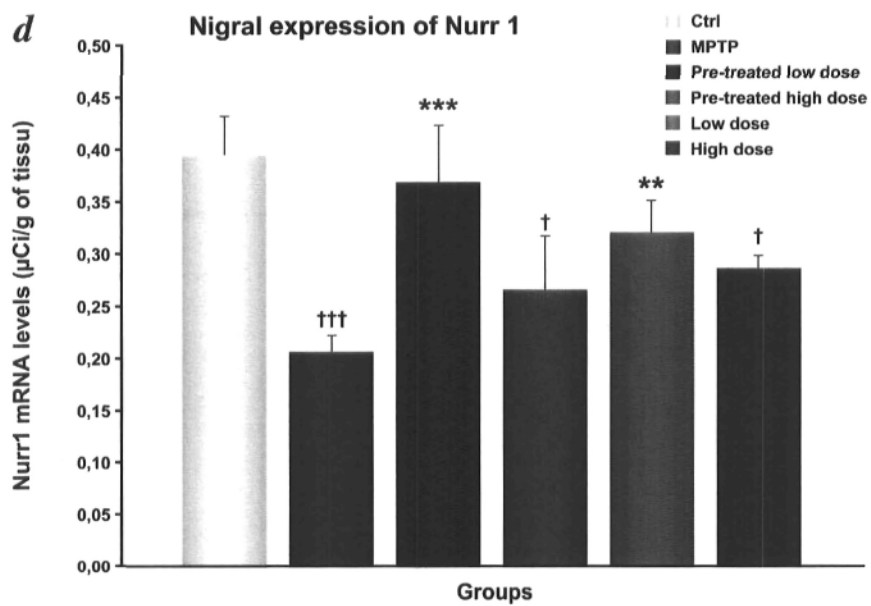
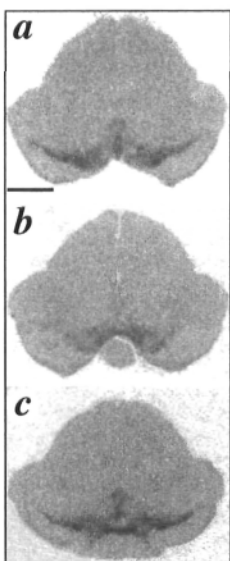
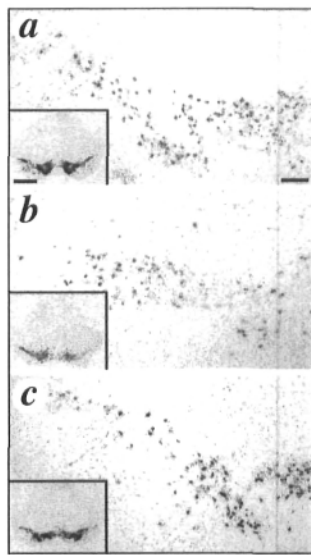


FIGURE 2.4

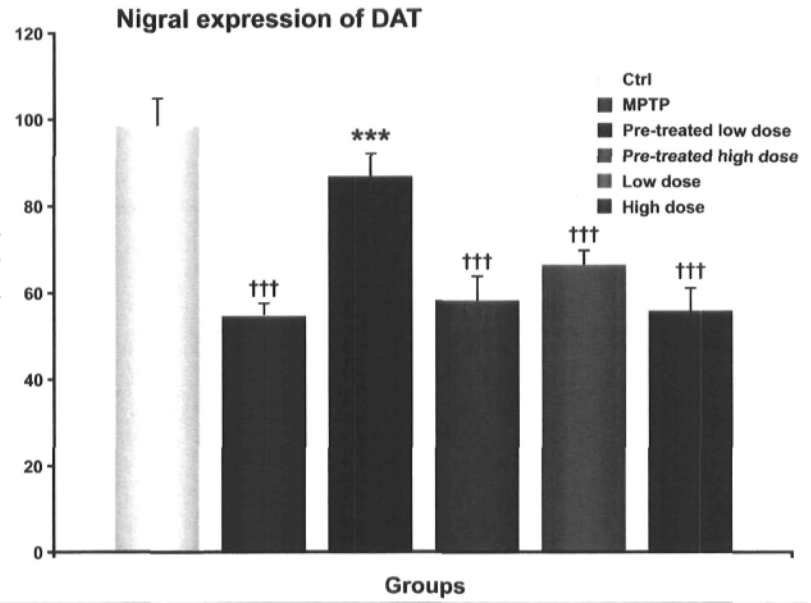
Neuroprotection of nigral DAT expressing cells by low dose cystamine pre-treatment.

At the level of the SNpc, we also observed a decrease in DAT mRNA expression in MPTP (b, inset) and an increase in pre-treated low dose animals (c, inset), as quantified by autoradiography. (a) Basal DAT expression in control animals (a, inset) closely resembled those evaluated in low dose cystamine pre-treatment (c, inset) although this result did not reach statistical significance (data not shown). However, assessment of the average number of DAT expressing cells at the specified level in the SNpc (AP: -5.3 to -6.04) did reveal a significant ($p < 0.001$; also see bar graph) decrease in MPTP mice (also see b) whereas mice treated with low dose cystamine prior to MPTP lesioning showed levels similar to control mice ($p < 0.001$; d). ††† Significant difference with the control group ($p < 0.001$); ***significant difference with the MPTP group ($p < 0.001$). Scale bar a,b,c = $100\mu\text{m}$; inset = $100\mu\text{m}$.



d

Average number of DAT expressing cells (SNpc)



CHAPITRE 3

3.1 Discussion

3.1.1 L'aspect pathologique

L'évaluation histologique post-mortem des marqueurs principaux des cellules DAergiques a révélé que le statut du système DAergique retourne à des niveaux normaux avec une faible dose (10 mg/kg/day) de cystamine donnée deux jours avant et durant les injections de MPTP. Cette observation a été confirmée par l'évaluation des niveaux de fibres TH striatales, des comptes de cellules TH SNpc, des niveaux d'ARNm de Nurr1 SNpc et du nombre de cellules exprimant DAT SNpc.

Bien que nous n'ayons pas pu identifier de marqueurs apoptotiques (caspase-3) au sein de la substance noire des animaux traités, il est fort plausible que cette absence soit plutôt reliée à des contraintes techniques. L'apoptose apparaît très tôt suite aux injections de MPTP et s'atténue peu à peu pour afin ne plus être détectable après 3 jours (Kühn et coll., 2003). Dans notre cas, l'évaluation post-mortem s'est effectué 14 jours suivant le dernier traitement au MPTP. Il est donc vraisemblable de ne pas observer de l'apoptose après un aussi grand écart de temps entre les injections de MPTP et les analyses post-mortem. La même explication est certainement valable quant à l'absence du marquage Fluoro-Jade B (marqueur de cellules affichant des signes de dégénérescence irréversible) chez les animaux traités au MPTP. L'observation d'une perte concomitante des neurones marqués au *Nissl*, marquage spécifique du noyau, dans la même région du cerveau permet ici d'éloigner la possibilité d'une simple régulation négative de l'enzyme TH. Plus particulièrement, l'évaluation des niveaux d'ARNm de Nurr1 révèle un patron similaire aux fibres TH et à la perte de cellules dans la SNpc. Puisque Nurr1 colocalise avec TH et que son expression est impliquée dans le développement et la maintenance du phénotype DA des neurones de la SNpc et de la VTA, la diminution des niveaux de l'ARNm de Nurr1 appuie davantage le résultat que les neurones DA sont bel et bien ciblés (Zetterstrom et coll., 1997; Saucedo-Cardenas et coll., 1998; Perlmann et Wallen-Mackenzie, 2004).

En plus d'une perte marquée de cellules DAergiques dans la SNpc, la maladie de Parkinson est caractérisée par la présence d'agrégats cellulaires de la protéine α -syn. Tel que mentionné au chapitre 1, l'enzyme Tgase serait en partie responsable de cette agrégation (Junn et coll., 2002) et il est possible que la cystamine préviendrait cette formation d'agrégats en inhibant le site de liaison de α -syn sur la Tgase. Le modèle classique de souris MPTP utilisé pour ces travaux n'a pas permis d'étudier les effets neuroprotecteurs de la cystamine via ce mécanisme puisque l'injection systémique de la toxine sur une courte durée ne reproduit pas l'agrégation cellulaire de α -syn. En effet, le marquage de α -syn s'est révélé négatif chez les souris traités au MPTP seulement. L'utilisation du modèle chronique, récemment développé par l'équipe de Fornai (Fornai et coll., 2005), serait alors plus appropriée pour cette étude puisqu'il présente des inclusions neuronales. Ces études sont actuellement en cours dans le laboratoire du Dre Cicchetti.

3.1.2 L'aspect comportemental

Des études comportementales ont été effectuées au cours de cette recherche en utilisant le Flex-Field, appareil permettant de visualiser l'activité locomotrice de l'animal afin de répertorier les mouvements ambulatoires ou fins ainsi que ceux effectués au centre et en périphérie de l'appareil. Les variations de mouvements sont calculées par des faisceaux lasers et quantifiées par un logiciel dédié à ce test. Les résultats non-significatifs de cette analyse ont été omis dans le manuscrit publié. Le groupe ayant reçu seulement des injections de MPTP n'a pas présenté de déficits moteurs en comparaison avec les deux autres groupes. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la perte neuronale se chiffrait à 30% seulement alors qu'elle doit atteindre plus de 60% pour voir apparaître des troubles moteurs. En effet, chez l'homme, les symptômes cliniques n'apparaissent que lorsque que la dégénérescence neuronale se chiffre à plus de 60% (voir revue par Dunnett et Bjorklund, 1999).

3.1.3 L'âge des souris

Il est également important de mentionner que le choix d'utiliser des souris âgées de 16 mois se base sur le fait que le risque de développer la maladie de Parkinson augmente dramatiquement avec l'âge. En effet, les statistiques indiquent qu'une personne sur 100 âgée de plus de 65 ans est atteinte de Parkinson (de Rijk et coll., 1995). De plus, les souris plus âgées exposées à des traitements de MPTP démontrent des niveaux plus élevés de MPP+ dans le cerveau, ce qui suggèrent une plus grande susceptibilité du système DAergique avec l'âge (Mandavilli et coll., 2000). L'exposition au MPTP chez des souris âgées augmente aussi le taux de ROS (Ali et coll., 1993) ainsi que l'étendu des dommages au niveau des mitochondries (Mandavilli et coll., 2000). La similitude entre le modèle MPTP et la maladie de Parkinson appuie davantage la possibilité que les ROS, et plus largement l'oxydation, puissent jouer un rôle important dans la neurodégénérescence DAergique précoce de la maladie de Parkinson, une réponse fortement accentuée avec l'âge (Irwin et coll., 1992).

3.1.4 Comment expliquer l'efficacité d'une faible dose en pré-traitement?

À ce stade, il n'est pas possible d'identifier les causes expliquant l'efficacité d'une faible dose de cystamine donnée en pré-traitement. Certains facteurs comme la fenêtre pharmacologique ou l'interaction entre produits pourrait expliquer l'efficacité d'une dose particulière de cystamine. Il est important de souligner que, bien que la faible dose de cystamine ait démontré des effets neuroprotecteurs, la forte dose, quant à elle, ne présente aucun effet protecteur. Toutefois, elle n'est pas toxique pour les neurones DAergiques. Ainsi, les fortes doses n'induisent ni mortalité chez les animaux traités ni signes de toxicité périphérique. D'éventuelles études utilisant des doses de cystamine entre 10 et 50 mg/kg seront nécessaires afin de déterminer le profil pharmacologique de cette molécule.

L'efficacité du pré-traitement peut s'expliquer par le fait que ce régime d'administration de cystamine a permis d'augmenter le ratio GSH/GSSG avant même qu'il soit renversé par les

injections de MPTP. L'efficacité du pré-traitement avec de la cystamine présente un défi intéressant quant à l'application clinique. En effet, les symptômes qui caractérisent la maladie, incluant la bradykinésie, l'altération des réflexes posturaux, les tremblements et la rigidité, sont perçus seulement lorsque la dégénérescence neuronale DAergique atteint 50% et que 75-80% du striatum est dénervé. Ainsi, la maladie de Parkinson possède une période asymptomatique qui peut s'étendre sur plusieurs années. La difficulté sera alors de diagnostiquer les « porteurs » de la maladie préférentiellement dans cette période ou même plus tôt pour permettre une maximisation des effets bénéfiques neuroprotecteurs du traitement de cystamine. La découverte de plusieurs mutations de gènes associées à l'apparition de la maladie de Parkinson augmente la possibilité de pouvoir identifier les personnes à risque et ainsi leur fournir un traitement pour ralentir ou même prévenir la perte neuronale qui caractérise la maladie.

3.1.5 Comparaison des effets de la cystamine dans la maladie de Huntington et de Parkinson

Les maladies de Parkinson et de Huntington sont des pathologies neurodégénératives qui sont toutes deux caractérisées par une perte cellulaire particulière qui pourraient partager un mécanisme commun de dégénérescence, soit le stress oxydatif (Bel et coll., 1995; Coyle et Puttparcken, 1993).

Comme mentionné dans le chapitre 2, le Dr Wang et son équipe ont effectué des études sur la neuroprotection de la cystamine chez des souris atteintes de la maladie de Huntington (Wang et coll., 2005). Pour ce faire, ils ont utilisé des souris transgéniques R6/2 âgées de 8 semaines ; les doses de cystamine choisies pour cette étude étaient de 5.4 mg/kg, 9 mg/kg, 50 mg/kg et 100 mg/kg. Les résultats obtenus démontrent que le traitement avec une forte dose de cystamine (100mg/kg) est le plus efficace dans ce contexte neuropathologique. En effet, la dose de 50 mg/kg n'offre qu'une neuroprotection partielle. Quant aux deux autres faibles doses, leurs effets neuroprotecteurs sont négligeables.

Les résultats obtenus chez les souris huntingtoniennes vont à l'encontre de ceux obtenus chez les souris parkinsoniennes. En effet, c'est un traitement à forte dose (100 mg/kg) qui offre la meilleure neuroprotection dans la maladie de Huntington tandis que c'est le traitement avec une faible dose (10 mg/kg) qui est neuroprotecteur dans la maladie de Parkinson. Cette différence de résultats pourrait s'expliquer par le fait que la maladie de Huntington est déjà induite chez les souris depuis 8 semaines avant le traitement de cystamine ; tandis que chez les souris parkinsoniennes, leurs injections de MPTP ont débuté 2 semaines suivant ou au moment du traitement de cystamine. Il est donc plausible qu'une forte dose soit utile pour renverser le processus de dégénérescence déjà engendré. Mais, des recherches plus approfondies au niveau des mécanismes d'action de la cystamine seront nécessaires afin de déterminer les différences majeures entre les effets neuroprotecteurs de la cystamine chez les patients atteints de la maladie de Huntington et de Parkinson.

3.2 Perspectives futures

À la lumière des résultats présentés dans ce mémoire, il est primordial d'étudier les mécanismes d'action de neuroprotection de la cystamine, soient l'augmentation de la synthèse de la GSH, l'inhibition de la Tgase et l'augmentation de l'expression de BDNF chez un modèle animal qui reproduit les caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques de la maladie de Parkinson. Le modèle chronique proposé par Fornai (Fornai et coll., 2005) semble mimer la neurodégénérescence progressive observés chez les sujets humains parkinsoniens en plus de former des inclusions neuronales nigrales. Ainsi, il semble être le modèle le plus approprié pour étudier les mécanismes de la cystamine. Mais avant toute chose, les résultats sur ce nouveau modèle doivent être répliqués et étudiés en profondeur. Dans cette optique, nous avons donc récemment conduit une expérimentation préliminaire pour évaluer les effets d'un traitement systémique ou chronique de MPTP sur l'expression de la GSSG dans la SNpc et de la GSH, GSSG et le ratio GSH/GSSG dans le striatum. Les résultats obtenus ne démontrent aucun signe de stress oxydatif chez le modèle classique. Par contre, une augmentation significative des niveaux de GSSG dans la SN a été observée chez le modèle chronique suggérant une augmentation de l'activité de la GSH

peroxydase. Dans le striatum, une diminution significative du ratio GSH/GSSG a été évaluée et donc la présence de stress oxydatif chez ce nouveau modèle MPTP (résultats présentées dans le cadre du congrès de l'« European Behavioural Pharmacology Society » qui a eu lieu à Cracovie, en Pologne). Nos résultats préliminaires suggèrent alors que des différences importantes existent entre les modes d'administration de MPTP concernant les mécanismes de dégénérescence des cellules DAergiques. Ces évaluations demeurent préliminaires et font actuellement l'objet de recherches exhaustives dans le laboratoire du Dre Cicchetti. Une meilleure connaissance des mécanismes d'action de la cystamine permettra d'éclaircir les interventions thérapeutiques neuroprotectrices pour la maladie de Parkinson.

3.3 Conclusion générale

La maladie de Parkinson est le deuxième désordre neurodégénératif en importance et devient, à cause du vieillissement de la population mondiale, un problème de plus en plus préoccupant. À ce stade, il est primordial de développer des approches thérapeutiques efficaces pour traiter la maladie.

Actuellement, l'administration de la L-dopa est le traitement palliatif le plus répandu. Cette approche est couramment utilisée puisqu'elle est moins coûteuse et qu'elle permet d'améliorer considérablement la qualité de vie des patients (Rascol et coll., 2003). Ce traitement connaît une période d'efficacité de 5 à 7 ans après quoi les patients traités ne répondent malheureusement plus aussi bien à la médication. Des mouvements incontrôlables de type dyskinétique font ensuite leur apparition. Plusieurs secteurs de recherche visent donc le développement de thérapies qui s'avéreront curatives, peu importe l'avenue favorisée (neuroprotection, chirurgies, etc). Dans les variétés de thérapies à l'essai, on compte entre autre la transplantation cellulaire. La greffe de cellules peut rétablir les niveaux appropriés de DA et même promouvoir la formation des connections synaptiques avec d'autres neurones dans le voisinage de la greffe. Malgré certains effets bénéfiques générés par la greffe de cellules fœtales humaines (Lindvall et coll., 1989; Lindvall et coll.,

1990; Piccini et coll., 1995; Freed et coll., 2001), leur utilisation à grande échelle demeure limitée en raison des obstacles pratiques et éthiques mais aussi en raison de résultats plus récents qui ont soulevé la possibilité d'une récupération chez des patients ayant subi le traitement placebo (McRae et coll., 2004). Le choix des candidats cellulaires est aussi complexe puisqu'il existe une multitude de types cellulaires envisageables, mais l'utilisation de cellules souches à caractère pluripotent permettra peut-être, dans un avenir proche, une régénérescence neuronale applicable à plusieurs maladies (SanMartin et Bolongan, 2006).

La neuroprotection est quant à elle une option qui vise les stades précoces de la maladie, empêchant ainsi la mort neuronale de se poursuivre et permettant alors de ralentir ou d'arrêter l'évolution de la maladie. Les effets bénéfiques d'une administration chronique d'un agent neuroprotecteur, la cystamine, ont été rapportés seulement chez un modèle de souris de la maladie de Huntington. Le chapitre 2 du présent mémoire fournit la première évidence des propriétés neuroprotectrices de la cystamine chez un modèle de la maladie de Parkinson. Nos résultats indiquent que l'administration de la cystamine peut prévenir la perte de cellules DAergiques induite par le MPTP et que l'effet maximum est atteint lorsque la cystamine est donnée avant et durant l'induction de la lésion au cerveau. Globalement, cet article démontre le potentiel thérapeutique préventif de la cystamine chez des souris âgées parkinsoniennes. Plus concrètement, des essais cliniques utilisant la cystamine chez un cohorte de patients huntingtoniens a d'ailleurs récemment vu le jour en Europe (Saudou et coll., 2006). Les résultats, prévus pour 2009, vont permettre d'identifier la valeur clinique de ce produit et possiblement son application future, non seulement pour les patients huntingtoniens, mais aussi pour des patients atteints de d'autres maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams JD, Odunze IN (1991) Biochemical mechanisms of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. *Biochem Pharmacol* 41: 1099-1105.
- Ali SF, David SN, Newport GD (1993) Age-related susceptibility to MPTP-induced neurotoxicity in mice. *Neurotoxicology* 14: 29-34.
- Ambani LM, Van Woert MH, Murphy S (1975) Brain peroxidase and catalase in Parkinson disease. *Arch Neurol* 32: 114-8.
- Andersen JK (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat. Med.* 10 (suppl.): S18-25.
- Anderson KE, Mullins J (2003) Behavioral changes associated with deep-brain stimulation surgery for Parkinson's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 3: 306-313.
- Baba M, Nakajo S, Tu PH, Tomita T, Nakaya K, Lee VM, Trojanowski JQ, Iwatsubo T (1998) Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol* 152(4): 879-884.
- Balàs I, Llumiguano C, Dóczy TP (2006) Ablative stereotactic surgery improves manual performance time in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 12(4): 223-7.
- Bailey CD, Johnson GV (2006) The protective effects of cystamine in the R6/2 Huntington's disease mouse involve mechanisms other than the inhibition of tissue transglutaminase. *Neurobiol Aging* 27(6): 871-9.
- Baquet ZC, Bickford PC, Jones KR (2005) Brain-derived neurotrophic factor is required for the establishment of the proper number of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. *J Neurosci* 25(26): 6251-9.
- Beal MF (2001) Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2(5): 325-334.
- Beaudry G, Langlois M, Weppe I, Rouillard C, Levesque D (2000) Contrasting patterns and cellular specificity of transcriptional regulation of the nuclear receptor nerve growth factor-inducible B by haloperidol and clozapine in the rat forebrain. *J Neurochem* 75: 1694-1702.
- Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT (2002) Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays* 24(4): 308-318.

- Bezard E, Gross CE, Fournier MC, Dovero S, Bloch B, Jaber M (1999) Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter. *Exp Neurol* 155(2): 268-273.
- Bel N, Artigas F (1995) In vivo evidence for the reversible action of the monoamine oxidase inhibitor brofaromine on 5-hydroxytryptamine release in rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 351: 475-482.
- Bergman H, Wichmann T and DeLong MR (1990) Reversal of experimental parkinsonism by lesion of the subthalamic nucleus. *Science* 249: 1436-38.
- Bindoff LA, Birch-Machin MA, Cartlidge NE, Parker WD Jr, Turnbull DM (1991) Respiratory chain abnormalities in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 104(2): 203-8.
- Birkmayer W, Danielczyk W, Riederer P (1983) Symptoms and side effects in the course of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 19: 185-199.
- von Bohlen und Halbach O, Minichiello L, Unsicker K (2005) Haploinsufficiency for *trkB* and *trkC* receptors induces cell loss and accumulation of alpha-synuclein in the substantia nigra. *FASEB J* 19(12):1740-42.
- Borrell-Pages M, Canals JM, Cordelieres FP, Parker JA, Pineda JR, Grange G, Bryson EA, Guillemier M, Hirsch E, Hantraye P, Cheetham ME, Neri C, Alberch J, Brouillet E, Saudou F, Humbert S (2006) Cystamine and cysteamine increase brain levels of BDNF in Huntington disease via HSP70 and transglutaminase. *J Clin Invest* 116(5): 1410-1424.
- Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ (1983) A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *PNAS* 80: 4546-4550.
- Chase T, Engber T, Mouradian M (1994) Palliative and prophylactic benefits of continuously administered dopaminomimetics in Parkinson disease. *Neurology* 44: S15-8.
- Chiueh CC, Miyake H, Peng MT (1993) Role of dopamine autoxidation, hydroxyl radical generation, and calcium overload in underlying mechanisms involved in MPTP-induced parkinsonism. *Adv Neurol* 60: 251-8.
- Cicchetti F, Fodor W, Deacon TW, van Horne C, Rollins S, Burton W, Costantini LC, Isacson O (2003) Immune parameters relevant to neural xenograft survival in the primate brain. *Xenotransplantation* 10: 41-9.
- Cohen G (2000) Oxidative stress, mitochondrial respiration, and Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 899: 112-120.

- Correia AS, Anisimov SV, Li JY, Brundin P (2005) Stem cell-based therapy for Parkinson's disease. *Ann Med* 37(7): 487-498.
- Costantini LC, Cole D, Chaturvedi P, Isacson O (2001) Immunophilin ligands can prevent progressive dopaminergic degeneration in animal models of Parkinson' disease. *Eur J of Neuros* 13: 1085-1092.
- Coyle JT, Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 62: 689-695.
- Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39: 889-909.
- Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, Kopin IJ (1979) Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res* 1(3): 249-254.
- Dedeoglu A, Kubilus JK, Jeitner TM, Matson SA, Bogdanov M, Kowall NW, Matson WR, Cooper AJ, Ratan RR, Beal MF, Hersch SM, Ferrante RJ (2002) Therapeutic effects of cystamine in a murine model of Huntington's disease. *J Neurosci* 22: 8942-8950.
- Dexter DT, Sian J, Rose S, Hindmarsh JG, Mann VM, Cooper JM, Wells FR, Daniel SE, Lees AJ, Schapira AH. (1994) Indices of oxidative stress and mitochondrial function in individuals with incidental Lewy body disease. *Ann Neurol* 35: 38-44.
- Di Monte DA, Lavasani M, Manning-Bog AB (2002) Environmental factors in Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 23: 487-502.
- Djordjevic VB (2004) Free radicals in cell biology. *Int Rev Cytol* 237: 57-89.
- Double KL, Ben-Shachar D, Youdim MB, Zecca L, Riederer P, Gerlach M (2002) Influence of neuromelanin on oxidative pathways within the human substantia nigra. *Neurotoxicol Teratol* 24(5): 621-8.
- Dunnett SB, Bjorklund A (1999) Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature* 399: A32-9.
- Fearnley JM, Lees AJ (1991) Ageing and Parkinson's: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114: 2283-2301.
- Fitzmaurice PS, Ang L, Guttman M, Rajput AH, Furukawa Y, Kish SJ (2003) Nigral glutathione deficiency is not specific for idiopathic Parkinson's disease. *Mov Disord* 18(9): 969-976.

- Fornai F, Schluter OM, Lenzi P, Gesi M, Ruffoli R, Ferrucci M, Lazzeri G, Busceti CL, Pontarelli F, Battaglia G, Pellegrini A, Nicoletti F, Ruggieri S, Paparelli A, Sudhof TC (2005) Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(9): 3413-8.
- Forno LS, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW (1993) Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations. *Adv Neurol* 60: 600-8.
- Fox JH, Barber DS, Singh B, Zucker B, Swindell MK, Norflus F, Buzescu R, Chopra R, Ferrante RJ, Kazantsev A, Hersch SM (2004) Cystamine increases L-cysteine levels in Huntington's disease transgenic mouse brain and in a PC12 model of polyglutamine aggregation. *J Neurochem* 91(2): 413-422.
- Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D, Fahn S (2001) Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344(10): 710-9.
- Fumagalli F, Racagni G, Riva MA (2006) Shedding light into the role of BDNF in the pharmacotherapy of Parkinson's disease. *Pharmacogenomics J* 6(2): 95-104.
- Galpern WR, Frim DM, Tatter SB, Altar CA, Beal MF, Isacson O (1996) Cell-mediated delivery of brain-derived neurotrophic factor enhances dopamine levels in an MPP+ rat model of substantia nigra degeneration. *Cell Transplant* 5(2): 225-232.
- Glaser JR, Glaser EM (2000) Stereology, morphometry, and mapping: the whole is greater than the sum of its parts. *J Chem Neuroanat* 20: 115-126.
- Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Richardson RJ (1998) The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology* 50(5): 1346-1350.
- Green H (1993) Human genetic diseases due to codon reiteration: relationship to an evolutionary mechanism. *Cell* 74: 955-956.
- Green JB (1994) Roads to neuralness: embryonic neural induction as derepression of a default state. *Cell* 77: 317-320.
- Greenamyre JT, Sherer TB, Betarbet R, Panov AV (2001) Complex I and Parkinson's disease. *IUBMB Life* 52(3-5): 135-141.
- Greenberg C, Birckbichler PJ, Rice RH (1991) Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J* 5: 3071-3077.

- Heikkila RE, Hess A, Duvoisin RC (1984) Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. *Science* 224: 1451-3.
- Ientile R, Campisi A, Raciti G, Caccamo D, Curro M, Cannavo G, Li Volti G, Macaione S, Vanella A (2003) Cystamine inhibits transglutaminase and caspase-3 cleavage in glutamate-exposed astroglial cells. *J Neurosci Res* 74: 52-9.
- Igarashi S, Koide R, Shimohata T, Yamada M, Hayashi Y, Takano H, Date H, Oyake M, Sato T, Sato A, Egawa S, Ikeuchi T, Tanaka H, Nakano R, Tanaka K, Hozumi I, Inuzuka T, Takahashi H, Tsuji S (1998) Suppression of aggregate formation and apoptosis by transglutaminase inhibitors in cells expressing truncated DRPLA protein with an expanded polyglutamine stretch. *Nat Genet* 18: 111-7.
- Irwin I, DeLanney LE, Langston JW (1993) MPTP and aging. Studies in the C57BL/6 mouse. *Adv Neurol* 60: 197-206.
- Irwin I, Finnegan KT, Delanney LE, Di Monte D, Langston JW (1992) The relationships between aging, monoamine oxidase, striatal dopamine and the effects of MPTP in C57BL/6 mice: a critical reassessment. *Brain Res* 572: 224-231.
- Jain A, Martensson J, Stole E, Auld PA, Meister A (1991) Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(5): 1913-7.
- Jankovic J (2005) Progression of Parkinson disease: are we making progress in charting the course? *Arch Neurol* 62: 351-2.
- Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH (1985) Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *PNAS* 82: 2173-7.
- Jenner P (1993) Altered mitochondrial function, iron metabolism and glutathione levels in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 146: 6-13.
- Jenner P, Olanow CW (1998) Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 44(3 Suppl 1): S72-84.
- Jokay I, Kelemenics K, Gyuris A, Minarovits J (1998) S-methylthio-cysteine and cystamine are potent stimulators of thiol production and glutathione synthesis. *Life Sci* 62: PL27-33.
- Junn E, Ronchetti RD, Quezado MM, Kim SY, Mouradian M (2002) Tissue transglutaminase-induced aggregation of alpha-synuclein: Implications for Lewy body formation in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2047-2052

- Karpuj M, Becher MW, Springer JE, Chabas D, Youssef S, Pedotti R, Mitchell D, Steinman L (2002) Prolonged survival and decreased abnormal movements in transgenic model of Huntington disease, with administration of the transglutaminase inhibitor cystamine. *Nat Med* 8: 143-9.
- Kim K, Kim C, Hwang D, Seo H, Chung S, Hong S, Lim J, Anderson T, Isacson O (2003) Orphan nuclear receptor Nurr1 directly transactivates the promoter activity of the tyrosine hydroxylase gene in a cell-specific manner. *J Neurochem* 85: 622-634.
- Kim KS, Choi SY, Kwon HY, Won MH, Kang TC, Kang JH (2002) Aggregation of alpha-synuclein induced by the Cu,Zn-superoxide dismutase and hydrogen peroxide system. *Free Radic Biol Med* 15;32(6): 544-550.
- Kirik D, Rosenblad C, Burger C, Lundberg C, Johansen TE, Muzyczka N, Mandel RJ, Bjorklund A (2002) Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. *J Neurosci* 22(7): 2780-2791.
- Kish SJ, Morito C, Hornykiewicz O (1985) Glutathione peroxidase activity in Parkinson's disease brain. *Neurosci Lett* 58: 343-6.
- Kovarova H, Pulpanova J (1979) Effect of cystamine on rat tissue GSH level and glutathione reductase activity. *Strahlentherapie* 155(12): 875-8.
- Kühn K, Wellen J, Link N, Maskri L, Lübbert H, Stichel CC (2003) The mouse MPTP model: gene expression changes in dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 17: 1-12.
- Lang AE, Blair RD (1984) Parkinson's disease in 1984: an update. *Can Med Assoc J* 131(9): 1031-7.
- Langlois M, Beaudry G, Zekki H, Rouillard C, Levesque D (2001) Impact of antipsychotic drug administration on the expression of nuclear receptors in the neocortex and striatum of the rat brain. *Neuroscience* 106: 117-128.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219(4587): 979-980.
- Lapointe N, St-Hilaire M, Martinoli MG, Blanchet J, Gould P, Rouillard C, Cicchetti F (2004) Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity. *FASEB J* 18(6): 717-9.
- Lawrence AD, Evans AH, Lees AJ (2003) Compulsive use of dopamine replacement therapy in Parkinson's disease: reward systems gone awry? *THE LANCET Neurology* 2: 595-604.

- Le W, Conneely O, He Y, Jankovic J, Appel S (1999) Reduced Nurr1 expression increases the vulnerability of mesencephalic dopamine neurons to MPTP-induced injury. *J Neurochem* 73: 2218-2221.
- Lee M, Lee H, Lee H, Choi K, Jin B, Sohn S, Lee Y, Ichinose H, Kim S (2002) Overexpression of midbrain-specific transcription factor Nurr1 modifies susceptibility of mouse neural stem cells to neurotoxins. *Neurosci Lett* 15: 74-8.
- Lesort M, Lee M, Tucholski J, Johnson GV (2003) Cystamine inhibits caspase activity. Implications for the treatment of polyglutamine disorders. *J Biol Chem* 278: 3825-3830.
- Levy YS, Stroomza M, Melamed E, Offen D (2004) Embryonic and adult stem cells as a source for cell therapy in Parkinson's disease. *J Mol Neurosci* 24(3): 353-386.
- Levivier M, Przedborski S, Bencsics C, Kang UJ (1995) Intra-striatal 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(12): 7810-7820.
- LeWitt PA (2006) Neuroprotection for Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* (71):113-122.
- Limousin P, Pollak P, Benazzouz A, Hoffmann D, Le Bas JF, Broussolle E (1995) Effect of parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Lancet* 345: 91-5.
- Lindvall O, Rehnström S, Brundin P, Gustavii B, Astedt B, Widner H, Lindholm T, Bjorklund A, Leenders KL, Rothwell JC (1989) Human fetal dopamine neurons grafted into the striatum in two patients with severe Parkinson's disease. A detailed account of methodology and a 6-month follow-up. *Arch Neurol* 46(6): 615-631.
- Lindvall O, Brundin P, Widner H, Rehnström S, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC, Marsden CD (1990) Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* 247(4942): 574-7.
- Lindvall O (2003) Stem cells for therapy in Parkinson's disease. *Pharmacological Research* 47: 279-287.
- Limousin P, Krack P, Pollak P, Benazzouz A, Ardouin C, Hoffmann D (1998) Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med* 339: 1105-1111.
- Lorand L (1996) Neurodegenerative diseases and transglutaminase. *PNAS* 14310-3.
- Lorand L, Conrad SM (1984) Transglutaminases. *Mol Cell Biochem* 58: 9-35.

- Lotharius J, Brundin P (2002) Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat Rev Neurosci* 3(12): 932-942.
- Mandavilli BS, Ali SF, Van Houten B (2000) DNA damage in brain mitochondria caused by aging and MPTP treatment. *Brain Res* 885: 45-52.
- Mann VM, Cooper JM, Krige D, Daniel SE, Schapira AH, Marsden CD (1992) Brain, skeletal muscle and platelet homogenate mitochondrial function in Parkinson's disease. *Brain* 115 (Pt 2): 333-342.
- Mann VM, Cooper JM, Daniel SE, Srai K, Jenner P, Marsden CD, Schapira AH (1994) Complex I, iron, and ferritin in Parkinson's disease substantia nigra. *Ann Neurol* 36(6):876-881.
- Manning-Bog AB, McCormack AL, Li J, Uversky VN, Fink AL, Di Monte DA (2002) The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 277(3):1641-4.
- Marsden C (1994) *Clin Neuropharmacol Suppl* 17:S32-44.
- Mastroberardino PG, Iannicola C, Nardacci R, Bernassola F, De Laurenzi V, Melino G, Moreno S, Pavone F, Oliverio S, Fesus L, Piacentini M (2002) 'Tissue' transglutaminase ablation reduces neuronal death and prolongs survival in a mouse model of Huntington's disease. *Cell Death Differ* 9(9):873-880.
- McRae C, Cherin E, Yamazaki TG, Diem G, Vo AH, Russell D, Ellgring JH, Fahn S, Greene P, Dillon S, Winfield H, Bjugstad KB, Freed CR (2004) Effects of perceived treatment on quality of life and medical outcomes in a double-blind placebo surgery trial. *Arch Gen Psychiatry* 61(4):412-420.
- Mercuri NB, Bernardi G (2005) The 'magic' of L-Dopa : why is it the gold standard Parkinson's disease therapy? *Trends in Pharmacological sciences* 26(7): 341-344
- Moore DJ, West AB, Dawson VL et Dawson TM (2005) Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 28: 57-87.
- Moratalla R, Quinn B, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW, Graybiel AM (1992) Differential vulnerability of primate caudate-putamen and striosome-matrix dopamine systems to the neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(9):3859-3863.
- Moro E, Scerrati M, Romito LM, Roselli R, Tonali P, Albanese A (1999) Chronic subthalamic nucleus stimulation reduces medication requirements in Parkinson's disease. *Neurology* 53 : 85-90.

- Muthane U, Ramsay KA, Jiang H, Jackson-Lewis V, Donaldson D, Fernando S, Ferreira M, Przedborski S (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(2):195-204.
- Nakamura K, Wang W, Kang UJ (1997) The role of glutathione in dopaminergic neuronal survival. *J Neurochem* 52:978-980.
- Olanow CW et Jankovic J (2005) Neuroprotective therapy in Parkinson's disease and motor complications: a search for a pathogenesis-targeted disease-modifying strategy. *Movement disorders* 20(11): p S3-10.
- Oliverio S, Amendola A, Rodolfo C, Spinedi A, Piacentini M (1999) Inhibition of "tissue" transglutaminase increases cell survival by preventing apoptosis. *J Biol Chem* 274:34123-8.
- Pardridge WM (2005) Tyrosine hydroxylase replacement in experimental Parkinson's disease with transvascular gene therapy. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2: 129-138.
- Parent A, Cicchetti F (1997) Anatomy and physiopathology of the basal ganglia. *Neurochirurgie* 43 Suppl 1:33-40.
- Parent A, Hazrati LN (1995a) Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain res Rev* 20 :91-127.
- Parent A, Sato F, Wu Y, Gauthier J, Lévesque M, Parent M (2000) Organization of the basal ganglia : The importance of axonal collateralization. *Trends Neurosc* 23 : 20-7.
- Parker WD Jr, Boyson SJ, Parks JK (1989) Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 26(6):719-723.
- Paxinos G, Watson C (1986) *The rat brain in stereotaxic co-ordinates*. Academic Press San Diego.
- Pearce RK, Owen A, Daniel S, Jenner P, Marsden CD (1997) Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 104(6-7):661-677.
- Perlmann T, Wallen-Mackenzie A (2004) Nurr1, an orphan nuclear receptor with essential functions in developing dopamine cells. *Cell Tissue Res.*;318(1):45-52.
- Perry TL, Yong VW, Jones K, Wright JM (1986) Manipulation of glutathione contents fails to alter dopaminergic nigrostriatal neurotoxicity of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse. *Neurosci Lett* 70(2):261-5.

- Phillips DG (1961) Pallidotomy and thalamotomy in Parkinson's disease. *Gerontol Clin (Basel)*. 3:51-4.
- Piccini P, Turjanski N, Brooks DJ (1995) PET studies of the striatal dopaminergic system in Parkinson's disease (PD). *J Neural Transm Suppl* 45:123-131.
- Pileblad E, Magnusson T, Fornstedt B (1989) Reduction of brain glutathione by L-buthionine sulfoximine potentiates the dopamine-depleting action of 6-hydroxydopamine in rat striatum. *J Neurochem* 52:978-980.
- Pinto JT, Van Raamsdonk JM, Leavitt BR, Hayden MR, Jeitner TM, Thaler HT, Krasnikov BF, Cooper AJ (2005) Treatment of YAC128 mice and their wild-type littermates with cystamine does not lead to its accumulation in plasma or brain: implications for the treatment of Huntington disease. *J Neurochem* 94(4):1087-1101.
- Poirier J, Barbeau A (1985) A catalyst function for MPTP in superoxide formation. *Biochem Biophys Res Commun* 131:1284-9.
- Porritt MJ, Batchelor PE, Howells DW (2005) Inhibiting BDNF expression by antisense oligonucleotide infusion causes loss of nigral dopaminergic neurons. *Exp Neurol* 192(1):226-234.
- Presthus J, Hajba A (1983) Deprenyl (selegiline) combined with levodopa and a decarboxylase inhibitor in the treatment of Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 95:127-133.
- Rajagopalan S, Andersen JK (2001) Alpha synuclein aggregation: is it the toxic gain of function responsible for neurodegeneration in Parkinson's disease? *Mech Ageing Dev* 122(14):1499-1510.
- Ramioul H (1955) Oral administration of cystamine in radiation sickness. *J Radiol Electrol Arch Electr Medicale* 36(3-4):178-181.
- Rascol O, Payoux P, Ory F, Ferreira JJ, Brefel-Courbon C, Montastruc JL (2003) Limitations of current Parkinson's disease therapy. *Ann Neurol* 53 Suppl 3:S3-12; discussion S12-5.
- Ratam RR, Murphy TH, Baraban JM (1994) Macromolecular synthesis inhibitors prevent oxidative stress-induced apoptosis in embryonic cortical neurons by shunting cysteine from protein synthesis to glutathione. *J Neurosci* 14(7):4385-4392.
- Recchia A, Debetto P, Negro A, Guidolin D, Skaper SD, Giusti P (2004) Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *FASEB J* 18(6):617-626.
- Redmond E Jr (2002) Cellular replacement therapy for Parkinson's disease – Where are we today? *The Neuroscientist* 8(5): 457-488.

- de Rijk MC, Breteler MM, Graveland GA, Ott A, Grobbee DE, van der Meche FG, Hofman A (1995) Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: the Rotterdam Study Neurology ;45(12):2143-6.
- Rivest R, Falardeau P, Di Paolo T (1995) Brain dopamine transporter: gender differences and effect of chronic haloperidol. Brain Res 692:269-272.
- Sanchez Juan J (1958) Experience with mechanical pallidotomy in therapy of Parkinson's disease. Rev Clin Esp 68(3):155-160.
- SanMartin A, Borlongan CV (2006) Cell transplantation: Towards cell therapy. Cell Transplantation 15(7):665-673.
- Saucedo-Cardenas O, Quintana-Hau J, Le W, Smidt M, Cox J, De Mayo F, Burbach J, Conneely O (1998) Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. PNAS 95:4013-8.
- Saudou F, Humbert S (2006) Essais cliniques de la cystamine. Institut Curie.
- Schapira AH (2000) Mitochondrial disorders. Curr Opin Neurol. 13(5):527-532.
- Schmued L, ALbertson C, Slikker JW (1997) Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. Brain Research 751:37-46.
- Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J (2000) Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. Eur J Biochem 267(16):4904-4911.
- Schumacher JM, Isacson O (1997) Neuronal xenotransplantation in Parkinson's disease. Nat Med 3(5):474-5.
- Sechi G, Deledda MG, Bua G, Satta WM, Deiana GA, Pes GM, Rosati G (1996) Reduced intravenous glutathione in the treatment of early Parkinson's disease. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 20(7):1159-1170.
- Seroogy KB, Lundgren KH, Tran TM, Guthrie KM, Isackson PJ, Gall CM (1994) Dopaminergic neurons in rat ventral midbrain express brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs. J Comp Neurol 342(3):321-334.
- Serra PA, Sciola L, Delogu MR, Spano A, Monaco G, Miele E, Rocchitta G, Miele M, Migheli R, Desole MS (2002) The neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induces apoptosis in mouse nigrostriatal glia. Relevance to nigral neuronal death and striatal neurochemical changes. J Biol Chem 277:34451-34461.

- Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Jenner P, Marsden CD (1994a) Glutathione-related enzymes in brain in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 36(3):356-361.
- Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, Jenner P, Marsden CD (1994b) Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol* 36(3):348-355.
- Smits SM, Ponnio T, Conneely OM, Burbach JP, Smidt MP (2003) Involvement of Nurr1 in specifying the neurotransmitter identity of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 18:1731-8.
- Société Parkinson du Qc, 2002.
- Sofic E, Lange KW, Jellinger K, Riederer P (1992) Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 142(2):128-130.
- Sonsalla PK, Nicklas WJ, Heikkila RE (1989) Role for excitatory amino acids in methamphetamine-induced nigrostriatal dopaminergic toxicity. *Science* 243:398-400.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388(6645):839-840.
- Swerdlow RH, Parks JK, Miller SW, Tuttle JB, Trimmer PA, Sheehan JP, Bennett JP Jr, Davis RE, Parker WD Jr (1996) Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 40(4):663-671.
- Tanner CM (1992) Occupational and environmental causes of parkinsonism. *Occup Med* 7(3): 503-513.
- Tarsy D, Baldessarini R (1984) Tardive dyskinesia. *Annu Rev Med* 35:605-623.
- Temperli P, Ghika J, Villemure JG, Burkhard PR, Bogousslavsky J, Vingerhoets FJ (2003) How do parkinsonian signs return after discontinuation of subthalamic DBS? *Neurology* 60:78-81.
- Varastet M, Riche D, Maziere M, Hantraye P (1994) Chronic MPTP treatment reproduces in baboons the differential vulnerability of mesencephalic dopaminergic neurons observed in Parkinson's disease. *Neuroscience* 63(1):47-56.
- Vila M, Przedborski S (2003) Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 4(5):365-375.
- Vingerhoets FJ, Villemure JG, Temperli P, Pollo C, Pralong E, Ghika J (2002) Subthalamic DBS replaces levodopa in Parkinson's disease : two-year follow-up. *Neurology* 58:396-401.

- Wang X, Sarkar A, Cicchetti F, Yu M, Zhu A, Jokivarsi K, Saint-Pierre M, Brownell AL (2005) Cerebral PET imaging and histological evidence of transglutaminase inhibitor cystamine induced neuroprotection in transgenic R6/2 mouse model of Huntington's disease. *J Neurol Sci.* 231(1-2):57-66.
- Ward RJ, Dexter D, Florence A, Aouad F, Hider R, Jenner P, Crichton RR (1995) Brain iron in the ferrocene-loaded rat: its chelation and influence on dopamine metabolism. *Biochem Pharmacol* 49(12):1821-6.
- Willoughby J, Glover V, Sandler M (1988) Histochemical localisation of monoamine oxidase A and B in rat brain. *J Neural Transm* 74(1):29-42.
- Wong SS, Li RH, Stadlin A (1999) Oxidative stress induced by MPTP and MPP(+): selective vulnerability of cultured mouse astrocytes. *Brain Res* 836(1-2):237-244.
- Wullner U, Loschmann PA, Schulz JB, Schmid A, Dringen R, Eblen F, Turski L, Klockgether T (1996) Glutathione depletion potentiates MPTP and MPP+ toxicity in nigral dopaminergic neurones. *Neuroreport* 7:921-3.
- Yang MS, Chan HW, Yu LC (2006) Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress. *Toxicology* 226 (2-3): 126-130.
- Youdim MB, Ben-Shachar D, Riederer P (1989) Is Parkinson's disease a progressive siderosis of substantia nigra resulting in iron and melanin induced neurodegeneration? *Acta Neurol Scand Suppl* 126:47-54.
- Youdim MB, Ben-Shachar D, Riederer P (1993) The possible role of iron in the etiopathology of Parkinson's disease. *Mov Disord* 8(1):1-12.
- Zecca L, Tampellini D, Gerlach M, Riederer P, Fariello RG, Sulzer D (2001) Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour. *Mol Pathol* 54(6):414-8.
- Zecca L, Zucca FA, Wilms H, Sulzer D (2003) Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics. *Trends Neurosci* 26(11):578-580.
- Zetterstrom R, Solomin L, Jansson L, Hoffer B, Olson L, Perlmann T (1997) Dopamine neuron agenesis in *Nurr1*-deficient mice. *Science* 276:248-250.
- Zhang J, Graham DG, Montine TJ, Ho YS (2000) Enhanced N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity in mice deficient in CuZn-superoxide dismutase or glutathione peroxidase. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:53-61.

Zhang J, Perry G, Smith MA, Robertson D, Olson SJ, Graham DG, Montine TJ (1999) Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. *Am J Pathol* 154(5):1423-9.