



HAL
open science

Étude des mécanismes d'actions de la stimulation électrique haute fréquence utilisée comme traitement de la maladie de Parkinson.

Ludovic Alazay

► **To cite this version:**

Ludovic Alazay. Étude des mécanismes d'actions de la stimulation électrique haute fréquence utilisée comme traitement de la maladie de Parkinson.. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT: . tel-00258852

HAL Id: tel-00258852

<https://theses.hal.science/tel-00258852>

Submitted on 25 Feb 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER-GRENOBLE 1
SCIENCES TECHNOLOGIE MÉDECINE
École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER

Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement
par

Ludovic ALAZAY

Le 18 décembre 2007

**ÉTUDE DES MÉCANISMES D' ACTIONS DE LA STIMULATION
ÉLECTRIQUE HAUTE FRÉQUENCE UTILISÉE COMME TRAITEMENT
DE LA MALADIE DE PARKINSON**

COMPOSITION DU JURY :

Président : Dr. Jean-Paul ISSARTEL

**Rapporteurs : Pr. Tetiana AKSENOVA
Dr. Catherine NGUYEN**

Examineur : Pr. François BERGER

Membre invité : Dr. Isabelle JONCOUR

**Thèse préparée au Grenoble-Institut des Neurosciences, INSERM U836
CHU de Grenoble, Université Joseph Fourier, Grenoble
Sous la direction du Pr. François BERGER**

ÉTUDE DES MÉCANISMES D' ACTIONS DE LA STIMULATION
ÉLECTRIQUE HAUTE FRÉQUENCE UTILISÉE COMME TRAITEMENT
DE LA MALADIE DE PARKINSON

Résumé

La maladie de Parkinson est une maladie neuro-dégénérative d'hypo-motricité. Des facteurs génétiques et environnementaux ont été mis en évidence dans son apparition. Les traitements reposent sur une approche pharmacologique ou chirurgicale. Le traitement par stimulation cérébrale profonde (SCP) mis au point par le Professeur Benabid a démontré son efficacité.

L'objectif de cette étude est de comprendre les mécanismes d'action de la SCP. Nous avons montré, par une étude du transcriptome par micro-array, que la stimulation électrique à haute fréquence provoque un profil d'expression génique propre. Les modifications de l'expression génique portent essentiellement sur des gènes de la synthèse et dégradation protéique ainsi que de la transcription et maturation des ARN. L'importance des contrôles qualités est mise en avant et nous présentons des moyens d'améliorer la reproductibilité des résultats de micro-array. L'étude a été poursuivie par une approche de l'expression protéique par incorporation de méthionine marquée et par spectrométrie de masse SELDI-TOF. Les résultats montrent une diminution significative de l'expression protéique lors de la stimulation électrique.

Mots clés : maladie de Parkinson, stimulation cérébrale profonde, transcriptome, microarray, protéome.

MOLECULAR MECHANISMS STUDY OF HIGH FREQUENCY
STIMULATION USED AS TREATMENT FOR PARKINSON'S DISEASE.

Abstract

Parkinson's disease is a neurodegenerative disease of hypomotricity. Both genetic and environmental factors are involved in its development as research could state. Pharmacological or surgical treatments can be considered. Deep brain stimulation (DBS) developed by Professor Benabid, is a treatment that proved its efficiency. As a whole, this study intends to analyse how the DBS mechanisms are. A micro-array transcriptomic was done. It enables to highlight that electrical high frequency stimulates a deep change in the genetic expression profile. Major impacts are seen on the expression of genes responsible of protein synthesis and catabolism as well as many acting on RNA transcription and maturation. The importance of quality control is highlighted and techniques to improve reproducibility of micro-array's results are described. A second step analyse proteins' expression through incorporation of radioactive methionin and SELDI-TOF mass spectrometry. Results shown a significant decrease of proteins' expression provoked by the high frequency electrical stimulation.

Key words: Parkinson's disease, deep brain stimulation, transcriptome, microarray, proteome.

Cherchons toujours
et que le fruit de la recherche
ne soit pas la fin de la recherche
Saint Augustin

Remerciements

Tout d'abord je souhaite remercier le Professeur François Berger pour la confiance et la liberté qu'il m'a accordées tout au long de cette thèse qu'il a dirigé dans la continuité de mon DEA.

Je remercie les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger mon travail. Merci au Docteur Jean-Paul Issartel d'avoir accepté de présider ce jury. Merci au Professeur Tetiana Aksenova de l'*Institute for Applied System Analysis (Kyiv Polytechnic Institute)* et au Docteur Catherine Nguyen, du TAGC de Marseille, rapporteurs, pour avoir accepté de lire mon manuscrit si rapidement. Je remercie le Docteur Isabelle Joncour, de l'université Joseph Fourier de Grenoble, pour sa participation à ce jury.

Je tiens à remercier particulièrement Rong Wang Xia et Ali Bouamrani pour leur compétence et le travail qu'ils ont réalisé pour cette thèse.

Cette thèse n'aurait pas été possible sans le soutien financier du Ministère de la Recherche que je remercie.

L'École Doctorale de Chimie et Science du Vivant a toujours été présente, notamment par l'organisation de cours et formations complémentaires au travail de recherche. Je veux remercier, pour leur travail, Serge Perez son directeur et Marc Savasta. Je n'oublie pas non plus Jeanine Di-Marco et sa grande disponibilité.

Au sein du laboratoire j'ai travaillé avec beaucoup de monde et je veux tous les remercier.

Enfin, je veux remercier ma famille et mes amis pour le soutien qu'ils m'ont apporté tout au long de ces années.

Bien sûr, une place particulière pour Estelle, toujours présente à mes côtés.

Sommaire

Chapitre I : Contexte	7
A. La maladie de Parkinson	8
1. Introduction	8
2. Diagnostic et aspects cliniques	9
3. Épidémiologie	11
4. Traitements	13
B. Anatomie des ganglions de la base	28
1. Anatomie et fonctions des ganglions de la base (DeLong 2002)	28
2. Modèle fonctionnel des ganglions de la base	29
C. Mécanismes de neuro-dégénérescence et neuro-protection	32
1. Étiologie de la maladie de Parkinson	32
2. Mécanismes de neuro-dégénérescence	36
D. La stimulation cérébrale profonde	38
1. Introduction (historique)	38
2. Paramètres de la SHF	40
3. Effets thérapeutiques	40
4. Mécanismes d'action de la SCP	41
Chapitre II : Problématique	44
Chapitre III : Matériel et méthodes	45
A. Etudes <i>in vivo</i>	45
1. Animaux	45
2. Prélèvements et traitement des tissus	45
3. Stimulation à haute fréquence <i>in vivo</i>	48
B. Etudes <i>in vitro</i>	49
1. Culture cellulaire	49
2. Stimulation électrique <i>in vitro</i>	50
C. Analyse d'expression génique	53
1. Principe	53
2. Cibles	54

3. Sondes _____	58
4. Hybridation _____	60
5. Révélation _____	61
6. Analyse _____	61
D. Analyse d'expression protéique _____	62
1. Par incorporation de méthionine marquée _____	62
2. Par spectrométrie de masse _____	64
Chapitre IV : Résultats _____	70
A. Premières expériences <i>in vivo</i> _____	70
1. Fixation des tissus et qualité des ARN _____	70
2. Coloration des tissus _____	71
3. Agent de stabilisation _____	72
B. Qualité des ARN et micro-array _____	73
C. Etudes <i>in vitro</i> _____	76
1. Criblage d'expression génique _____	77
2. Analyse de l'expression protéique _____	82
D. Validations <i>in vivo</i> _____	92
Chapitre V : Discussion _____	94
A. Première approche <i>in vivo</i> _____	94
1. Importance du contrôle qualité _____	94
2. Limites technologiques _____	95
B. Étude <i>in vitro</i> _____	96
1. Criblage d'expression génique par micro-array _____	96
2. Analyse de l'expression protéique _____	97
C. Retour <i>in vivo</i> _____	98
Chapitre VI : Conclusion _____	99
Bibliographie _____	102

Chapitre I : Contexte

Cette partie a pour but de donner au lecteur les éléments essentiels sur la maladie de Parkinson (MP) et sa pathophysiologie dans le contexte de cette étude.

Ce chapitre débute par une revue des éléments essentiels sur la MP tels que ses aspects cliniques, diagnostiques et un état des traitements actuels. Vient ensuite une description anatomique et fonctionnelle sommaire des éléments principaux des ganglions de la base avec la description de modèles fonctionnels dans la situation normale et dans le cas pathologique de la MP. Les mécanismes de neuro-dégénérescence dont la littérature fait état lors du développement de la MP sont décrits dans la section suivante qui présente également les causes connues ou soupçonnées de la dégénérescence chez les parkinsoniens. La dernière section de ce chapitre présente plus en détail la stimulation cérébrale profonde (SCP) utilisée comme traitement de la MP.

A. La maladie de Parkinson

1. Introduction

La MP est un trouble moteur qui fut décrit pour la première fois en 1817 par James Parkinson (1755-1827), médecin généraliste anglais, sous le nom de "*shaking palsy*" (paralysie agitante). Sa description était basée sur l'étude de six patients dont un seulement qu'il a suivi sur le long terme (Fahn 2003). C'est Charcot, l'un des premiers neurologues français, qui pérennisa l'appellation de maladie de Parkinson en 1877.

La MP est une maladie neuro-dégénérative progressive qui touche les neurones dopaminergiques de la substance noire. Il a été observé que la vitesse de dégénérescence des neurones de la voie nigro-striée dopaminergique est deux fois plus rapide chez les sujets parkinsoniens que lors du vieillissement normal (Agid 1991).

L'étiologie de la maladie reste obscure malgré de grandes avancées dans la compréhension de sa pathophysiologie. L'immense majorité des cas (95%) sont sporadiques alors que les 5% restant sont d'origine génétique et sont généralement familiaux. Les facteurs environnementaux et génétiques impliqués dans le développement de la maladie seront développés plus loin dans ce chapitre.

Au niveau clinique, la MP se caractérise essentiellement par trois symptômes qui constituent ce qu'il est convenu d'appeler la triade parkinsonienne : la bradykinésie, le tremblement de repos et la rigidité.

La MP touche plus de 0,1% de la population de plus de 40 ans (Siderowf et al. 2003) et l'âge moyen d'apparition se situe entre 55 et 60 ans (Dauer et al. 2003; Mayeux 2003).

La mortalité des malades est de 2 à 5 fois supérieure à celle de la population non atteinte (Bennett et al. 1996; Morens et al. 1996; Louis et al. 1997).

La première percée majeure dans la recherche sur la MP a eu lieu dans les années 1960 lorsque l'hypothèse d'un déficit en dopamine de certaines régions du cerveau a été posée et que le traitement à la lévodopa (L-dopa) a été introduit (Kontakos et Stokes 1999 ; 2000). Avant l'introduction de la dopa-thérapie en 1967, les lésions chirurgicales constituaient le seul traitement envisageable et elles étaient largement pratiquées (Quinn 1999 ; Olanow 2002). Tombées en désuétude au cours des années 70 et 80 à cause de l'efficacité et de la simplicité du traitement à la L-dopa, les procédures chirurgicales ont connues un regain d'intérêt dans les années 90. En effet, d'une part la L-dopa induit de nombreux effets secondaires à long terme, d'autre part les procédures neurochirurgicales se sont développées et améliorées et, enfin, l'utilisation de la stimulation cérébrale profonde (SCP) à haute fréquence (HF) a pu se développer à partir de 1987 suite aux travaux de Benabid (Benabid et al. 1987).

L'amélioration des connaissances du réseau des ganglions de la base a permis de choisir de nouvelles cibles pour la SCP jusqu'à arriver à la stimulation du noyau subthalamique (NST) par Benabid en 1993 (Benabid et al. 1994). Le NST constitue aujourd'hui la cible de prédilection pour les interventions chirurgicales de la MP.

2. Diagnostic et aspects cliniques

Les syndromes parkinsoniens sont définis par une association de six troubles moteurs particuliers : le tremblement de repos, la rigidité musculaire, l'akinésie, une posture fléchie (Figure 1 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**), le phénomène de "*freezing*",



Figure 1. Posture parkinsonnienne typique.

parkinson-plus, dans lesquels le syndrome parkinsonien ne représente qu'une part des symptômes et enfin les maladies neuro-dégénératives familiales (Poewe 1991; Dauer et al. 2003).

Pour parler de MP et non simplement de syndrome parkinsonien il faut que toutes les autres causes ou les autres formes aient été exclues

et une instabilité posturale. Outre ces troubles spécifiques, il existe de nombreuses autres manifestations complémentaires telles que l'hypokinésie (réduction de l'amplitude des mouvements) ou l'hypophonie (diminution du volume de la voix).

Les syndromes parkinsoniens sont classés en 4 catégories (Tableau 1) : le syndrome parkinsonien primaire ou MP au sens strict, les syndromes parkinsoniens secondaires provoqués par des facteurs environnementaux, les syndromes

Tableau 1

Classification clinique des syndrômes parkinsonniens

- **Parkinsonisme primaire**
 - maladie de parkinson (sporadique, familial)
- **Parkinsonisme secondaire**
 - drogues : antagonistes et dépléteurs dopaminergiques
 - héli-atrophie, héli-parkinsonisme
 - hydrocéphalie
 - hypoxie
 - infectieux : post-encéphalitique
 - métabolique : dysfonction parathyroïdienne
 - toxine : Mn, CO, MPTP, cyanide
 - post-traumatique
 - tumoral
 - vasculaire : accidents multiples
- **Syndrômes parkinson-plus**
 - dégénérescence des ganglions cortico-basaux
 - syndrôme de démence : maladie d'Alzheimer, maladie à corps de Lewy diffus, démence fronto-temporale
 - Lytico-Bodig
 - syndrôme atrophique multi-systèmes
 - atrophie pallidale progressive
 - paralysie supranucléaire progressive
- **Maladies neuro-dégénératives familiales**
 - maladie d'Hallervorden-Spatz
 - maladie de Huntington
 - Lubag (dystonie-parkinsonisme lié à l'X)
 - cytopathie mitochondriale avec nécrose striatale
 - neuro-acanthocytose
 - maladie de Wilson

(accident vasculaire cérébral, intoxication chimique...) et qu'il n'y ai pas de signes autres, tels que la démence (Mayeux 2003).

Le diagnostic n'est pas toujours facile à poser puisqu'il est impossible de se fier à un seul test (Kontakos et al. 1999) et environ 25 % des diagnostics sont incorrects (Hughes et al. 1992). Les critères généralement admis sont la bradykinésie (ralentissement des mouvements) et au moins une des trois autres manifestations primaires que sont la rigidité musculaire (résistance à un mouvement passif des membres), le tremblement de repos et des troubles de la posture (Kontakos et al. 1999; Olanow, et al. 2001; Mayeux 2003). La MP idiopathique est caractérisée par l'apparition unilatérale des symptômes (l'asymétrie persistant au cours de l'évolution), par une évolution lente (plus de 10 ans avant que les plus hauts degrés d'incapacité ne soient atteints) et par une réponse positive aux médicaments dopaminergiques (Poewe 1991).

3. Epidémiologie

Les données issues des analyses épidémiologiques de la MP peuvent sembler incohérentes au premier regard du fait de leur hétérogénéité. Il apparaît en effet d'assez grandes différences selon les origines géographiques, ethniques ou environnementales dans lesquelles ont été recrutés les sujets de l'expérience.

Mais si les études ne sont pas en accord sur certains points, elles tendent toutes à démontrer que la MP est une maladie liée à l'âge. Par contre il est difficile de trancher quand à l'influence du sexe. Alors qu'Elbaz trouve une incidence cumulative supérieure chez l'homme (ratio 1,5) (Elbaz et al. 2002) et Baldereschi une incidence deux fois supérieure par rapport aux femmes (Baldereschi et al. 2000), de Rijk n'observe pas de

différence de prévalence entre hommes et femmes (de Rijk et al. 2000). Cette différence pourrait être due à une mortalité supérieure chez l'homme observée dans certaines études (Kontakos et al. 1999 ; Elbaz et al. 2002), mais qui n'est pas toujours constatée (Hely et al. 1999).

3.1. Prévalence

Toutes les études montrent que la prévalence de la MP augmente avec l'âge. Elle est de 0,6 % de la population pour la tranche d'âge 65-69 ans et augmente jusqu'à 2,6 % pour la tranche 85-89 ans (de Rijk et al. 2000). Globalement cela représente 1,8 % de la population de plus de 65 ans, ce qui correspondait à 3 765 000 personnes à travers le monde en 1997 (Kontakos et al. 1999).

3.2. Incidence

Environ 305 000 nouveaux cas sont diagnostiqués par an à travers le monde (Kontakos et al. 1999).

Toutes les études s'accordent également pour constater que l'incidence augmente avec l'âge (Baldereschi et al. 2000 ; de Rijk et al. 2000 ; Tanner et al. 2000 ; Elbaz et al. 2002). Selon les études, l'incidence annuelle varie de 110 à 330 pour 100 000 personnes au-delà de l'âge de 50 ans, puis augmente jusqu'à 400-500 pour 100 000 après 80 ans (Mayeux 2003). Au niveau de la population générale l'incidence annuelle observée pour 100 000 habitants va de 10,8 pour le Comté d'Olmsted (Minnesota, USA) à 17,2 en Finlande (Tanner et al. 2000)

Malgré cette variabilité importante selon les régions du monde, les incidences généralement observées en Europe et aux USA vont de 8 à 13 pour 100 000 habitants (Kontakos et al. 1999).

4. Traitements

La MP est la seule maladie neuro-dégénérative pour laquelle un traitement de substitution à base du neuromédiateur manquant s'est révélé efficace (Le Cavorzin 1999 ; Olanow et al. 2001). Malheureusement ces traitements ne sont que symptomatiques et ne traitent pas les causes de la maladie. De plus, les premiers symptômes n'apparaissent qu'après la perte d'une large part (50 à 60 %) des neurones dopaminergiques de la substance noire, lorsque la concentration en dopamine striatale a chuté de 70 % environ (Agid et Blin 1987). Ceci est dû à des mécanismes de compensation (Zigmond et al. 1990 ; Bezard et Gross 1998), ce qui rend encore plus problématique l'efficacité des traitements sur le long terme. Bien que certains protocoles de recherche cherchent à trouver des stratégies neuro-protectrices, il n'existe pas actuellement de démonstration de l'efficacité de ces thérapeutiques ralentissant la progression de la maladie et on ne peut pas à l'heure actuelle parler de traitement curatif.

4.1. Traitements pharmacologiques

Aujourd'hui encore, 40 ans après le début de son utilisation, la lévodopa (L-dopa) constitue la molécule de choix pour le traitement de la MP. Cependant la nécessité d'un métabolisme intra-neuronal de la molécule en dopamine constitue un point faible de cette thérapie, la dégénérescence neuronale altérant progressivement les capacités de

transformation et de stockage du neuromédiateur. Ceci, associé à d'autres phénomènes, provoque des effets secondaires importants rendant nécessaires d'autres approches thérapeutiques.

Les traitements pharmacologiques de la MP visent à augmenter l'efficacité de la transmission dopaminergique. Historiquement, le premier traitement proposé (de l'extrait de Belladone) visait à diminuer l'hyperactivité cholinergique striatale (Charcot 1872-1873), mais depuis la découverte de la L-dopa l'objectif principal est la restauration du tonus dopaminergique inhibiteur (Figure 2 et Tableau 2).

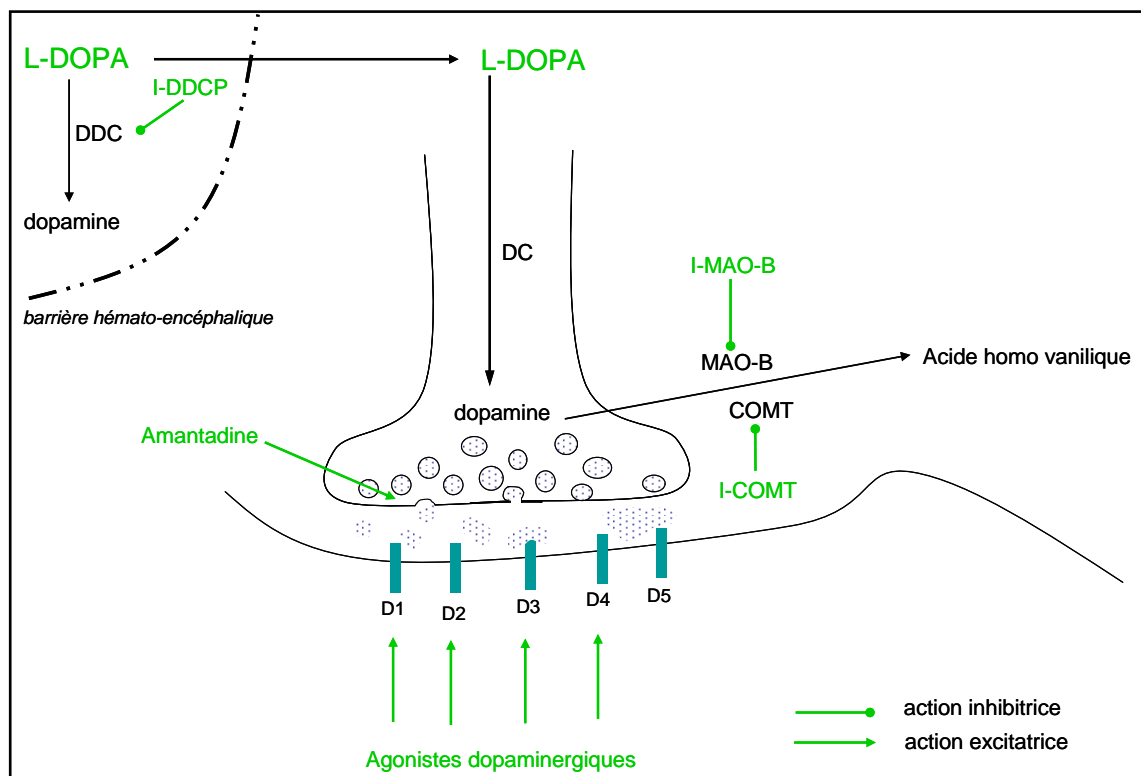


Figure 2. Principaux mécanismes d'actions des médicaments antiparkinsoniens. (I-DDCP, inhibiteur de la dopa-décarboxylase périphérique ; MAO-B, monoamine oxydase B ; IMAO-B, inhibiteur de la MAO-B ; COMT, catéchol-O-méthyl transférase ; I-COMT, inhibiteur de la COMT ; DDC, dopadécarboxylase périphérique ; DC, dopadécarboxylase).

4.1.1. Les anti-cholinergiques

Les anti-cholinergiques (trihexyphénidyl, biperiden, ophénadrine, procyclidine, éthopropazine, diphénhydramine) réduisent l'hyperactivité cholinergique striatale résultant de la réduction du tonus inhibiteur dopaminergique. Ils agissent préférentiellement sur le tremblement et sont de peu d'effet pour les autres manifestations cliniques. Du fait d'effets indésirables périphériques muscariniques, tels que troubles de la mémoire, confusion et hallucinations, ils sont beaucoup moins utilisés depuis l'avènement de la L-dopa.

4.1.2. Stratégies de remplacement dopaminergique

Le but de ces médicaments, généralement associés les uns aux autres est d'augmenter la stimulation des récepteurs dopaminergiques, directement ou par l'augmentation de la biodisponibilité de la dopamine (Figure 2 et Tableau 2).

Tableau 2

Traitements dopaminergiques

- **Précurseurs dopaminergiques**
 - L-DOPA
- **Agonistes dopaminergiques**
 - ergopeptines (bromocriptine, lisuride, pergolide, cabergoline)
 - non-ergopeptines (piribelil, apomorphine, ropinirole, pramipexole)
- **Inhibiteurs enzymatiques**
 - inhibiteurs de la décarboxylase périphérique (tolcapone, entacapone, nitecapone, bensérazide, carbidopa)
 - inhibiteurs du catabolisme dopaminergique (sélégiline, rasagiline, CGP 28014)
- **Activateurs du relargage dopaminergique**
 - amantadine

a. La L-dopa

C'est le médicament le plus courant, car le plus efficace. Il est utilisé depuis la fin des années 1960 (Garcia Ruiz et al. 2002). Il s'agit d'un précurseur de la dopamine (Figure 3) qui est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique. La décarboxylation périphérique limitant la disponibilité du médicament au niveau cérébral et provoquant des effets indésirables (hypotension

artérielle, nausées et vomissements) la L-dopa est fréquemment associée à des inhibiteurs de la décarboxylase périphérique (Olanow et al. 2001). Ces inhibiteurs (bensérazide, carbidopa) permettent de multiplier par 10 la biodisponibilité de la L-dopa au niveau cérébral.

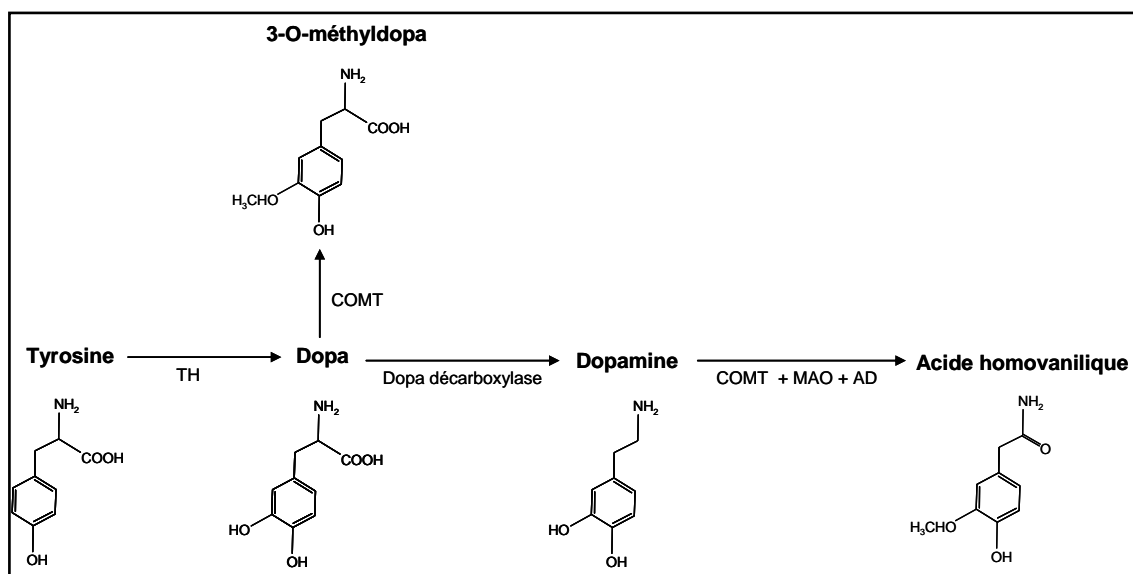


Figure 3. Métabolisme et catabolisme de la dopamine (TH, tyrosine hydroxylase ; COMT, catéchol-O-méthyl transférase ; MAO, monoamine oxydase ; AD, aldéhyde déshydrogénase).

La L-dopa étant le précurseur du neurotransmetteur naturel on pourrait penser qu'il s'agit là du médicament idéal. Il permet en effet la stimulation de tous les types de récepteurs dopaminergiques et est libéré de manière physiologique par les neurones dopaminergiques. Malheureusement, la demi-vie plasmatique de la L-dopa est faible. Ce sont les neurones dopaminergiques survivants qui assurent l'amortissement de cette cinétique grâce à leur capacité de stockage. Mais lorsque la perte neuronale atteint un niveau critique il devient difficile d'assurer une stimulation dopaminergique stable. L'état moteur du patient devient très dépendant de la concentration plasmatique en L-dopa et de nouveaux troubles moteurs apparaissent (fluctuations motrices, dyskinésies).

b. Les agonistes dopaminergiques

Ces molécules vont stimuler directement les récepteurs D2, initialement considérés comme étant seuls impliqués dans les effets moteurs de la dopamine. N'agissant pas par le biais des neurones dopaminergiques, ce traitement n'est pas sensible à leur diminution au cours de l'évolution de la maladie. Ils provoquent beaucoup moins de dyskinésies et de phénomènes "off" que la L-dopa. Étant relativement spécifiques des récepteurs D2 ils ne présentent pas certains des effets secondaires de la L-dopa, mais présentent d'autres inconvénients. En particulier, ils sont beaucoup plus susceptibles de provoquer des hallucinations, confusion et psychoses que la L-dopa. Ces produits sont également nettement moins efficaces que la L-dopa en monothérapie (2000; Rascol et al. 2000; Fahn 2003).

Cependant il semblerait que certains puissent exercer un certain effet neuro-protecteur, ou tout au moins n'induisent pas les complications produites par la L-dopa et certains auteurs suggèrent de commencer la thérapie à base d'agonistes dopaminergiques avant d'utiliser la L-dopa, afin de retarder la survenue des effets secondaires liés à la dopa-thérapie (Olanow et al. 2001).

Les agonistes dopaminergiques sont regroupés en deux classes : les ergopeptines, dérivés des alcaloïdes de l'ergot du seigle et les non-ergopeptines qui sont des composés synthétiques plus spécifiques des récepteurs D2 et donc présentant moins d'effets indésirables.

c. Les inhibiteurs enzymatiques

Leur fonction est d'améliorer la biodisponibilité de la dopamine. Soit par l'inhibition de la décarboxylation périphérique de la L-dopa afin d'augmenter sa biodisponibilité au niveau encéphalique, soit par l'inhibition des enzymes du catabolisme dopaminergique.

d. Complications liées à la dopa-thérapie

Malgré son efficacité, la L-dopa ne constitue pas un traitement totalement satisfaisant. Les effets négatifs des stratégies de remplacement dopaminergiques sont nombreux et importants. Ils peuvent être classés en trois catégories : les complications motrices et neuropsychiatriques associées à la dopa-thérapie chronique, le développement de symptômes non dopa-sensibles et un possible effet neurotoxique de la dopamine.

- Complications motrices

Elles peuvent être regroupées en deux catégories : les fluctuations motrices et les dyskinésies.

Les fluctuations motrices sont constituées par l'alternance entre des périodes pendant lesquelles la fonction motrice est relativement bonne, appelées périodes "*on*", au cours desquelles le malade répond au traitement médicamenteux et des périodes, dites "*off*", de basse motricité pendant lesquelles la réponse aux médicaments est nulle ou mauvaise. Ce phénomène intervient rapidement, après seulement 2 à 5 ans de traitement. Avec la progression de la maladie et l'allongement de la durée du traitement dopaminergique la période d'efficacité de la prise médicamenteuse se raccourcit, de plus de 4 heures elle peut atteindre 60 à 90 minutes seulement. D'autre part le malade peut subir des alternances rapides et imprévisibles entre périodes "*on*" et "*off*" (Obeso et al. 2000 ; Koller et al. 2004). Bien que certains médicaments ou des modifications des

modalités d'administration, comme l'administration continue à la pompe, puissent être utilisés pour réduire les périodes "off" ces variations sont un effet secondaire très gênant pour les patients.

Les dyskinésies induites par la L-dopa sont des mouvements involontaires qui surviennent lorsque le taux plasmatique de L-dopa atteint son pic maximum, c'est-à-dire après la prise médicamenteuse. Ce sont généralement des mouvements choréiformes mais elles peuvent se présenter sous forme de dystonies ou de myoclonies. La fréquence des dyskinésies dopa-dépendantes augmente avec la durée du traitement dopaminergique. Environ 60% des patients développent ce type de complication après 5 ans de traitement (Schrag et al. 2000 ; Fahn 2003). Bien que le mécanisme ne soit pas totalement éclairci, il semble que des stimulations pulsatiles des récepteurs dopaminergiques soit impliquées (Olanow et al. 2000). Ces dyskinésies sont difficiles à traiter, mais la stimulation cérébrale profonde (SCP) et la pallidectomie ont montré leur efficacité, sans doute par la suppression des profils anormaux de potentiels d'action (Koller et al. 2004).

Selon les études, les complications motrices touchent 50 à 90% des parkinsoniens qui ont reçu de la L-dopa pendant 5 à 10 ans (Olanow et al. 2001). Elles sont un problème majeur pour les patients.

- Troubles mentaux

Les thérapies dopaminergiques peuvent induire des confusions, paranoïas, hallucinations visuelles, et des troubles cognitifs (Troster et al. 1995 ; 2002). La pathophysiologie des démences et hallucinations est liée à la progression de la maladie

qui provoque des dommages en dehors du système nigro-strié (*locus ceruleus*, noyau de Meynert, et cortex cérébral). La gestion des hallucinations a été largement améliorée par les traitements avec des neuroleptiques atypiques tels que la clozapine (Koller et al. 2004).

- Neurotoxicité potentielle de la lévodopa

Il existe également une toxicité théorique de la dopamine pour les neurones dopaminergiques (Rajput et al. 1997; Agid 2001). Cette toxicité (Blum et al. 2001) serait le résultat de la production de métabolites oxydatifs (peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyle) lors de la dégradation de la dopamine ainsi que de l'action inhibitrice de la dopamine sur le complexe I mitochondrial (Figure 4). Toutefois, aucune

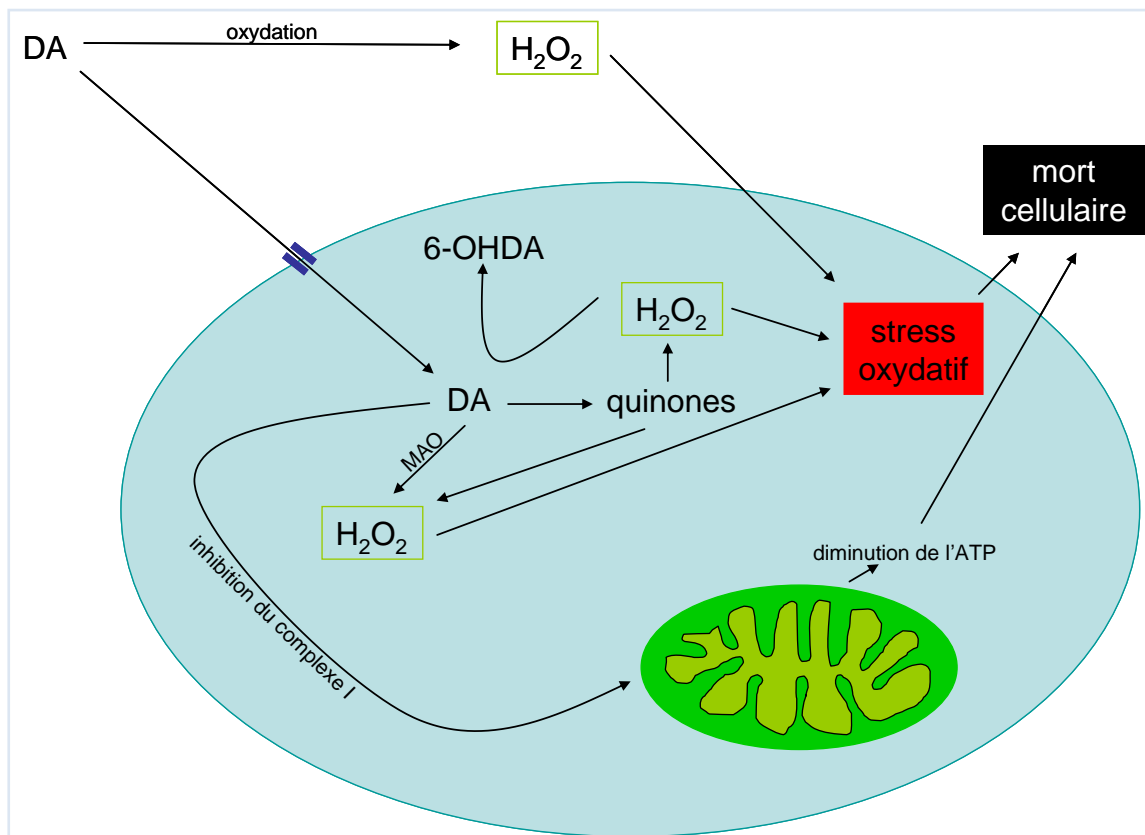


Figure 4. Schéma des principaux mécanismes de toxicité potentielle de la dopamine.

démonstration de cette toxicité n'a pu être montrée, ni chez l'homme, ni chez des modèles animaux. De plus quelques études *in vitro* ont démontré un effet bénéfique de la L-dopa sur les neurones dopaminergiques de la SNc (Agid 2001; Koller et al. 2004), alors que d'autres démontrent une toxicité (Tanaka et al. 1991 ; Walkinshaw et Waters 1995).

Symptômes insensibles à la dopathérapie

•Moteurs

- instabilité posturale
- freezing
- troubles de la parole
- dysphagie

•Mentaux

- démence
- dépression
- apathie

•Dysfonctions du système nerveux végétatif

- constipation
- troubles sexuels
- problèmes urinaires
- transpiration

•Sensitifs

- douleurs
- dysesthésies

•Troubles du sommeil

- fragmentation
- apnées
- syndrome d'impatience des membres inférieurs
- troubles des mouvements rapides de l'oeil

e. Symptômes non dopa-sensibles

Au cours de l'évolution de la maladie de nouveaux symptômes vont se développer (Tableau 3.). Ces nouveaux troubles sont liés à la progression des dégénérescences neuronales et non au traitement médicamenteux. Ils apparaissent au cours des stades avancés de la maladie et ne répondent pas à la L-dopa. Ils sont également peu sensibles aux thérapies chirurgicales (sauf dans le cas de la stimulation du PPN) ou médicamenteuses. Ce sont essentiellement des dysarthries, des

Tableau 3.

dysphagies, des blocages lors des périodes "on", des pertes d'autonomie, des troubles sensitifs, des changements d'humeur ou comportementaux et des pertes cognitives et démences. (Fahn 2003; Koller et al. 2004).

4.2. Traitements chirurgicaux

Les traitements chirurgicaux de la MP peuvent être classés en trois catégories. Les deux premières, dont le principe est lié, tant historiquement que probablement physiologiquement, sont les lésions et la stimulation cérébrale profonde (SCP). La troisième approche qui utilise la chirurgie en est seulement à ses premières étapes de développement, il s'agit de la greffe de cellules associée ou non à la thérapie génique.

4.2.1. Les chirurgies lésionnelles

Comme un certain nombre de découvertes essentielles, c'est le hasard corrélé à l'analyse anatomo-clinique qui a permis de mettre en évidence que certaines lésions du thalamus ont un effet notoire sur les tremblements parkinsoniens. Cette découverte, inespérée à l'époque où aucun autre traitement n'existait pour la MP, a rapidement été mise en application au cours des années 1950. Elle est tombée ensuite en désuétude du fait de l'avènement de la L-dopa. Mais les limites des traitements dopaminergiques, associés aux progrès des méthodes stéréotaxiques et à la meilleure connaissance des circuits des ganglions de la base ont redonné une seconde vigueur à ces techniques au cours des années 1980.

a. La pallidectomie

Réalisée à l'origine pour réduire la rigidité, la pallidectomie est de nouveau pratiquée depuis les années 90 pour limiter les dyskinésies survenant suite à une longue dopa-thérapie (Jankovic et al, 1995), elle permet également une certaine amélioration des autres manifestations parkinsoniennes. La réalisation de lésions bilatérales s'accompagne de nombreux risques, notamment des dommages sur d'autres structures cérébrales (capsule interne, tractus visuel).

b. La thalamotomie

Des études électro-physiologiques ayant mis en évidence une activité neuronale anormale du noyau ventral intermédiaire du thalamus (Vim) chez les patients parkinsoniens sa destruction a été envisagée (Cooper 1965).

L'expérience a montré qu'au sein du thalamus le Vim offre la meilleure efficacité. Mais cette cible souffre de nombreuses limites. Seul le tremblement est traité et environ un

quart des patients ne bénéficie que d'un effet limité ou transitoire (Benabid et al. 1993). Bien que d'autres régions du thalamus permettent d'obtenir des résultats sur la rigidité, ceux-ci restent faibles (Gross et al. 1999). Chez certains patients les dyskinésies induites par la L-dopa sont améliorées (Olanow et al. 2001). De plus, les risques de complications empêchent la réalisation de lésions bilatérales, alors que la maladie affecte généralement les patients de manière bilatérale.

c. La sub-thalamotomie

Alors que la pallidectomie et la thalamotomie ont été mises au point directement chez l'homme, la lésion du NST est le fruit d'études chez le primate (Gross et al. 1999) qui ont permis de mettre en évidence l'effet symptomatique de la lésion du NST. La technique a été mise en application chez l'homme par Obeso en 1997. En éliminant l'hyperactivité du NST (Blandini et al. 1997) la sub-thalamotomie permet d'une part d'obtenir un effet antiparkinsonien bénéfique et d'autre part de réduire les dyskinésies, mais le caractère irréversible de la lésion qui peut provoquer des effets secondaires importants et le risque de lésions périphériques devrait faire préférer les méthodes de stimulation haute-fréquence (Henderson et al. 1999).

4.2.2. La stimulation cérébrale profonde (SCP)

Evolution non destructive et donc réversible des traitements par chirurgie lésionnelle, la SCP sera traitée plus loin dans une partie spécifique.

4.2.3. Les greffes cellulaires

A la différence de la plupart des autres tissus le système nerveux n'a qu'une faible capacité de réparation des dommages subis. Bien qu'il existe des cellules souches

neurales dans le cerveau adulte elles n'ont apparemment qu'une capacité limitée pour générer des neurones fonctionnels en réponse à des pertes neuronales.

Le principe de ce traitement est basé sur plusieurs considérations : la MP est associée à la dégénérescence sélective des neurones nigro-striés dopaminergiques ; les thérapies de remplacement dopaminergique ont un excellent bénéfice clinique ; les neurones dopaminergiques conservent leurs caractéristiques lorsqu'ils sont placés dans leurs conditions physiologiques ; il existe une zone de transplantation clairement définie, le striatum et des études chez des modèles animaux ont démontré une amélioration du syndrome parkinsonien (Olanow et al. 1996 ; Hagell et al. 2001).

Les premiers essais ont été réalisés en 1982 par une équipe suédoise. Il s'agissait d'une autogreffe, dans le noyau caudé, de tissus de la glande surrénale qui exprime la tyrosine-hydroxylase (TH) et peut donc libérer de la dopamine. Mais une forte morbidité postopératoire n'a pas permis à cette technique de se développer.

Plus récemment, des essais ont été réalisés à partir de mésencéphale embryonnaire qui contient de nombreux neurones embryonnaires qui expriment la TH et qui donc synthétisent de la dopamine (Madrado et al. 1990 ; Lindvall 2001).

Les résultats des différents essais réalisés sont encourageants, notamment l'étude réalisée chez un homme (Kordower et al. 1995), décédé d'une cause indépendante 18 mois après la transplantation, qui démontre que la greffe a survécu 18 mois après son implantation et a émis des axones qui font synapse avec les neurones hôtes. Cette étude a également permis de corréler l'augmentation de la capture de fluorodopa révélée par tomographie à émission de positrons avec l'immuno-réactivité TH de la greffe, qui apparaît donc comme un bon indicateur de réussite et de suivi de la greffe.

Les différentes études démontrent une efficacité plus ou moins importante du traitement et Freed a démontré qu'elle est réelle en réalisant une étude en double aveugle comparant la transplantation avec une opération contrôle chez quarante patients (Freed et al. 2001).

Mais aussi prometteuses qu'elles puissent paraître ces thérapeutiques restent, au travers du peu d'essais cliniques randomisés réalisés, de faible efficacité. Cette approche ne va pas sans poser de nombreux problèmes de disponibilité et/ou d'éthique, les greffons étant issus d'embryons. Le recours à des xéno greffes ou à des lignées cellulaires pose encore de nombreux problèmes techniques mais devra être exploré si cette technique devait se généraliser.

4.2.4. Thérapie génique

Cette approche consiste à greffer des cellules modifiées ou à modifier les neurones *in situ* pour suppléer une fonction déficiente (synthèse de dopamine) ou apporter une nouvelle fonction (synthèse de facteurs neurotrophiques).

La thérapie génique repose sur trois éléments : un gène, un vecteur, une cellule cible. La thérapie peut être réalisée par deux approches : *in vivo* ou *ex vivo*. L'approche *ex vivo* est en fait une greffe de cellules modifiées par génie génétique. L'avantage par rapport aux techniques *in vivo* est de ne pas risquer de modifier d'autres cellules que les cellules cibles et de pouvoir sélectionner les cellules modifiées avant de les implanter. Par contre elle souffre des mêmes limites que les techniques de greffes de cellules (survie du greffon, établissement de synapses...). La thérapie génique *in vivo* peut être réalisée à

l'aide de vecteurs viraux (Barkats et al. 1998 ; Horellou et al. 1997), liposomes ou plasmides.

Du fait des mécanismes complexes qui sont à l'origine de la dégénérescence des neurones dopaminergiques et de la variété des effets causés par cette perte neuronale, il existe de très nombreux gènes exploitables et plusieurs localisations de cibles (Burton et al 2003). Les différentes options peuvent être classés en protectrices, restauratrices et correctrices. L'approche protectrice a pour but de bloquer ou limiter la diminution de la population dopaminergique par exemple en ciblant les gènes impliqués dans des formes héréditaires de la MP (synucléine, parkine) ou par un effet anti-apoptotique (bcl-2, inhibiteur Apaf-1) (Mochizuki et al. 2001) ou trophique (GDNF) (Bilang-Bleuel et al. 1997 ; Gill et al. 2003)). L'approche restauratrice peut être associée à la greffe de cellule, elle a alors pour objectif d'augmenter la survie du greffon et de faciliter son interaction avec les structures cibles. Elle peut également consister en la synthèse de dopamine directement au niveau des structures cibles par l'apport du gène de la TH. L'approche correctrice vise à contrecarrer les effets de la diminution du signal dopaminergique, par exemple en corrigeant l'hyperexcitation pathologique du NST en le transformant en noyau GABAergique par transfert du gène de la GAD (Bowers et al, 1997). L'équipe de Kaplitt a testé cette approche par le transfert de la GAD à l'aide d'un vecteur AAV (*adeno-associated virus*) chez le macaque (Emborg et al. 2007), le rat (Luo et al, 2002) et l'homme (During et al. 2001 ; Kaplitt et al. 2007) avec des résultats prometteurs. Ils ont pu montrer l'expression de la GAD au niveau de la cible, mettre en évidence, par tomographie, une augmentation de l'utilisation du glucose au

niveau du NST et surtout une amélioration persistante des symptômes (plus de 12 mois après le traitement chez l'homme).

Malheureusement l'approche par la thérapie génique butte encore sur de nombreux obstacles et certains risques pourraient être sous-estimés (Gluck et al. 2001).

B. Anatomie des ganglions de la base

1. Anatomie et fonctions des ganglions de la base (DeLong 2002)

Le réseau des ganglions de la base est impliqué dans la régulation des fonctions motrices et limbiques. La MP étant due à un dérèglement du fonctionnement normal de ce circuit nous allons le décrire succinctement.

Les ganglions de la base sont un ensemble de quatre noyaux : le striatum, le pallidum, la substance noire et le noyau subthalamique. Contrairement aux autres structures motrices ils n'ont pas de relations directes avec la moelle épinière. Les informations proviennent directement du cortex cérébral alors que les informations sortantes sont envoyées vers le tronc cérébral et vers le cortex préfrontal, pré-moteur et moteur via le thalamus (DeLong 2002).

Il existe deux troubles principaux liés aux ganglions de la base : la chorée de Huntington qui est une pathologie d'hyper-motricité et la MP qui est une pathologie d'hypo-motricité. Ces pathologies sont caractérisées par trois aspects semblables : tremblements et mouvements involontaires, modification de la posture et du tonus musculaire, pauvreté et ralentissement des mouvements volontaires mais sans paralysie.

Il est maintenant bien démontré que la fonction des ganglions de la base n'est pas uniquement motrice, mais comporte une importante part limbique. Des atteintes des ganglions de la base pouvant provoquer des troubles neuropsychiatriques, cognitifs et du comportement.

Les ganglions de la base constituent donc un réseau qui établit des relations essentielles entre le cortex et le thalamus.

2. Modèle fonctionnel des ganglions de la base

Le modèle actuel du circuit des ganglions de la base a été élaboré à la fin des années 80 début des années 90 (Albin et al. 1989 ; DeLong 1990 ; Alexander et Crutcher 1990) et bien qu'il ait été affiné il n'a pas été fondamentalement modifié depuis (Wichmann et DeLong 2003; Linazasoro 2001). La Figure 5 présente le modèle couramment admis.

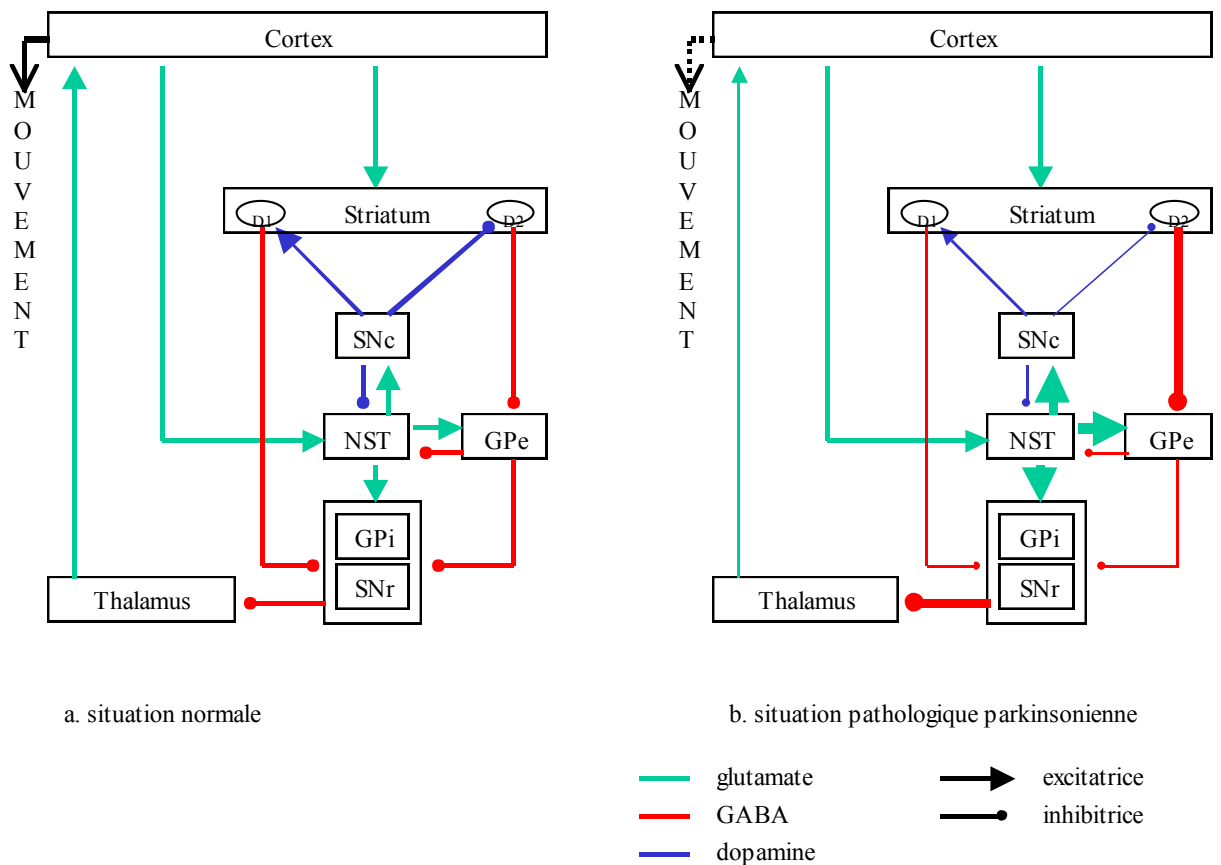


Figure 5. Représentation schématique du circuit des ganglions de la base. Situation normale et parkinsonienne.

2.1. Fonctionnement physiologique normal

La principale structure d'entrée du circuit des ganglions de la base est le striatum qui comprend le noyau caudé et le putamen. Les structures de sorties sont le pallidum interne (GPi), correspondant au noyau entopédonculaire (NPP) chez le rat, et la substance noire réticulée (SNr). Deux voies assurent la connexion entre les structures d'entrée et de sortie : la voie directe et la voie indirecte. La voie directe assure une connexion directe monosynaptique. La voie indirecte passe par le pallidum externe (GPe) et le noyau subthalamique (NST) avec une signalisation polysynaptique. Les neurones striataux impliqués dans le circuit sont GABAergiques et donc inhibiteurs

mais différent selon la voie, directe ou indirecte, dans laquelle ils sont impliqués. Ceux impliqués dans la voie directe possèdent des récepteurs dopaminergiques de type D1 à action activatrice, ainsi que des récepteurs à la tachykinine et à la dinorphine et se projettent vers le GPi et la SNr (Albin et al. 1989; DeLong 1990). Les neurones engagés dans la voie indirecte présentent des récepteurs dopaminergiques de type D2 à action inhibitrice, ainsi que des récepteurs aux enképhalines. Ils projettent leur axone vers le GPe (Araki et al. 1985 ; Reiner et Anderson 1990 ; Brotchie et al. 1991 ; Gerfen et Engber 1992). Le GPe projette à son tour des terminaisons GABAergiques vers le STN d'une part et vers le GPi et la SNr d'autre part (Kita et Kitai 1987 ; Smith et Parent 1988 ; Groenewegen et Berendse 1990 ; Brotchie et al. 1991). Les structures de sorties (GPi/SNr) envoient alors des projections GABAergiques vers le thalamus qui possède des liaisons glutamatergiques en direction du cortex. Le flux de sortie GABAergique est également projeté vers le noyau pédoculopontin.

La dopamine d'origine nigro-striée a deux effets, d'une part elle excite les récepteurs D1 de la voie directe et d'autre part elle inhibe les récepteurs D2 de la voie indirecte. L'activation de la voie directe augmente le flux inhibiteur du striatum vers l'ensemble GPi/SNr ce qui a pour effet de réduire le signal en sortie du circuit des ganglions de la base. L'inhibition des récepteurs D2 réduit l'inhibition du GPe par le striatum. Ce qui provoque une augmentation du flux inhibiteur du GPe vers le STN et donc réduit le signal excitateur du STN vers les noyaux de sortie (GPi/SNr), réduisant donc le flux de sortie des ganglions de la base. Ainsi, bien qu'ayant un effet synaptique opposé le signal dopaminergique de la substance noire a le même effet à la sortie des deux voies directes et indirectes : réduire le niveau de sortie de la boucle des ganglions de la base et donc

réduire le niveau d'inhibition des neurones thalamo-corticaux ce qui facilite les mouvements initiés au niveau du cortex. (Gerfen et al. 1995 ; DeLong 2002).

2.2. Fonctionnement dans une situation de syndrome parkinsonien

Comme nous l'avons déjà décrit, le syndrome parkinsonien est causé par la perte du signal dopaminergique issu de la SNc. La voie directe étant ainsi moins activée le signal inhibiteur généré par GPi/SNr vers le thalamus sera plus important. De même la voie indirecte voit son activité modifiée, il est notamment observé une hyperactivité du STN (Kreiss et al. 1997). Ceci aboutit à augmenter l'activation de GPi/SNr et donc de la même façon, à inhiber le thalamus. La boucle facilitatrice du mouvement cortico-baso-thalamo-corticale est enrayée, ce qui explique les phénomènes moteurs de rigidité et de lenteur des mouvements observés dans le syndrome parkinsonien (Blandini et al. 2000).

C. Mécanismes de neuro-dégénérescence et neuro-protection

La MP est une maladie neuro-dégénérative, l'étude des causes et mécanismes de cette dégénérescence peuvent apporter une meilleure compréhension de la progression de la maladie et des traitements.

1. Etiologie de la maladie de Parkinson

Les causes conduisant au développement de la MP ne sont pas clairement définies, sauf pour quelques rares formes familiales, mais il existe de nombreux facteurs de risque qui ont été identifiés. Ceux-ci peuvent être regroupés en facteurs d'origine génétique et facteurs d'origine environnementale.

1.1. Facteurs génétiques

De nombreuses études épidémiologiques ont révélé un lien entre le risque de MP et des antécédents familiaux (Marder et al. 1996 ; Kontakos et Stokes 1999 ; Scott et al. 2001). Dans le cas de MP familiale plusieurs mutations ont été identifiées notamment au niveau des gènes de l'ubiquitine carboxy-terminal hydrolase L1 (Leroy et al. 1998), park7 (Bonifati et al. 2003), de l' α -synucléine (Polymeropoulos et al. 1997 ; Krüger et al. 1998) et de la parkine (Kitada et al. 2000 ; Lücking et al. 2000). D'autre part certains allèles codant pour diverses protéines ont montré une association avec un risque accru de développement de la maladie, notamment : le cytochrome P450, la glutathion S-transférase, les monoamines oxydases A et B, la N-acétyl transférase, la protéine Tau et la parkine (García de Yébenes 2001 ; Steece-Collier et al. 2002), mais ces allèles sont rares dans la population et ne sont impliqués que dans peu de cas de MP.

Il faut se souvenir que la MP n'est pas essentiellement familiale (seulement 5 à 10% des cas) et que ces facteurs génétiques ont surtout été identifiés dans des cas particuliers de syndrome parkinsonien, notamment chez des patients jeunes (Tanner et al. 1999) et que même dans cette population particulière la recherche d'une mutation n'a pas toujours été concluante (Chan et al. 1998).

Toutefois la découverte de ces mutations a permis de mettre au point des modèles animaux de la MP et de mieux comprendre les causes et l'évolution de la maladie.

1.2. Facteurs environnementaux

Jusqu'à récemment la MP était considérée comme une maladie exclusivement non génétique, malgré la découverte de l'implication de quelques gènes dans son étiologie

elle le reste, ceci explique que de très nombreuses études aient été réalisées pour tenter d'identifier des facteurs de risques liés à l'environnement et au mode de vie des personnes atteintes. La découverte que le MPTP peut être à l'origine de syndromes parkinsoniens a renforcé l'idée selon laquelle la MP peut être causée par des neurotoxines exogènes.

1.2.1. Le milieu rural

Plusieurs études ont recherché un lien entre MP et habitat en milieu rural ou consommation de l'eau de puits, ces études ont donné des résultats contradictoires (Kontakos et Stokes 1999). Par contre plusieurs études ont montré une association entre utilisation d'herbicides et augmentation du risque de MP (Gorell et al. 1998 ; Engel et al. 2001 ; Seidler et al. 1996). Un herbicide, le paraquat, présentant des similitudes avec le MPTP et un pesticide, la roténone (Betarbet et al. 2000), ont pu être mis en cause plus spécifiquement.

1.2.2. L'exposition aux métaux

L'accumulation de métaux, fer et cuivre en particulier, au niveau de la SNc et leur participation aux éventuelles réactions oxydatives toxiques a amené à étudier le rôle éventuel de ceux-ci dans l'étiologie de la MP. Outre le fer et le cuivre, l'implication du manganèse, du mercure, du plomb, du zinc, seuls ou en associations a été testée au cours d'études variées (Seidler et al. 1996 ; Kontakos et Stokes 1999 ; Di Monte 2003). Malheureusement les résultats sont souvent peu significatifs et se contredisent parfois.

1.2.3. Autres facteurs environnementaux

Les produits de traitement du bois, les solvants, les traumatismes crâniens pourraient également, ainsi que de nombreux autres, être des facteurs de risque de développement de la MP.

1.3. En résumé

L'étiologie de la MP reste donc obscure bien que des facteurs variés aient pu être mis en cause, mais depuis quelques années plusieurs études montrent un risque accru dans le cas d'associations particulières entre des facteurs environnementaux et certaines variantes alléliques ou combinaisons alléliques. Par exemple l'allèle GSTP1-1 de la glutathione transférase associé à une exposition aux pesticides augmente le risque de développer la MP (Menegon et al. 1998 ; Aoyama et al. 2001).

L'origine de la MP est donc largement multifactorielle avec de très nombreuses causes étiologiques agissant indépendamment ou concomitamment et plusieurs mécanismes peuvent amener la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc. Le rôle de l'hérédité dans l'étiologie de la MP semble concerner moins la transmission de la maladie, elle-même, que la transmission de facteurs de susceptibilité, tels que des enzymes délétères. L'éventualité d'une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux est l'hypothèse étiologique la plus acceptable : une vulnérabilité génétiquement programmée mise en présence d'un agent potentiellement toxique pourrait induire les processus dégénératifs.

2. Mécanismes de neuro-dégénérescence

De nombreuses études ont été réalisées sur la pathogénèse de la MP et cherchent à élucider les mécanismes de la mort des neurones dopaminergiques. Il existe en effet un espoir que de telles données puissent permettre la mise au point de nouvelles thérapies interférant avec ces mécanismes, même si l'étiologie spécifique reste inconnue.

Les mécanismes possibles entraînant la dégénérescence des neurones dopaminergiques sont nombreux. On peut citer l'augmentation du niveau de fer, celui de la monoamine oxydase (MAO-B), le stress oxydatif, le déficit énergétique, des mécanismes d'inflammation, l'excito-toxicité glutamatergique, la synthèse d'oxyde nitrique, la conformation protéique anormale et l'agrégation de ces protéines, la diminution de l'expression de facteurs trophiques, un déficit en antioxydants tels que le glutathion, des anomalies de la régulation calcique (Dauer et Przedborski 2003 ; Mandel et al. 2003) etc. Bien que ces mécanismes de neuro-dégénérescence soient nombreux les résultats récents semblent suggérer qu'il existerait deux mécanismes clés. Les mécanismes cités ci-dessus seraient la conséquence de ces deux dysfonctionnements primaires.

Le premier de ces mécanismes clés serait lié au mauvais repliement et à l'agrégation de protéines qui conduiraient à la mort des neurones dopaminergiques de la SNc.

Le second est basé sur un dysfonctionnement mitochondrial qui provoque un stress oxydatif amenant la mort neuronale. Dawson a relié ces deux mécanismes qui forment ainsi les différentes étapes d'un même processus (Dawson et Dawson 2003).

Les éléments de ce mécanisme global sont : un déficit du complexe I mitochondrial, la synthèse d' α -synucléine et un défaut du système de dégradation ubiquitine-protéasome.

Le déficit du complexe I mitochondrial semble jouer un rôle prépondérant et pourrait être à l'origine des deux mécanismes suivants.

2.1. Déficit du complexe I mitochondrial

La découverte que le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) pouvait provoquer l'apparition de syndromes parkinsoniens a mis en avant qu'un défaut de la phosphorylation oxydative peut jouer un rôle dans la pathogénèse de la MP (Vila et Przedborski 2003). En effet, le MPTP bloque la chaîne respiratoire mitochondriale en inhibant le complexe I (Nicklas et al. 1985 ; Dauer et Przedborski 2003). Depuis, la mise en évidence de syndromes parkinsoniens suite à l'exposition au paraquat (Betarbet et al. 2000) a renforcé cette hypothèse majeure. De nombreuses études ont ainsi mis en évidence un déficit mitochondrial au niveau du complexe I chez des patients atteints de MP sporadique (Shapira et al. 1998 ; Orth et Schapira 2001 ; Sherer et al. 2002). Il existe également une preuve génétique qu'une altération de l'activité du complexe I peut jouer un rôle dans le développement de la MP : un polymorphisme conduisant au remplacement d'une thréonine par une alanine dans la NADH-déshydrogénase 3 du complexe I diminue significativement le risque de développer la MP (van der Walt et al. 2003).

Le MPTP tue les neurones dopaminergiques de manière spécifique car le MPP⁺, le métabolite actif du MPTP, pénètre dans les corps cellulaires via les transporteurs de la dopamine (Vila et Przedborski 2003).

Le complexe I est un élément clé de la chaîne respiratoire mitochondriale qui est la source majeure de synthèse de l'ATP cellulaire. Les défauts du complexe I provoquent

une augmentation des radicaux libres et de la sensibilité à l'excito-toxicité glutamatergique (Sherer et al. 2002).

D. La stimulation cérébrale profonde

1. Introduction (historique)

La stimulation cérébrale profonde (SCP) est une évolution non lésionnelle des techniques chirurgicales ablatives. Elle consiste en l'implantation d'électrodes de stimulation chronique au niveau de la structure cérébrale cible (Figure 6) en se guidant par les techniques d'IRM, de ventriculographie et d'électrophysiologie (enregistrement et stimulation par microélectrodes). L'électrode est reliée à un système de stimulation électrique généralement implanté au niveau sous-claviculaire (Figure 7).

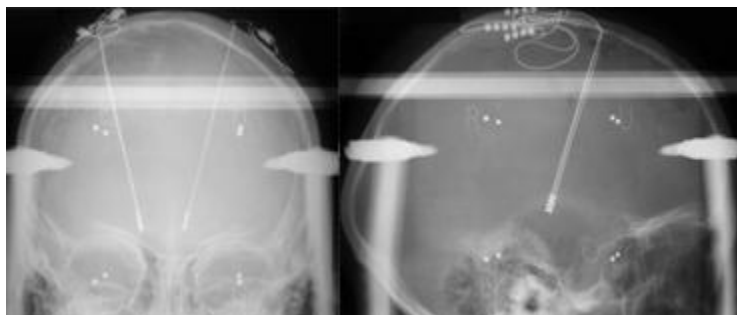


Figure 7. Radiographie montrant l'implantation bilatérale d'électrodes.

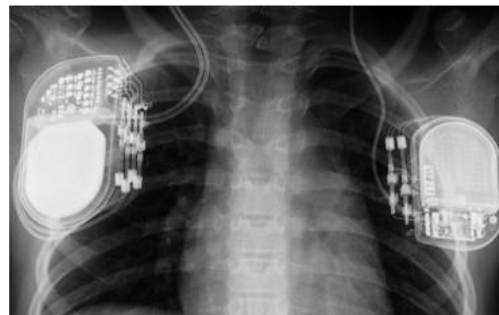


Figure 6. Radiographie présentant l'implantation des stimulateurs.

L'efficacité des méthodes ablatives est limitée, le caractère lésionnel, et donc irréversible, de ce traitement pouvant amener des complications motrices et neuropsychologiques, particulièrement lors de lésions bilatérales (Bravo et al, 1967), d'autre part il peut apparaître des récurrences dans le cas de lésions insuffisantes (Cooper et al, 1965). L'investigation électro-physiologique des cibles au cours du processus

opératoire a permis de mettre en évidence la suppression du tremblement lors de la stimulation à haute fréquence du Vim (Benabid et al. 1987 ; 1989 ; 1996 ; 2002). Cette méthode thérapeutique non destructrice et pouvant être qualifiée de fonctionnelle a été développée et appliquée par Benabid à Grenoble. Contrairement aux méthodes ablatives qui présentent des risques d'effets indésirables irréversibles, la SHF est réversible et modulable.

Tout d'abord mise au point au niveau du thalamus (Benabid et al, 1987 et 1989), la SCP a ensuite été appliquée au pallidum (Siegfried et Lippitz, 1994 ; Krack et al, 1998¹) puis au noyau subthalamique suite à la mise en évidence de son rôle central dans la MP (Limousin et al 1995 ; Benabid et al, 1998 ; Krack et al, 1998² ; Benabid et al 2000 ; Krack et al. 2003).

L'efficacité remarquable du traitement par SHF du NST en fait aujourd'hui le traitement de référence pour les formes avancées de la MP (Benabid et al. 2003).

D'autres cibles apparaissent comme le PPN pour les symptômes axiaux.

Parallèlement à la découverte de nouvelles cibles pour le traitement de la MP il a été envisagé avec succès d'avoir recours à la stimulation cérébrale profonde pour traiter d'autres affections, certaines pouvant se rapprocher de la MP comme les dystonies (Sun et al. 2007) ou d'autres, notamment l'épilepsie (Krauss et Koubeissi 2007), les troubles obsessionnels compulsifs (Lipsman et al. 2007), les douleurs chroniques (Rasche et al. 2006).

2. Paramètres de la SHF

Les électrodes de stimulation chroniques comportent quatre plots de stimulations possibles. Le choix de l'emplacement de l'électrode et du plot de stimulation ayant été déterminés au cours de l'intervention chirurgicale en recherchant le meilleur rapport bénéfices/effets secondaires, les paramètres de la stimulation peuvent ensuite être réglés et réajustés par le neurologue (Benabid et al. 1998, Limousin et al. 1995 et 1998).

Les paramètres sont en général :

- type de stimulation : cathodique monopolaire
- fréquence des impulsions : 130 à 185 Hz
- durée des impulsions : 60 à 120 μ s
- tension : 1 à 3 Volts

L'efficacité de la SCP dépend de la fréquence (Benabid et al 1991, 1994, Moro et al 2002). La fréquence de stimulation efficace au niveau du NST est de 100 Hz au minimum, elle est supérieure à 80 Hz pour le pallidum. Il y a une relation linéaire entre l'intensité de stimulation et les effets qui vont de la diminution des symptômes jusqu'à l'apparition de mouvements anormaux. Par contre, la durée de l'impulsion n'a pas d'effet majeur.

3. Effets thérapeutiques

La SCP au niveau du NST améliore largement la qualité de vie des patients puisqu'elle agit sur tous les aspects de la triade parkinsonienne : tremblement, rigidité et akinésie. Les premiers effets bénéfiques surviennent dans les minutes qui suivent le début de la stimulation (Benabid et al. 1994). Sur le long terme la SCP est plus stable que le

traitement à la L-dopa, fluctuations motrices et dyskinésies devenant mineures (Krack et al. 2003).

4. Mécanismes d'action de la SCP

Les mécanismes par lesquels la SCP produit cet effet thérapeutique si important sont très discutés et finalement assez peu étudiés. La stimulation ayant un effet thérapeutique similaire à celui de la lésion de la structure cible, cela suggère une hypothèse inhibitrice. Mais la stimulation électrique d'une structure cérébrale étant généralement considérée comme excitatrice il existe une importante polémique entre les tenants de l'inhibition et ceux de l'activation. Les résultats des différentes études menées étant souvent discordants il est important de les revoir en détail.

Il y a trois angles d'approche différents et complémentaires qui ont été utilisés pour comprendre les mécanismes de la SCP : l'électrophysiologie, la neurochimie et la biologie moléculaire.

4.1. Les données de l'électrophysiologie

Dans des modèles lésionnels de la MP il a été décrit une hyperactivité électrophysiologique des neurones glutamatergiques du NST, associée à une hyperactivité des structures de sortie de la boucle des ganglions de la base (SNr et GPi ou noyau entopédoculopontin chez le rat). La lésion ou la SHF (à une intensité supérieure à 300 μ A) du NST entraîne, chez le rat 6-OHDA une diminution de l'activité basale du noyau entopédoculopontin et une augmentation de l'activité du pallidum (Burbaud et al. 1995 ; Benazzouz et al. 1995). Une diminution de l'activité pallidale a également été observée suite à la lésion du NST chez des singes MPTP (Hamada et al 1992 ; Guridi et

al 1994). D'autres études confirment ces résultats au niveau du NST et du GPi (Boraud et al 1996 ; Dostrovsky et al 2000 ; Magarinos et al 2002).

Par contre Hashimoto montre une activation des fibres efférentes du NST vers le GPe et le GPi chez le singe MPTP lors de stimulations supérieures à 2V (Hashimoto et al 2003).

D'autres études montrent une étonnante association entre activation et inhibition (Garcia et al 2003). Cette étude a été réalisée sur tranche de tissu déplétée en dopamine. La stimulation provoque un double résultat : premièrement une inhibition de l'activité spontanée du NST puis l'apparition d'une activité induite par la stimulation constituée de bouffées de potentiels d'action (PA) d'une fréquence de 64 à 84 Hz. Cet effet réversible semble être généré par l'activation des canaux Na^+ et Ca^{2+} de type L et est non sensible à la suppression GABAergique ou aminergique. Dostrovsky et Magarinos n'ont pas observé cet effet, probablement parce qu'ils ont utilisés des amplitudes de stimulation plus faibles qui ne permettaient pas la génération de PA par activation des canaux Na^+ .

Malgré la mise au point de nouveaux matériels de mesure et d'algorithmes d'analyse il reste difficile de s'affranchir totalement des artefacts de stimulation.

4.2. Les données de la neurochimie

Différentes études ont été faites soit avec des dosages par micro-dialyse soit par tomographie par émission de positrons (TEP) avec du [^{11}C]-raclopride.

Les expériences de micro-dialyse montrent une augmentation des métabolites de la dopamine et une augmentation systématique du glutamate chez l'animal. Cette

augmentation n'est pas observée chez l'homme par les études par TEP. La micro-dialyse chez l'homme montre même une diminution du glutamate. Il est possible que les canules de micro-dialyse, qui sont de dimension relativement importante, provoquent chez l'animal, une lésion qui serait à l'origine de cette augmentation du glutamate observée.

L'exploration du rôle des voies GABAergiques et glutamatergiques dans les effets de la SCP a été faite par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques. Là encore les résultats sont contradictoires.

Un effet neuro-protecteur a été observé au niveau de la SNr suite à la lésion ou à la stimulation du NST (Piallat et al 1996 ; Saji et al 1996 ; Nakao et al 1999 ; Carvalho et Nikkhah 2001 ; Paul et al. 2004 ; Wallace 2004). L'hypothèse est qu'il est dû à la suppression des efférences glutamatergiques du NST vers la SNr qui auraient un effet excito-toxique. Les essais de thérapie génique montrant l'intérêt du transfert du gène de la GAD dans le NST vont également dans ce sens.

4.3. Les données de la biologie moléculaire

Il existe peu de travaux ayant étudié les mécanismes de la SCP par des approches de biologie moléculaire. L'équipe de Kerkerian-Le Goff a montré que la SHF induit l'expression de c-fos dans le NST et diminue celle de la cytochrome-oxydase. Ils ont également montré que l'augmentation de GAD67 provoquée par le 6-OHDA chez le rat est neutralisée au niveau de la SNr et du noyau entopédoculopontin mais pas du pallidum (Salin et al 2002 ; Bacci et al 2004).

Chapitre II : Problématique

La stimulation cérébrale profonde (SCP) est aujourd'hui un traitement majeur de la maladie de Parkinson et malgré sa très grande efficacité, ses mécanismes d'action restent obscurs. La polémique demeure vive entre les tenants de l'inhibition et ceux de l'activation.

À l'examen des articles publiés il ne semble pas y avoir d'éléments définitifs pour répondre à cette question. Les données électro-physiologiques restent sujettes à caution du fait des difficultés à s'affranchir totalement des artefacts de stimulation. Les expériences de dialyse sont peut-être influencées par des lésions causées par le matériel. Enfin, la transposition des paramètres de stimulation utilisés chez l'homme vers l'animal ou des modèles *in vitro* est difficile à réaliser. Il n'existe pas de consensus à l'heure actuelle et la différence des paramètres pourrait expliquer la discordance apparente des résultats entre les études.

Nous nous sommes donc orientés vers une approche globale, sans a priori, afin d'étudier l'effet de la stimulation sur les cellules. Pour cela nous avons mené une approche par analyse du transcriptome pour ensuite confirmer et affiner les résultats obtenus par d'autres méthodes.

Chapitre III : Matériel et méthodes

A. Etudes *in vivo*

1. Animaux

Les animaux utilisés sont des rats Wistar mâles ou des souris. Ils sont maintenus par groupe dans des cages adaptées avec accès à volonté à l'eau et aux granulés de nourriture, dans un local aux conditions contrôlées, conformément aux réglementations en vigueur. Chaque manipulation est réalisée de façon à limiter au maximum le stress et la souffrance des animaux.

2. Prélèvements et traitement des tissus

2.1. Fixations

2.1.1. *Perfusion au PFA*

Immédiatement après la fin de la stimulation l'animal est placé sur le dos pour permettre l'ouverture de la cage thoracique afin d'accéder au cœur. Une incision est pratiquée à la base du ventricule gauche pour introduire un cathéter jusqu'à l'aorte ascendante. Le cathéter est fixé par un clamp. L'aorte descendante est également clampée. Une incision est pratiquée dans l'oreillette droite pour faire circuler du sérum physiologique pour éliminer le sang du cerveau. L'animal est ensuite perfusé par la même voie avec du PFA 4% pour fixer les tissus.

Après décapitation de l'animal, le cerveau est extrait de la boîte crânienne puis incubé dans du PFA 4% à 4°C pendant 4h. Le cerveau est ensuite transféré dans une solution de sucrose à 20% et laissé à 4°C jusqu'à ce qu'il descende au fond du tube par suite de la saturation des tissus. Le cerveau peut ensuite être congelé et conservé à -80°C.

2.1.2. Congélation

L'animal est décapité immédiatement après la fin de la stimulation. Le cerveau est rapidement extrait de la boîte crânienne et congelé dans des vapeurs d'azote liquide. Il est ensuite conservé à -80°C.

2.2. Colorations

2.2.1. Coloration rapide RAL555

Cette coloration est réalisée avec le kit de coloration RAL555 (Réactifs RAL, Martillac, France)

Les lames histologiques portant les coupes sont plongées cinq fois une seconde dans trois bains successifs. Le premier est un fixateur à base de méthanol, le second est un mélange de fixation et coloration à base d'éosine et de PFA. Le dernier est une solution de coloration contenant du bleu de méthylène. Les lames sont ensuite rincées à l'eau.

2.2.2. Coloration à l'hématoxyline

Les coupes sont d'abord fixées par un bain de deux minutes dans de l'éthanol à 70% puis rincées à l'eau et colorées deux minutes à l'hématoxyline de Harris (réactifs RAL). Les lames sont ensuite rincées à l'eau et déshydratées par un traitement d'une minute à l'éthanol 70% puis une minute à l'éthanol pur.

2.2.3. *Immuno-histochimie anti-tyrosine hydroxylase*

Après une fixation de deux minutes à l'éthanol 70% les lames histologiques sont traitées pendant cinq minutes avec une solution de saturation composée de PBS de Dulbecco stérile (Life Technologies, Paisley, Écosse) et de 3% d'albumine sérique bovine stérilisée ou de 1% de lait en poudre écrémé. L'incubation de cinq minutes avec l'anticorps primaire (anticorps monoclonal de souris anti-tyrosine hydroxylase, clone TH-16, Sigma, Saint-Louis, USA) dilué dans la solution de saturation est suivie de cinq lavages d'une minute avec la solution de saturation. Les coupes sont ensuite incubées cinq minutes en présence de l'anticorps secondaire (anticorps de lapin anti-IgG de souris, couplé à la peroxydase) et lavées cinq fois comme précédemment. Le marquage est révélé avec le kit substrat peroxydase DAB (Vector, Burlingame, USA). L'intensité du marquage est contrôlée en direct sous la loupe binoculaire et la réaction est stoppée par un rinçage à l'eau. Les coupes sont enfin déshydratées par un passage d'une minute dans de l'éthanol 70% puis une minute dans de l'éthanol 100%.

2.3. Traitement de préservation des ARN

Pour améliorer la protection des ARN vis-à-vis des RNases les coupes sont traitées avec du *RNA later* (Ambion, Austin, USA) avant d'être colorées. L'incubation en présence de *RNA later* doit être de trois minutes au minimum, mais peut être prolongée sans dommage plusieurs heures à température ambiante. Les lames doivent ensuite être rincées soigneusement à l'eau puis colorées comme décrit précédemment.

3. Stimulation à haute fréquence *in vivo*

Après anesthésie par injection intra-péritonéale d'hydrate de chloral à 4% (1mL/100g de masse corporelle), l'animal est fixé dans un cadre stéréotaxique. Après incision de la peau du crâne, le crâne est percé à l'aide d'une mini foreuse. L'électrode de stimulation est ensuite implantée dans le cerveau selon les coordonnées stéréotaxiques de la cible.

Le courant électrique de stimulation est un courant monophasique carré bipolaire de 500 μ A avec une durée d'impulsion de 60 μ s à une fréquence de 130 Hz (soit des intervalles de 7,7 ms (Figure 8). Il est délivré par un ensemble générateur-isolateur. Le second pôle de stimulation est constitué soit en plaçant l'animal sur une grille métallique soit par une pince au niveau de la patte antérieure ipsilatérale. La stimulation est maintenue pendant une durée de trois heures. Il est en effet difficile de maintenir l'anesthésie plus longtemps sans risque de mort de l'animal.

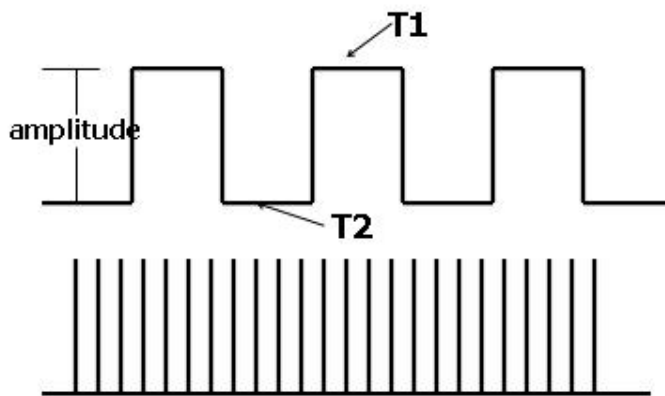


Figure 8. Stimulation monophasique carrée. $T1=60\mu s$; $T2=7,7 ms$; amplitude= $500\mu A$.

B. Etudes *in vitro*

1. Culture cellulaire

1.1. Lignée cellulaire PC12

La lignée PC12 a été établie en 1976 (Greene et Tischler, 1976) à partir d'une tumeur de la glande surrénale (phéochromocytome) de rat. Elle répond au NGF en développant un phénotype neuronal. Ces cellules synthétisent et sécrètent des catécholamines (dopamine, adrénaline et noradrénaline) ce qui en fait un modèle pour les études de neurobiologie.

Ces cellules sont cultivées en monocouche adhérente dans un milieu RPMI 1640 84% (SIGMA-Aldrich, France), supplémenté à 10% en sérum de cheval, 5% en sérum de veau fœtal, 200 mM de L-Glutamine et d'un mélange de 100 U.mL⁻¹ de pénicilline et 50 µg.mL⁻¹ de streptomycine.

1.2. Lignée cellulaire GH3

La lignée GH3 a été établie en 1965 par Tashjian, à partir d'une tumeur pituitaire d'une femelle rat Wistar-Furth de 7 mois (Tashjian et al, 1968). Cette lignée a la propriété de produire des facteurs de croissance et de sécréter de la prolactine. Nous l'avons obtenue de la collection ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, USA).

Les cellules GH3 sont cultivées en monocouche adhérente dans un milieu Ham's F10 (SIGMA-Aldrich, France) 81,5%, supplémenté à 15% en sérum de cheval (GIBCO, Invitrogen France), 2,5% en sérum de veau fœtal (SIGMA-Aldrich, France), 200 mM

L-Glutamine (Bio-Whittaker, France) et d'un mélange de 100 U.mL⁻¹ de pénicilline et 50 µg.mL⁻¹ de streptomycine (GIBCO, Invitrogen France).

1.3. Conditions de culture

Les cultures sont réalisées en incubateur à 37°C, en atmosphère humide et à 5% de CO₂. Lorsque la confluence ou la densité cellulaire sont suffisantes, les cellules adhérentes sont détachées à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA (0,25%-1mM). Elles sont comptées à l'aide d'un hématimètre de Neubauer avec exclusion au bleu Trypan et réensemencées à la densité désirée ou bien stockées dans l'azote liquide dans un milieu cryo-protecteur (milieu de culture supplémenté à 5% de DMSO (v/v)).

2. Stimulation électrique *in vitro*

2.1. Montage expérimental

Le montage expérimental (modifié d'après Brevet et al, 1976) a été adapté à différents supports de culture cellulaire : boîte de Pétri de 10 cm de diamètre, plaques 12 ou 24 puits et lames de cultures.

Pour les plaques multi-puits les puits de culture sont reliés en série par des ponts en titane qui assurent le passage du courant électrique d'un puits à l'autre (Figure 9).

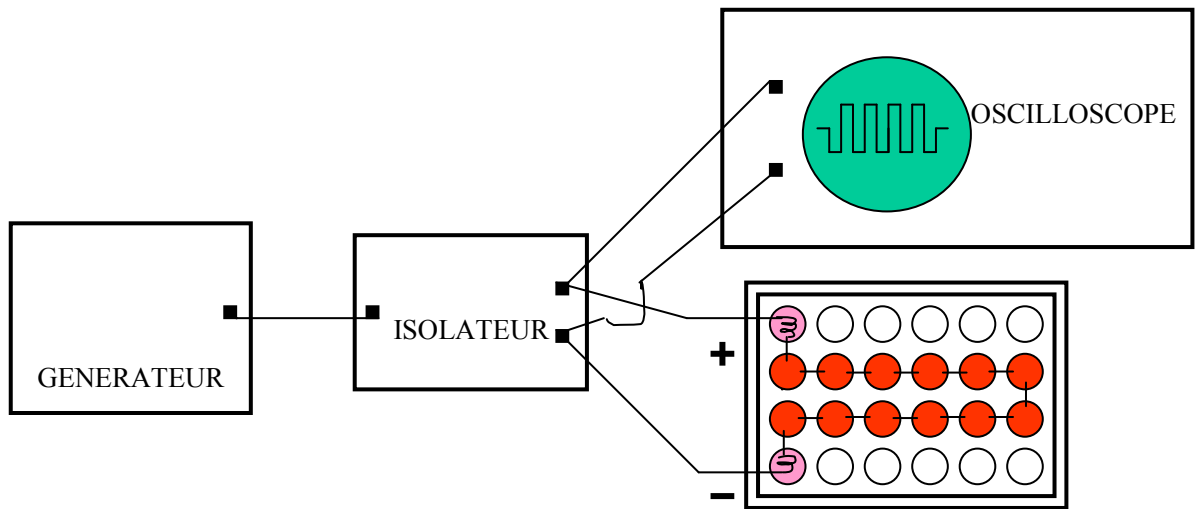


Figure 9. Montage expérimental pour la stimulation des cellules en culture en plaque 24 puits.

Pour les boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre les deux électrodes en titane de 8 cm de long qui fixées sur le fond de la boîte, parallèlement et à 3 cm l'une de l'autre. Ce système a l'avantage de permettre la stimulation d'un plus grand nombre de cellules simultanément (Figure 10).

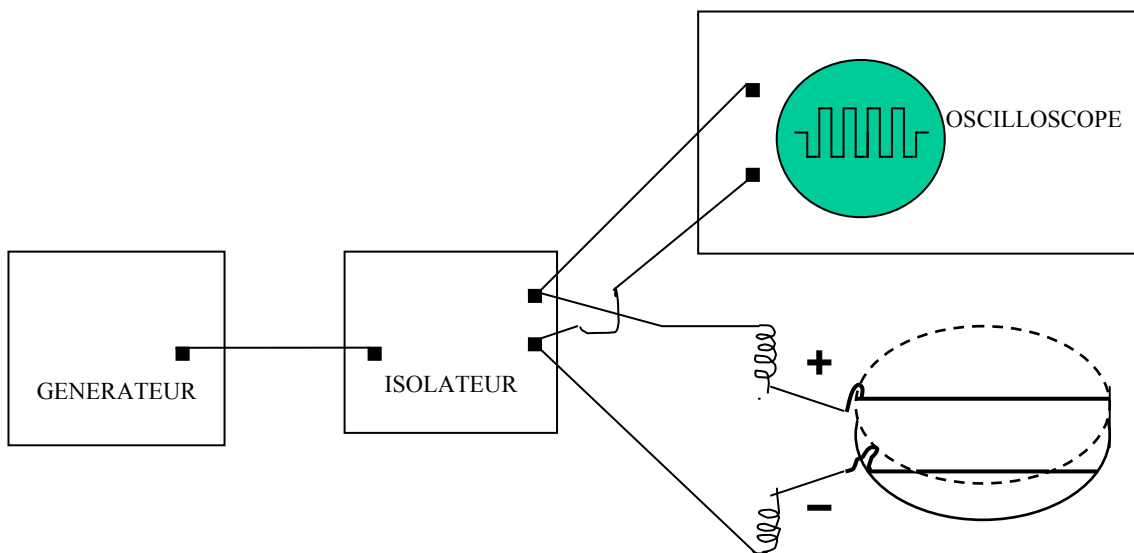


Figure 10. Montage expérimental pour la stimulation des cellules en culture en boîte de Pétri.

Afin de pouvoir réaliser des observations au microscope le premier système a été adapté pour être appliqué avec des systèmes de culture en puits sur lames de microscope.

Ces différents supports de culture sont intégrés dans un circuit électrique contenant un générateur et un isolateur permettant de délivrer le courant de stimulation désiré. Le courant de stimulation est contrôlé à l'aide d'un oscilloscope (Figure 11). Pendant la durée de la stimulation le support de culture est maintenu dans l'incubateur.

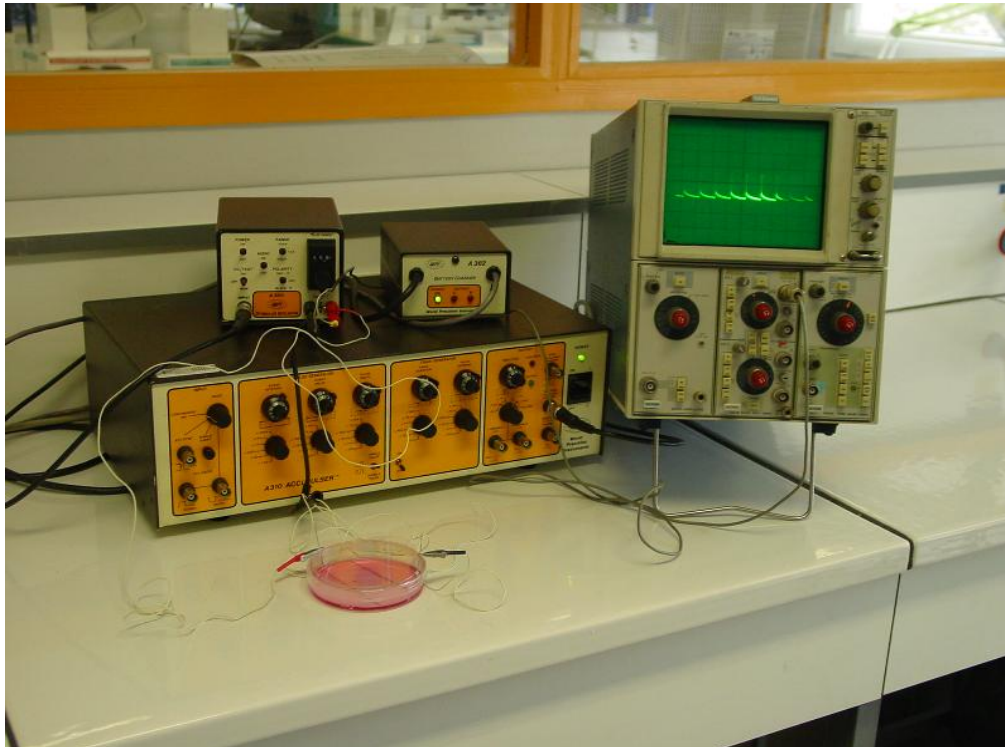


Figure 11. Vue du système de stimulation en boîte de culture au début de la stimulation (la boîte est ensuite remplacée dans l'incubateur).

2.2. Paramètres de la stimulation électrique

Les cellules à confluence sont stimulées à l'aide des dispositifs décrits avec un courant monophasique carré bipolaire de $500 \mu\text{A}$ pendant des durées de 3 ou 24 heures. La durée d'impulsion est de $60 \mu\text{s}$ et la fréquence est fixée à 130 Hz (soit des intervalles de 7,7 ms).

Les cellules témoins sont cultivées dans les mêmes conditions mais sans application du courant électrique.

C. Analyse d'expression génique

Cette analyse est réalisée selon une approche globale par micro-array.

1. Principe

Le transcriptome est constitué de l'ensemble des ARN présents dans un échantillon soumis à des conditions données. L'analyse d'expression par micro-array permet d'obtenir simultanément des informations comparatives sur de très nombreux ARNm constituant le transcriptome de l'échantillon (Figure 12). On obtient ainsi une indication du niveau d'expression des gènes de l'organisme dans cet échantillon.

Le principe du micro-array repose sur l'hybridation ADN-ADN, qui se fait de manière spécifique, par complémentarité de séquence. Le brin d'ADN de séquence connue, et dont la séquence est spécifique d'un gène de l'espèce étudiée est appelé par convention : la sonde. Les brins d'ADN issus de l'échantillon par rétro-transcription sont appelés cible complexe. Le terme complexe signifie que la cible est constituée d'une multitude de brins de séquences différentes.

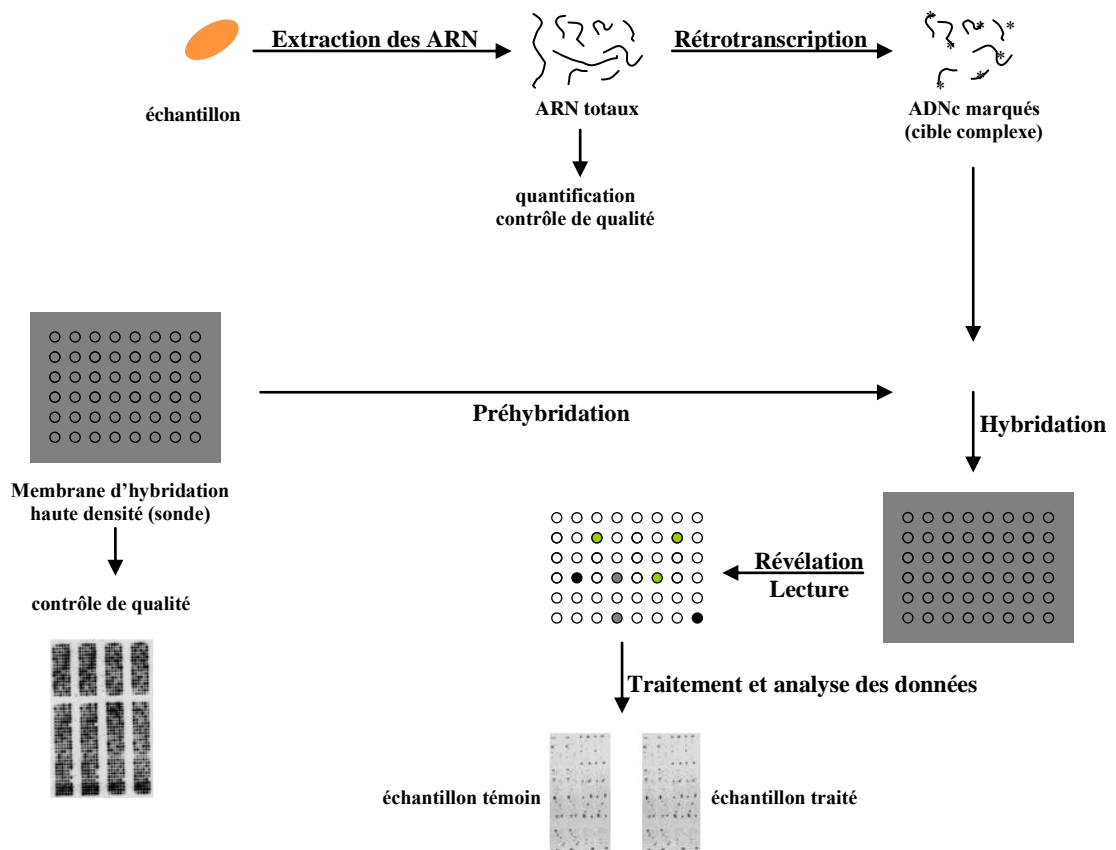


Figure 12. Schéma du protocole d'analyse du transcriptome par micro-array.

2. Cibles

2.1. Extraction des ARN

L'ensemble des opérations sur les ARN doit être réalisé avec du matériel et des solutions exempts de RNases. Les ARN sont isolés par une méthode d'extraction de type phénol-chloroforme réalisée à l'aide du kit *RNAgents® total RNA isolation system* commercialisé par la société Promega. Cette technique a été utilisée avec de légères adaptations selon le type d'échantillon (tissus frais, coupes microscopiques ou cellules en culture).

L'échantillon est dénaturé dans un tampon spécifique (thiocyanate de guanidine 4 M ; β -mercaptoéthanol 0,125 M ; N-lauryl sarcosine 0,5% ; citrate de sodium 26 mM ; pH 6,8) en recourant, si nécessaire à un broyeur. Ce tampon permet de lyser les cellules et de dénaturer les complexes nucléoprotéiques. Les RNases endogènes sont inactivées par l'action du thiocyanate de guanidine et du β -mercaptoéthanol. L'ensemble des opérations est réalisé dans la glace afin de réduire encore l'activité des RNases.

L'ajout d'un mélange de phénol-chloroforme-acide isoamylique (25:24:1), en présence d'acétate de sodium (1/10 du volume, 2M, pH 4) permet de séparer l'ARN des autres composants cellulaires par solubilité différentielle. Les ARN se répartissent préférentiellement dans la phase aqueuse.

Après récupération de la phase aqueuse, les ARN sont précipités par adjonction d'isopropanol (1/2 volume).

Les ARN sont ensuite lavés à l'éthanol (70%) avant d'être solubilisés dans de l'eau.

2.2. Dosage et contrôle de qualité

Nous avons utilisé deux types de protocoles.

2.2.1. Protocole classique

Les ARN sont dosés par spectrométrie UV à 260 nm ($1 \text{ DO} \leftrightarrow 40 \mu\text{g.mL}^{-1}$). La pureté est évaluée par des dosages à 230 et 280 nm (présence de sels, protéines, phénol...).

La qualité des ARN, c'est-à-dire le fait qu'ils n'ont pas été dégradés, est évaluée par la présence des ARNr 28S et 18S. Le rapport de quantité entre les deux doit être de deux environ.

Ce contrôle de qualité peut être réalisé par migration électro-phorétique en gel d'agarose en conditions dénaturantes ou par *Northern-blot* avec une sonde 28S.

L'inconvénient de ces méthodes est qu'elles utilisent une grande quantité d'ARN, plusieurs microgrammes, qui sont donc perdus pour l'analyse.

2.2.2. *Protocole Agilent 2100 Bioanalyzer*

Le système *2100 Bioanalyzer* commercialisé par Agilent Technologies est un système d'analyse automatisé permettant de réaliser rapidement et simplement des migrations électro-phorétiques avec le dosage global et celui de chaque bande observée. Ce protocole ne nécessite qu'une très petite quantité d'ADN, de l'ordre de la centaine de nanogrammes.

2.2.3. *Northern blot*

Après séparation électrophorétique en gel dénaturant (agarose 1%, formaldéhyde 1,9%, tampon MOPS 1X) les ARN sont transférés sur une membrane de nylon. Le transfert est réalisé à l'aide d'un appareil à vide, en présence d'eau pendant 5 minutes, en solution basique 10 minutes, en tampon Tris pH 7,5 dix minutes, puis 2 heures avec du tampon SSC 10X. L'ARN est fixé à la membrane par un passage aux UV.

La sonde oligonucléotidique 28S est marquée radioactivement par l'action de la T4 polynucléotide kinase en présence de $\gamma(^{33}\text{P})\text{ATP}$. Après précipitation à l'éthanol, en présence d'acétate de sodium et d'ADN de sperme de hareng, la sonde est reprise dans un volume approprié d'eau ultrapure. Le marquage est contrôlé par le comptage de la radioactivité de 1 μL de la sonde.

La membrane est préhybridée dans 10 mL de tampon de saturation (SSC 5X, Denhardt 5X, SDS 0,5%) contenant $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'ADN de sperme de hareng soniqué et dénaturé. Après 6 heures de préhybridation à 42°C , un mélange de sonde marquée (1 à 2 millions de cpm) et non marquée (5 μg) est ajouté. L'hybridation est poursuivie à 42°C pendant au moins 12 heures. Après 3 lavages de 5 minutes à température ambiante (SSC 2X, SDS 0,1%) un écran de phosphore est mis en exposition sur la membrane puis lu avec un phosphoimageur (BAS 5000, Fuji, Kanagawa, Japon).

2.3. Rétro-transcription et marquage

Le marquage de la cible complexe est réalisé par rétro-transcription d'ARN total avec incorporation de nucléotides radioactifs marqués au ^{33}P .

Deux à cinq microgrammes d'ARN total de l'échantillon à analyser et 0,2 ng d'un ARN de contrôle (gène de tomate) sont mis en présence de l'amorce poly-T (8 μg dT25) pendant 8 minutes à 70°C . Afin de permettre l'hybridation, la température est ensuite diminuée lentement jusqu'à 50°C . Le mélange réactionnel (40 U de RNAsine, 20 mM de dTTP, 20 mM de dATP, 20 mM de dGTP, 120 μM de dCTP, 30 μCi de $\alpha\text{dCTP }^{33}\text{P}$, 100 U de rétro-transcriptase déficiente pour la fonction RNase H, dans le tampon optimum) est ajouté pour un volume final de 30 μL . La réaction est réalisée à 50°C pendant 2h avec ajout de 100 U de rétro-transcriptase après la première heure. Après la fin de la réaction les ADNc sont purifiés à l'aide d'une colonne microcon YM-50 (Millipore) afin d'éliminer les nucléotides non incorporés. Les ADNc sont récupérés dans un volume de 100 μL d'eau. Le contrôle de la réaction est réalisé par le comptage de la radioactivité de 1 μL de la cible complexe avec un compteur à scintillation β .

Les acides nucléiques sont présents sous forme d'hétéro-duplex ADN-ARN, il est donc nécessaire de dégrader les ARN matrices avant de pouvoir réaliser l'hybridation sur les membranes sondes. L'incubation de la cible dans une solution à 0,25 M de NaOH, 0,2% de SDS et 15 mM d'EDTA à 68°C pendant 30 minutes permet la lyse des ARN. L'ajout de HCl et Tris (concentration finale de 0,12 M et 250 mM respectivement) permet de neutraliser et tamponner la solution à pH 7. La cible complexe est conservée à 4°C. Immédiatement avant l'hybridation elle est dénaturée par un passage de 5 minutes à 100°C.

3. Sondes

3.1. Oligonucléotides sondes

3.1.1. *Pan[®] Rat Oligo Test Set de MWG Biotech*

Il s'agit d'un lot de 96 oligonucléotides extraits de la bibliothèque Pan[®] Rat 5K de MWG Biotech. Le design des séquences a été réalisé par MWG afin d'être spécifique du gène ciblé.

3.1.2. *Rat OligoLibraryTM de Sigma Genosys*

Il s'agit d'une banque de 4 854 oligonucléotides représentant 4803 ARNm dont la séquence est disponible dans GenBank (version #121) et 51 contrôles.

Les séquences oligonucléotidiques ont été optimisées par Sigma selon plusieurs critères :

- Épissage alternatif. La séquence est sélectionnée pour être commune au plus grand nombre de variants d'épissage alternatif du gène.
- Homologie croisée. L'homologie des séquences avec l'ensemble des séquences de rat connues a été minimisée.
- Qualité de séquence. Les oligonucléotides sont sélectionnés dans des régions pour laquelle la séquence connue est de grande qualité et en excluant les sites polymorphes probables.
- Contenu en GC. Il est équilibré afin d'assurer une température de fusion et des conditions d'hybridation homogènes pour toute la banque.
- Distance de l'extrémité 3'. La distance par rapport à l'extrémité 3' est minimisée afin de permettre les hybridations à partir de rétro-transcription utilisant une amorce dT.
- Structures secondaires. Les séquences sont optimisées afin de réduire la formation de structures secondaires et d'auto-hybridation.

3.1.3. Gestion des oligonucléotides

Les oligonucléotides sont reçus sous forme lyophilisée en plaques 96 puits. Ils sont solubilisés à une concentration de 100 μ M dans du SSC 1X coloré par du bleu de bromophénol.

3.2. Préparation des membranes

3.2.1. Dépôt des sondes

Les sondes sont déposées sur des membranes de nylon N+ (Hybond) à l'aide d'un robot *GMS 417 arrayer* (MWG Biotech). Les dépôts sont espacés de 500 µm les uns des autres. Chaque sonde est déposée en double sur la membrane.

3.2.2. Contrôle des membranes

Le contrôle de qualité des membranes est réalisé sur une seule membrane par série, la reproductibilité du robot étant vérifiée par ailleurs. Il est réalisé par le marquage radioactif des oligonucléotides fixés sur la membrane par une réaction de phosphorylation catalysée par la T4 polynucléotide kinase (El Atifi et al 2003.).

Après prétraitement de la membrane (tampon de la T4 polynucléotide kinase ; Tween 2% ; BSA 12%) la T4 polynucléotide kinase et le γ -ATP ³³P sont ajoutés. Après lavage à 60°C dans un tampon 1% SDS, SSC 0,1X, le résultat est révélé au phospho-imageur.

Ce contrôle permet d'obtenir une information qualitative et quantitative des dépôts sur la membrane.

4. Hybridation

Les membranes sont pré-hybridées 24h à 55°C dans un tampon SSC 5X, Denhardt 5X, 1 mg.mL⁻¹ d'ADN de sperme de saumon et 0,5% SDS afin de saturer la membrane et limiter les hybridations non spécifiques. La cible complexe est ensuite ajoutée et l'hybridation est poursuivie à 55°C pendant 4 jours. Les membranes sont ensuite lavées

dans un tampon SSC 2X, 0,5% SDS à 45°C pendant 3 heures, puis séchées à l'air avant d'être révélées.

5. Révélation

Un écran phosphore est exposé sur les membranes pendant plusieurs jours, il est ensuite révélé par lecture avec un phospho-imageur à haute résolution (PhosphoImager BAS-5000, Fuji-Film™). L'intensité de chaque spot est ensuite quantifiée à l'aide du logiciel Array Gauge (Fuji).

6. Analyse

Pour chaque membrane le bruit de fond moyen est calculé et retranché des valeurs brutes. Chaque gène étant représenté par deux spots sur la membrane, moyenne et écart-type sont calculés. Lorsque l'une des valeurs est manifestement faussée (absence du spot, débordement du spot voisin...) le gène est exclu des analyses ultérieures. Pour normaliser des expériences entre elles, la somme des signaux de chaque membrane est réalisée et son rapport avec la somme des signaux d'une membrane de référence est calculé. Les intensités de chaque membrane sont ensuite corrigées par le facteur obtenu. Seuls les gènes dont l'expression est modifiée d'un facteur supérieur à 2 entre deux conditions étudiées sont considérés pour des analyses ultérieures.

D. Analyse d'expression protéique

1. Par incorporation de méthionine marquée

1.1. Principe

Des cellules sont cultivées en présence de méthionine marquée au ^{35}S . Le marqueur sera incorporé par la cellule dans les protéines néo-synthétisées qui pourront ainsi être détectées par autoradiographie.

1.2. Incorporation de méthionine ^{35}S

Des cellules (PC12 ou GH3) sont cultivées en boîtes de Pétri de 10 cm, elles sont soumises ou non (contrôle) à une stimulation électrique tel que décrit précédemment. Elles sont mises en présence de 50 μCi de méthionine- ^{35}S pendant toute la durée de la stimulation (3 h ou 24 h).

1.3. Préparation de l'extrait protéique

Après avoir été lavées trois fois avec du PBS pour éliminer la radioactivité non incorporée, les cellules sont récupérées par grattage puis centrifugation. Le culot est repris dans 80 μl de tampon de lyse *Reporter Lysis Buffer 5X* (Promega), supplémenté par un cocktail d'inhibiteurs de protéases *Complete* (Roche), après centrifugation le surnageant contenant les extraits protéiques cellulaires est aliquoté et conservé à -80°C . Afin de limiter la dégradation protéique, toutes ces opérations sont réalisées sur de la glace.

1.4. Séparation et autoradiographie

La séparation des protéines est réalisée par électrophorèse en gel SDS-PAGE (12% d'acrylamide). Des dépôts de 10 µg de protéines sont réalisés, en parallèle un marqueur de taille moléculaire *Full range Rainbow* (Amersham Biosciences, Grande-Bretagne) est déposé. Après migration, le gel est exposé, environ 6 heures, sur un écran phosphore (Image Plate Fujifilm) qui est ensuite révélé à l'aide d'un phospho-imageur (PhosphoImager BAS-5000, Fuji-Film™; Raytest, Paris la Défense, France). Les données sont ensuite analysées (Figure 13) à l'aide du logiciel Image Reader (Fuji).

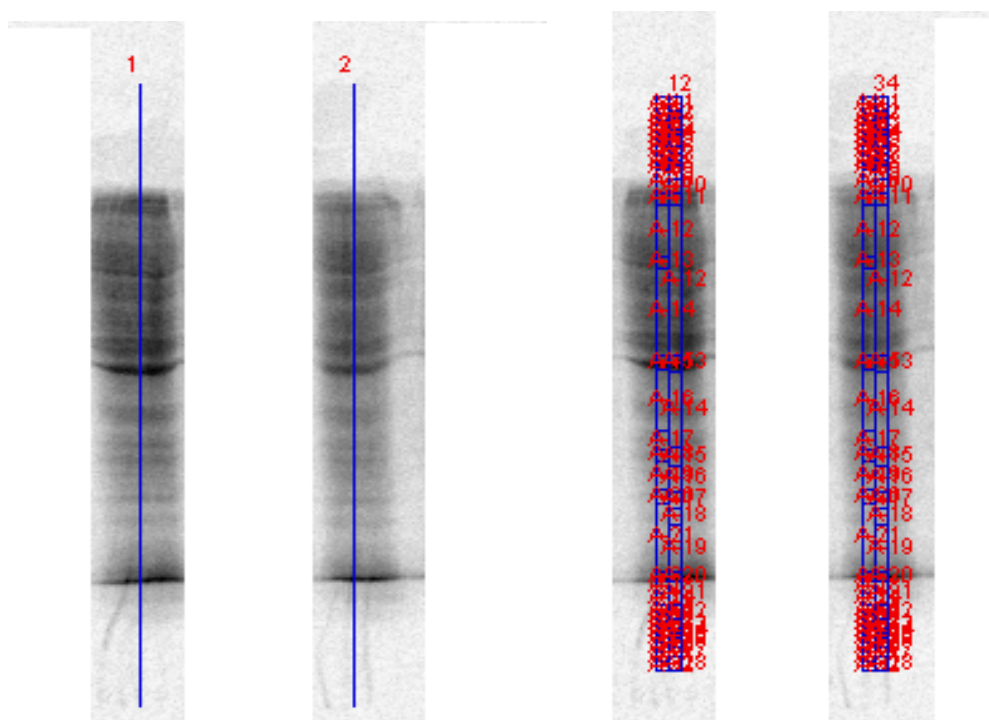


Figure 13. Analyse quantitative des protéines marquées radioactivement. Le logiciel Image Reader localise les bandes sur la piste de migration (à gauche), puis calcule l'intensité par unité de surface de chacune (à droite). Par SELDI-TOF

2. Par spectrométrie de masse

2.1. Principe

La spectrométrie de masse SELDI-TOF (*Surface Enhanced Laser Desorption Ionization-Time Of Flight*) est un outil d'analyse protéique combinant la sélection d'une partie de l'échantillon selon ses propriétés, par chromatographie d'affinité, avec une analyse par spectrométrie de masse en temps de vol (Figure 14).

Nous avons utilisé le système commercialisé par *Ciphergen Biosystem* (Palo Alto, Californie, USA).

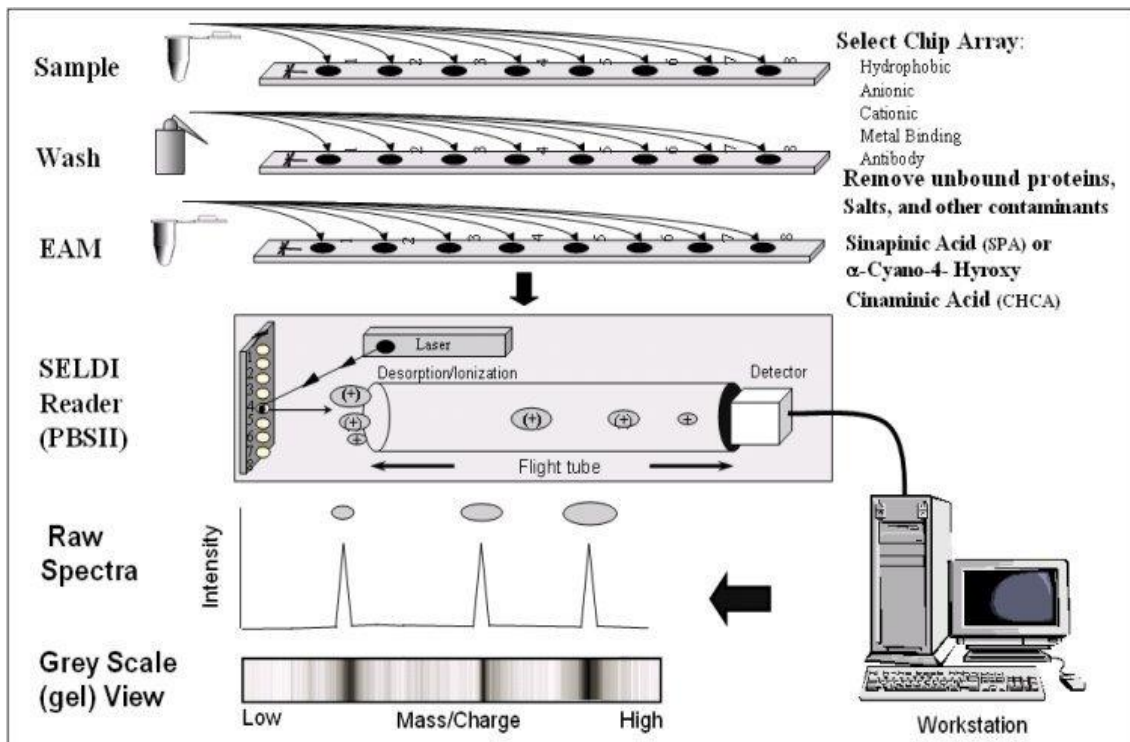


Figure 14. Principe de la spectrométrie de masse SELDI-TOF.

L'échantillon protéique à analyser est d'abord déposé sur la surface chromatographique d'une puce (ProteinChip). Chaque puce comporte huit spots, permettant d'analyser huit échantillons en parallèle. Il existe différents types de surfaces chromatographiques

(échangeuse d'anions ou de cations, hydrophobe, ions métalliques ou permettant la fixation de molécules sondes telles que anticorps, récepteurs ou ligands, acides nucléiques...) permettant de sélectionner la fraction d'intérêt de l'échantillon.

L'utilisation de ces surfaces permet de réduire un échantillon biologique complexe (fluides biologiques tels que sérum, plasma, urine, liquide pleural..., ou extraits protéiques bruts issus de tissus ou cellules) à une fraction dotée de propriétés communes. En permettant ainsi l'analyse d'un sous-protéome, la technique rend possible la mise en évidence et l'étude de protéines non majoritaires. De plus l'identification d'une protéine à partir d'un sous-protéome particulier permet de faciliter la mise en œuvre de sa purification ultérieure.

2.1.1. Protocole

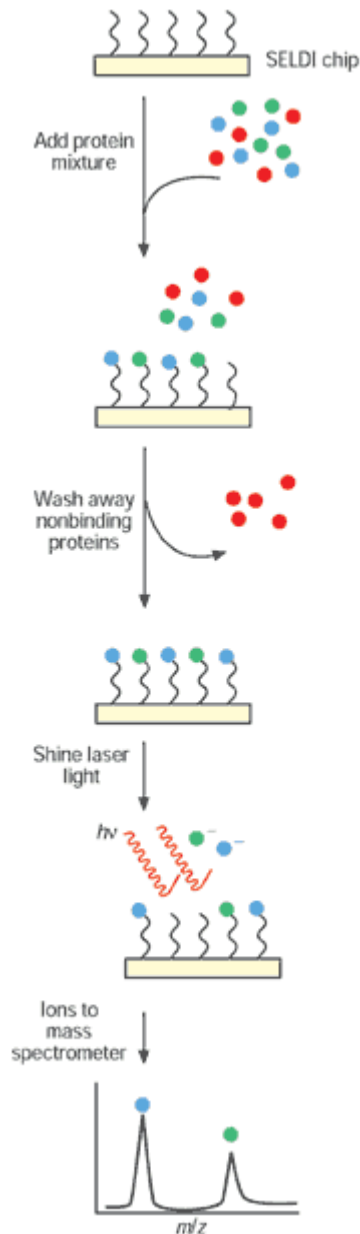


Figure 15. Schéma de principe de l'analyse protéomique SELDI-TOF.

a. Dépôt (Figure 15)

Quelques microlitres de l'extrait brut sont déposés sur le spot de la barrette ProteinChip®. Les protéines de l'échantillon ayant une affinité pour la surface chromatographique utilisée s'y lient.

b. Lavage

Le lavage des spots permet d'éliminer les protéines non retenues à la surface, ainsi que toute trace de sels, détergents... qui ont été apportés avec l'échantillon. Ceci permet de s'affranchir de différences dues au mode de préparation de l'échantillon.

Cette étape est optimisable et permet en adaptant la stringence des lavages d'augmenter encore la spécificité de la sous-population à analyser.

c. Dépôt de la matrice

Après séchage de la surface la solution contenant la matrice EAM (*Energy Absorption Molecules*) est déposée sur les spots. La matrice va cristalliser avec les protéines retenues à la surface et faciliter leur désorption et leur ionisation par le laser du spectromètre.

d. Spectrométrie de masse

Après leur ionisation les protéines vont voler dans le tube, leur vitesse est proportionnelle au rapport M/Z (masse/charge). On obtient ainsi un profil protéique qui peut être analysé avec les logiciels ProteinChip et Biomarker Wizard.

2.2. Analyse d'extrait protéique de cellules en culture

Nous avons utilisé des barrettes H50, hydrophobes, avec la technique de dépôt dite "en gouttes" (Figure 16).



Figure 16. Dépôt en goutte sur une barrette.

2.2.1. Prétraitement

La surface chromatographique de la barrette doit être activée par un traitement spécifique. La surface hydrophobe H50 est activée à l'acétonitrile 5% en PBS pendant 5 minutes à température ambiante, rincée à l'eau distillée puis incubée en acétonitrile 10%, acide trifluoroacétique 0,1% et NaCl 200 mM dans du PBS, pendant 5 minutes supplémentaires.

2.2.2. Dépôt des échantillons

Cinq microgrammes de protéines dans 10 µL de tampon de lyse (Promega) sont incubés en goutte sur la barrette pendant 30 minutes à température ambiante dans une chambre humide.

2.2.3. Lavages

Les spots sont rincés 3 fois avec 5 µl d'acétonitrile 10%, acide trifluoroacétique 0,1% et NaCl 200 mM dans du PBS puis séchés.

2.2.4. Dépôt de la matrice

La matrice est constituée d'une solution d'acide sinapinique dans de l'acétonitrile 50% et acide trifluoroacétique 0,5%. La solution est centrifugée 2 minutes à 14 000 rpm à température ambiante et la matrice est prélevée dans le surnageant en évitant les particules non dissoutes. La matrice peut alors être conservée quelques jours à 4°C et à l'abri de la lumière. Deux dépôts successifs de 1 µL de matrice sont faits sur chaque spot, puis les barrettes sont séchées à l'abri de la lumière jusqu'à la lecture.

2.2.5. Lecture

L'intensité du bombardement laser peut être réglée, ce qui permet de sélectionner les masses des protéines d'intérêt. Plus l'intensité est élevée, plus les protéines de haut poids moléculaire vont pouvoir être ionisées et donc détectées.

Nous avons utilisé trois paramètres d'intensité différents pour analyser chaque spot : 160, 175 et 190. Ces paramètres permettent d'analyser respectivement les petites masses, les masses intermédiaires et les hautes masses moléculaires.

2.2.6. Analyse des données

Le profil SELDI-TOF est normalisé à l'aide du logiciel Bio-pattern, en utilisant une normalisation globale débutant après 2500 Daltons afin d'éviter le bruit de fond de la matrice. Un repérage automatique des pics est effectué. L'analyse statistique des données quantitatives est ensuite réalisée (test de Student), ainsi qu'une analyse de type *clustering* d'Eisen, similaire à celle effectuée pour le transcriptome (Eisen et al 1998).

2.3. Imagerie protéomique tissulaire

L'appareil SELDI-TOF PCS 4000 (Ciphergen) permet la détermination précise de la localisation des flashes laser ce qui permet d'analyser le profil protéique local en différents points du spot (Figure 17) avec une résolution spatiale de 50 microns. Cette propriété associée à la technique de dépôt de coupes cryogéniques de tissus directement sur les spots des barrettes (Figure 17) permet de réaliser de l'imagerie protéomique tissulaire (Bouamrani et al. 2006).

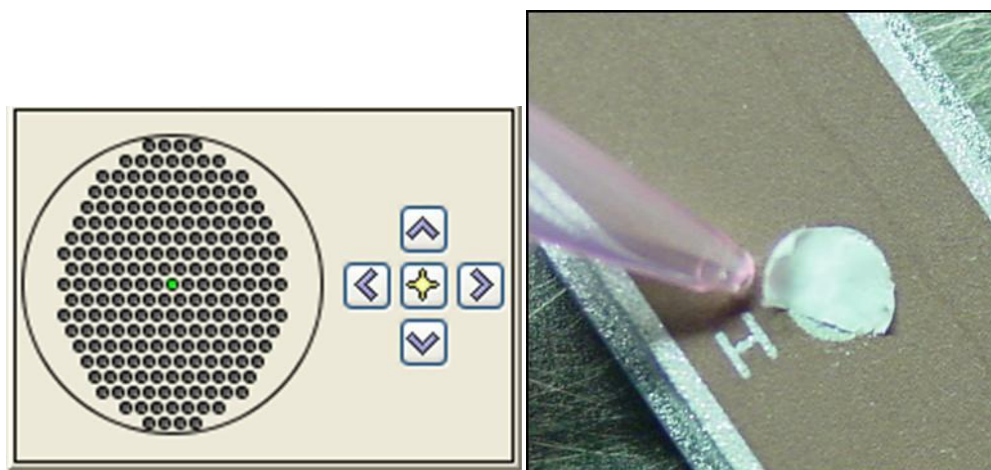


Figure 17. Interface de localisation des flashes laser. Dépôt d'une coupe cryogénique sur un spot d'une barrette.

Chapitre IV : Résultats

A. Premières expériences *in vivo*

L'étude a commencé par une approche *in vivo* à partir des modèles de rats stimulés mis au point dans le laboratoire pour de nombreuses autres études. Il était primordial de valider ces modèles pour des analyses de l'ARN. L'ARN est en effet extrêmement fragile du fait de l'action des RNases extracellulaires présentes dans le tissu d'origine. Les différents traitements réalisés ensuite sur le tissu prélevé peuvent également dégrader l'ARN et donc influencer fortement sur la qualité des résultats obtenus.

1. Fixation des tissus et qualité des ARN

Traditionnellement les cerveaux disséqués sont fixés au PFA comme décrit précédemment. Nous avons comparé cette méthode de fixation à une simple congélation rapide dans des vapeurs d'azote liquide.

Nous avons mis en évidence que la fixation au PFA des cerveaux provoque une forte dégradation des ARN. En conséquence nous avons décidé d'abandonner cette méthode pour adopter celle de la congélation rapide qui permet de maintenir l'intégrité des ARN pour les analyses ultérieures.

2. Coloration des tissus

Notre but initial étant d'analyser l'effet de la SCP sur différentes structures cérébrales nous avons testé l'influence sur l'intégrité des ARN de plusieurs techniques de coloration des coupes histologiques de cerveau congelé.

Nous avons d'abord comparé un kit de coloration rapide RAL555 qui permet de colorer les coupes à l'éosine et au bleu de méthylène en trois étapes de 5 secondes, et une coloration à l'hématoxyline de Harris plus longue mais en moins d'étapes (Figure 18).

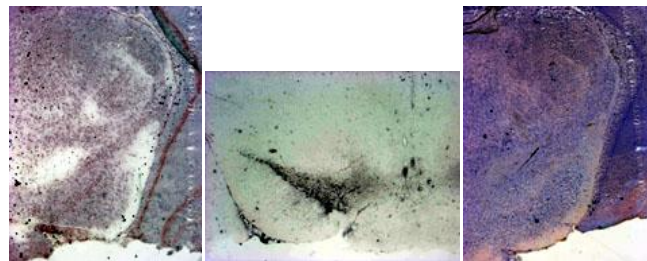


Figure 18. Coupes de cerveau de rat réalisées au niveau de la substance noire. Coloration à l'hématoxyline de Harris ; immuno-histochimie rapide anti-TH ; coloration rapide RAL555.

L'analyse par électrophorèse des ARN extraits de tissus colorés par ces méthodes (Figure 19) a révélé l'impossibilité d'obtenir des ARN non dégradés suite à la coloration rapide RAL555. Il était par contre possible d'obtenir un profil d'ARN non dégradé avec la coloration à l'hématoxyline, malheureusement pas de façon systématique.

Dans le but d'affiner et de faciliter la localisation des structures cérébrales nous avons étudié une méthode de coloration immuno-histochimiques pour mettre en évidence la tyrosine hydroxylase. Nous avons optimisé les techniques habituelles en réduisant les étapes et les durées d'incubation. Malheureusement, s'il a été possible de mettre au point une méthode permettant un marquage efficace de la TH il a été impossible d'obtenir des ARN d'une qualité satisfaisante suite à l'immuno-histochimie.

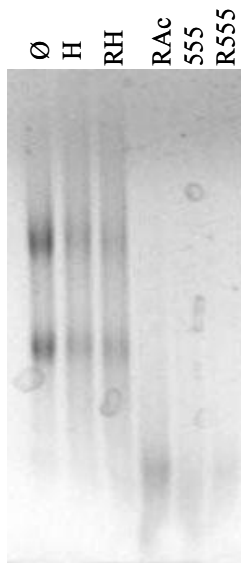


Figure 19. Gel de contrôle de qualité des ARN extrait dans les différentes conditions de coloration. Ø : tissu contrôle sans traitement de coloration ; H : coloration à l'hématoxyline de Harris ; RH : idem + traitement au RNA later ; Rac : immuno-histochimie + traitement RNA later ; 555 : coloration rapide RAL555 ; R555 : idem + traitement RNA later.

3. Agent de stabilisation

Malgré toutes les optimisations réalisées, il est impossible d'obtenir systématiquement des ARN de bonne qualité. Environ 25% des échantillons sont en effet dégradés en dépit de toutes les précautions. Nous avons donc introduit l'utilisation du *RNA later* qui est normalement un agent de conservation, comme agent de stabilisation (voir matériel et méthode p47). Ceci permet d'améliorer encore la possibilité d'obtenir des ARN de qualité optimale (Figure 20). Toutes les extractions d'ARN avec ce protocole optimisé ont été de bonne qualité, mais cela ne doit pas dispenser de faire une analyse de qualité avant toute étude de l'échantillon.

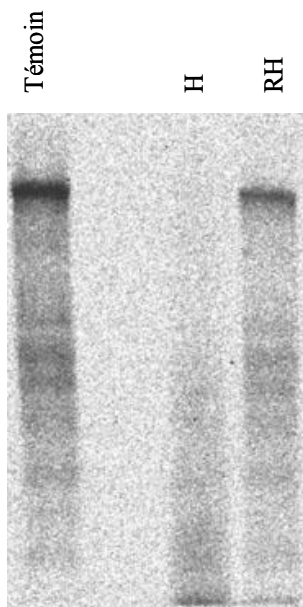


Figure 20. Northern blot de contrôle de qualité des ARN. Une sonde radioactive complémentaire de l'ARNr 28S est utilisée. Témoïn : ARN extrait sans traitement du tissu ; H : ARN dégradé par la coloration à l'hématoxyline de Harris ; RH : ARN préservé par le prétraitement au RNA later.

B. Qualité des ARN et micro-array

Le laboratoire a développé depuis plusieurs années la technique d'analyse du transcriptome par micro-array (El Atifi et al 2002). Les contrôles de qualités ont toujours été au centre des préoccupations (El Atifi et al 2003). Dans le domaine de l'analyse moléculaire *in situ*, en particulier avec microdissection, la plupart des publications ne font pas mention de contrôle de qualité des ARN utilisés pour l'analyse. Nous avons voulu vérifier si la qualité des ARN influe ou non sur la validité des résultats de ce type d'expériences. Nous avons donc fait des analyses sur les membranes MWG à 96 gènes avec des ARN extraits à partir de coupes de cerveau colorées à l'hématoxyline. Nous avons choisi quatre échantillons : deux non dégradés et deux présentant un profil de dégradation partielle d'après une analyse sur Bioanalyzer Agilent (Figure 21).

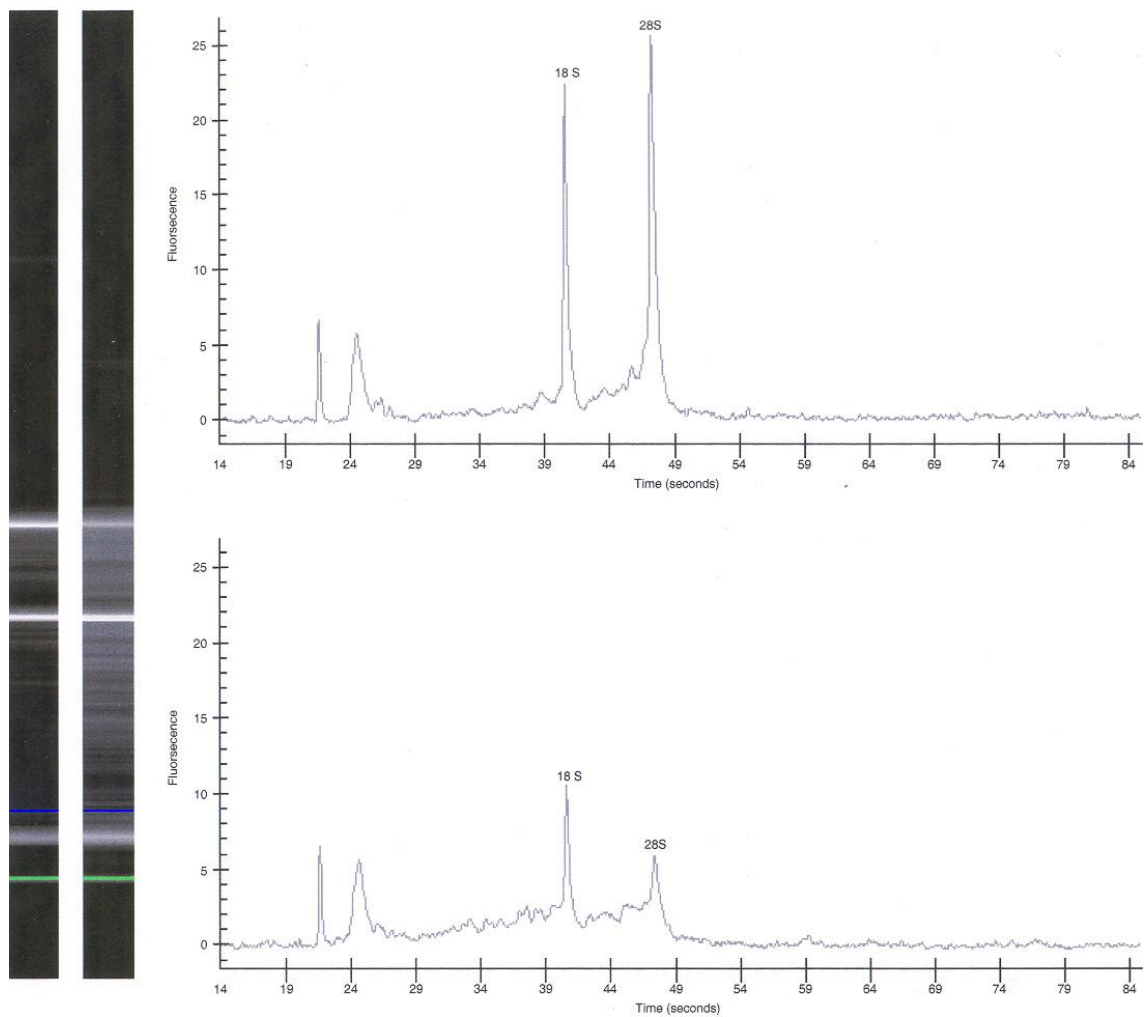


Figure 21. Image type gel d'un ARN non dégradé (à gauche) et d'un ARN présentant un profil de dégradation partielle (à droite). Électrophérogramme de l'ARN non dégradé (en haut) et partiellement dégradé (en bas).

L'analyse micro-array de ces échantillons fait apparaître un nombre important de différences dont certaines avec des niveaux d'expression apparents deux fois plus élevés ou plus faibles (Tableau 4).

Gene Bank	description	facteur de variation^b
S74327	{clone E512, estrogen induced gene} [hypothalamus, mRNA Partial, 259 nt]	2,1524926671
S74342	C1-13=neuronal specific gene {clone E5130-3, estrogen induced gene} [hypothalamus, mRNA Partial, 150 nt]	-2,602620231
S74321	cytochrome bc-1 complex core P {clone E518, estrogen induced gene} [hypothalamus, mRNA Partial, 342 nt]	-2,237164624
S77858	non-muscle myosin alkali light chain [new-born, heart ventricle, mRNA, 613 nt]	-2,06943691
M28254	cytochrome c oxidase subunits VIc mRNA, 5' end	-2,200107181
X16957	mRNA for the cysteine proteinase inhibitor cystatin C	-2,173985043
M16758	small cytoplasmic RNA (alpha-1-RNA), complete cds	2,409464852
NM_012946	Extracellular matrix protein 2 (Ecm2), mRNA	-2,005601637
NM_012632	Proline-rich protein, salivary (Prpb), mRNA	-2,721269434
NM_012656	Secreted acidic cystein-rich glycoprotein (osteonectin) (Sparc), mRNA	-2,277948089
AF196315	small zinc finger-like protein DDP2 (Ddp2) mRNA, complete cds	-2,246544182
U95052	translation repressor NAT1 mRNA, partial 3'UTR	-2,052246604

Tableau 4. Liste représentative des gènes dont le niveau d'expression apparent est différent dans les échantillons d'ARN partiellement dégradés. Le facteur de variation est positif pour les gènes surexprimés dans les échantillons dégradés, il est négatif pour les gènes sous-exprimés.

Par l'analyse en *clustering* d'Eisen il est possible de discriminer les échantillons dégradés et non dégradés (Figure 22). Ces résultats montrent que la qualité des ARN utilisés lors d'expériences de micro-array est extrêmement importante et qu'il est donc indispensable de contrôler cette qualité.

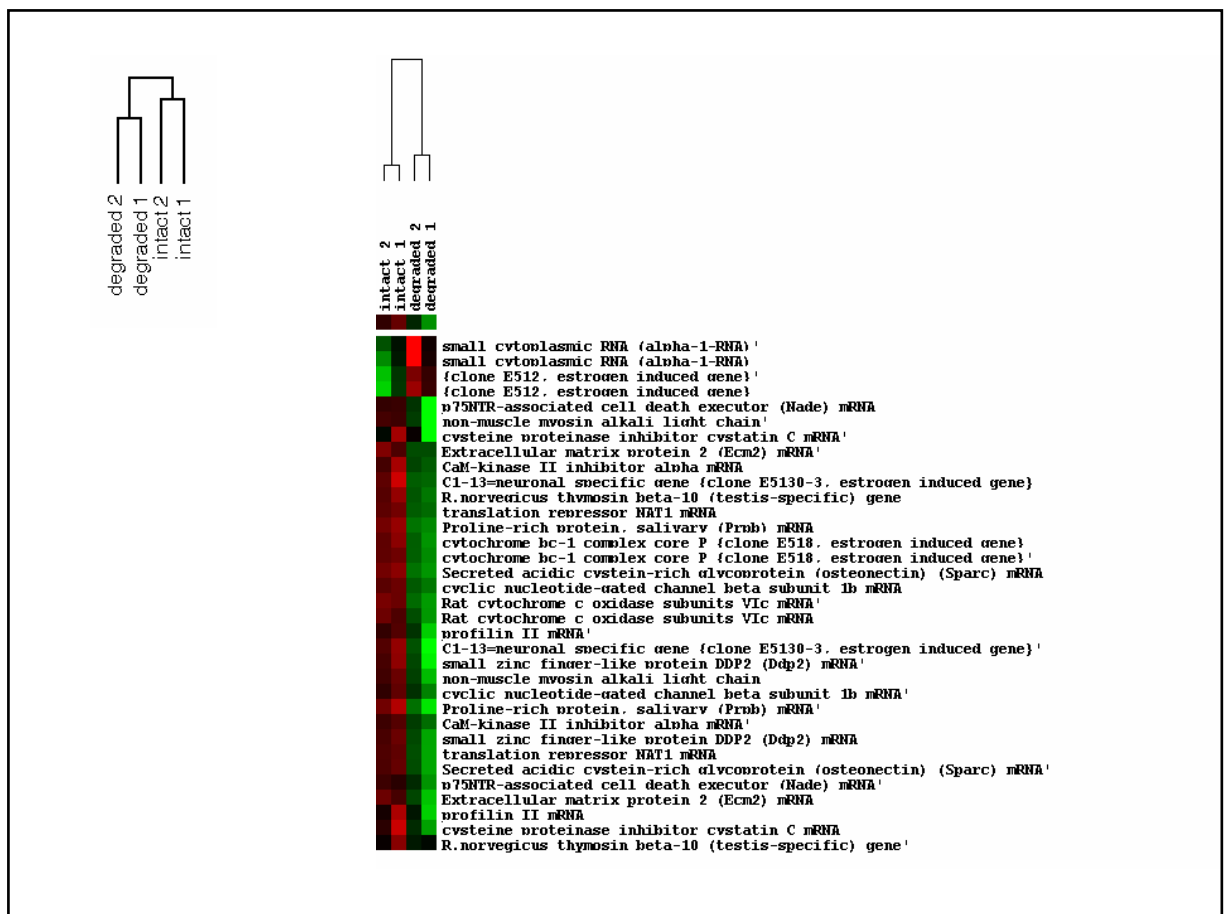


Figure 22. Dendrogramme pour une analyse sur l'ensemble des 96 gènes ; dendrogramme à partir des gènes les plus significatifs. Dans les deux cas les ARN dégradés et non dégradés sont discriminés par le logiciel d'analyse. Les gènes surexprimés sont en vert, les gènes sous-exprimés en rouge.

C. Etudes *in vitro*

L'étude *in vivo* nécessite la mise au point d'un protocole permettant : la localisation précise de la structure étudiée ; l'isolement de cette structure ; l'extraction d'une quantité suffisante d'ARN pour l'étude et pour des contrôles de qualité ; l'obtention d'ARN non dégradés. N'ayant pas réussi à remplir la totalité de ces conditions, nous avons envisagé de réaliser une étude *in vitro* dans un premier temps.

1. Criblage d'expression génique

Afin de rechercher les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu par la stimulation électrique à haute fréquence nous avons réalisé un criblage d'expression génique par micro-array sur des cellules en culture (PC12) soumises ou non à une stimulation à haute fréquence.

Ces expériences ont été réalisées à l'aide du montage expérimental mis au point par Rong Xia (Figure 23). Elle a démontré la non-toxicité du système après des durées de stimulation de 3 ou 24 h (Xia et al. 2007).

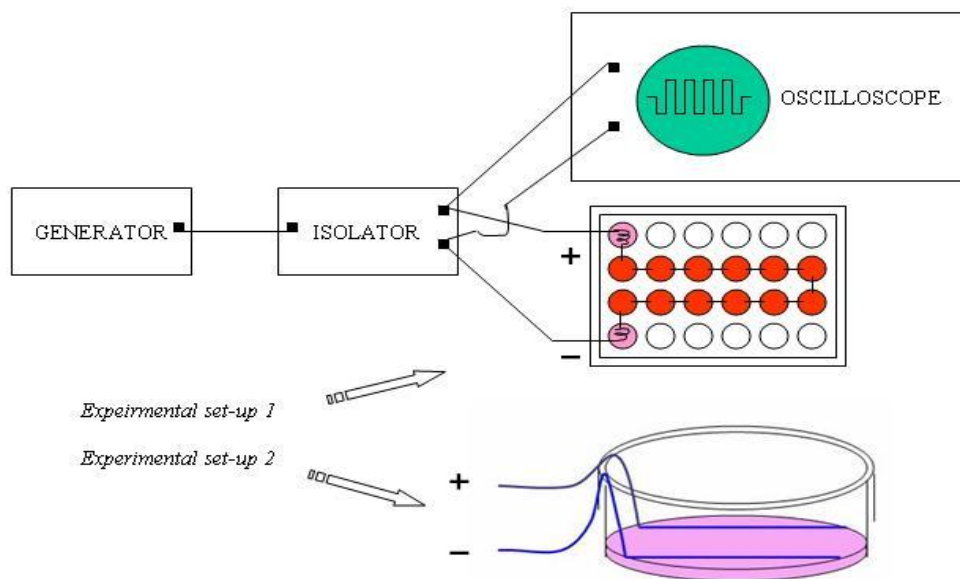


Figure 23. Montages expérimentaux permettant la SHF des cellules en culture. Le système est constitué d'un générateur, d'un isolateur et d'un dispositif de culture-stimulation. Deux dispositifs de culture ont été utilisés, l'un en puits dans lequel les 12 puits centraux sont mis en série par des ponts en titane, l'autre en boîte de Pétri sur le fond de laquelle sont fixées deux électrodes en titane.

Une étude préliminaire a été menée sur les membranes à 96 gènes portant les oligonucléotides fournis par MWG Biotech. Cette étude a permis d'identifier un certain nombre de gènes dont l'expression est modifiée par le traitement (Tableau 5 et Figure 24).

<i>Gène</i>	<i>contrôle</i>	<i>SHF</i>	<i>contrôle/SHF</i>
protéine ribosomale S2	35033 ± 5056	4436 ± 254	7,9
Hermansky Pudlak syndrome protein variant	12816 ± 1043	2550 ± 1345	5 †
eF1α	17506 ± 29	4211 ± 1282	4,2
polyubiquitin	187 ± 35	48 ± 16	3,9
protéine ribosomale L13a	17851 ± 728	5047 ± 134	3,5 †
protéine ribosomale L8	27750 ± 4570	8790 ± 305	3,2
ferritin heavy chain	19369 ± 4560	6419 ± 1610	3
protéine de fusion ubiquitine-L40	15881 ± 3941	5559 ± 193	2,9 °
protéine ribosomale S9	8231 ± 283	2958 ± 75	2,8 †
ferritin light chain	12983 ± 3191	4808 ± 319	2,7 °
protéine ribosomale L8a	21085 ± 1275	8858 ± 887	2,4 †
α-tubulin	5325 ± 395	2299 ± 153	2,3
protéine ribosomale L32	22429 ± 2722	11343 ± 891	2
protéine ribosomale L14	8199 ± 756	4337 ± 22	1,9

Tableau 5. Niveau d'expression, en unité arbitraire, ± l'intervalle de confiance, des cellules PC12 en condition contrôle et SHF pendant 3 h. Le facteur de diminution de l'expression dans les cellules stimulées est indiqué ($p < 0,05$ sauf † $p < 0,01$ et ° $p = 0,06$).

Tous les gènes analysés dans ces expériences, dont le niveau d'expression est changé fortement, sont sous-exprimés après traitement par SHF. Ce set d'oligonucléotides n'offrant pas toutes les garanties de contrôle de qualité, nous avons par la suite utilisé les oligonucléotides fournis par Sigma Genosys. L'étude menée avec les membranes portant les oligonucléotides Sigma a permis d'analyser les changements d'expression de 4803 gènes. Nous avons mis en évidence, de manière significative, que 37 gènes sont sous-exprimés (Tableau 6) suite au traitement à haute fréquence, dont trois sont

totalément réprimés, et que 19 gènes sont surexprimés (Tableau 7), dont quatre n'étaient pas détectable dans la condition contrôle.

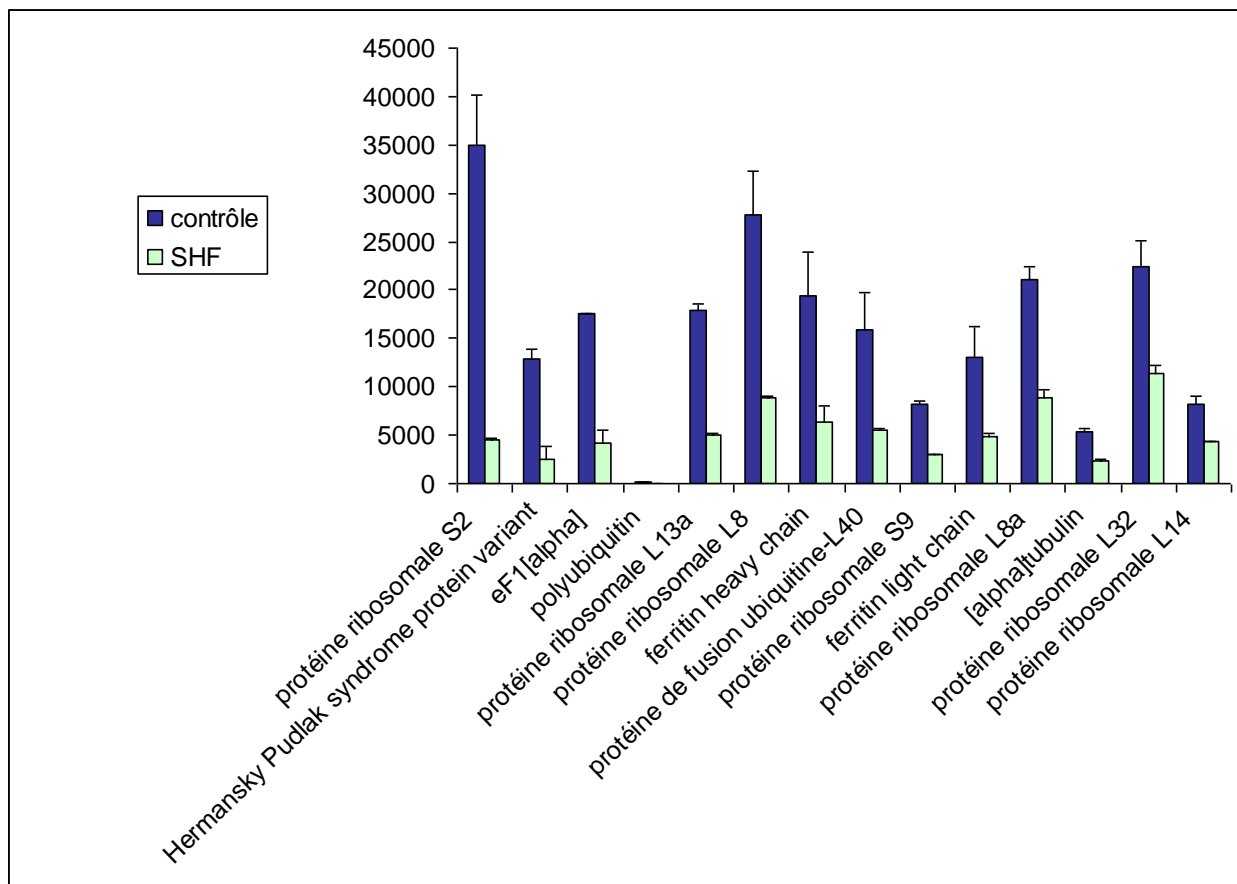


Figure 24. Niveau d'expression, en unité arbitraire, des gènes dont l'expression est fortement modifiée par la SHF. L'intervalle de confiance est indiqué.

GenBank #	Gene name	Gene ontology (Sygma Genosys)	contrôle ¹	SHF ²	facteur de changement ₃
M19044	Atp5b (ATP synthase beta subunit)	energy pathways [0006091]	4,73 ± 0,88	0	ND
L31883	Timp1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1)	developmental processes [0007275]	2,66 ± 0,66	0	ND
AF117330	Mclc (mid-1-related chloride channel 1)	ion transport [0006811]	4,41 ± 0,05	0	ND ‡
U58289	Nudt6, Gfg (antisense basic fibroblast growth factor)	protein synthesis elongation [0006414]	10,43 ± 2,98	0,63 ± 0,36	16,5
S82293	Il beta-globin	transport [0006810]	7,22 ± 0,11	0,5 ± 0,95	14,4
NM_017279	Pasma2 (proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 2)	ubiquitin-dependent protein degradation [0006511]	3,4 ± 0,68	0,5 ± 0,27	6,8
NM_017298	Cacna1d (calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit)	ion transport [0006811]	3,89 ± 0,95	0,59 ± 0,59	6,6
NM_017214	Rgs4 (regulator of G-protein signaling 4)	regulation of G-protein coupled receptor protein signaling pathway [0008277]	1,43 ± 0,07	0,22 ± 0,11	6,5 ‡
AJ132008	Prei3 (preimplantation protein 3, phocein)	proteolysis and peptidolysis [0006508]	5,04 ± 0,55	0,79 ± 0,28	6,4 ‡
NM_012992	Npm1 (nucleophosmin 1)	transcription regulation [0006355]	8,52 ± 2,41	1,39 ± 1,19	6,1
D17711	Hnrpk (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K)	RNA processing [0006396]	6,53 ± 0,98	1,32 ± 0,49	5,0
AJ007465	Psmd 1 (proteasome (prosome, macropain) 26S subunit non-ATPase, 1)	biological_process unknown [0000004]	6,69 ± 0,34	1,37 ± 0,76	4,9
AF090135	Lin-7-a (lin-7 homolog a (C. elegans))	protein complex assembly [0006461]	3,83 ± 1,07	0,8 ± 0,32	4,8
NM_017166	Stmn1 (stathmin 1)	intracellular signaling cascade [0007242]	6,65 ± 0,72	1,51 ± 1,54	4,4
D84477	RhoA (ras homolog gene family, member A)	cell growth and/or maintenance [0008151]	4,69 ± 0,98	1,3 ± 0,49	3,6
M31788	Pgk1 (X-chromosome linked phosphoglycerate kinase)	glycolysis [0006096]	8,52 ± 1,55	2,4 ± 0,23	3,5
AF194371	Nol5 (nucleolar protein 5)	transcription [0006350]	4,03 ± 0,99	1,17 ± 0,24	3,5
X59013	trypsin V b-form	proteolysis and peptidolysis [0006508]	3,4 ± 0,1	1,03 ± 0,17	3,3 ‡
M11942	Hspa8 (heat shock protein 8)	spermatogenesis [0007283]	31,05 ± 0,03	9,5 ± 0,33	3,3 ‡
NM_017248	Hnrpa1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1)	mRNA processing [0006397]	7,76 ± 1,06	2,38 ± 1,05	3,3 ‡
NM_013216	Rheb (Ras homolog enriched in brain)	signal transduction [0007165]	5,12 ± 0,87	1,66 ± 0,35	3,1
S74337	clone E536, estrogen induced gene	biological_process unknown [0000004]	22,73 ± 0,27	7,48 ± 0,84	3,0 ‡
Y08355	Sqstm1 (sequestosome 1)	biological_process unknown [0000004]	7,48 ± 1,79	2,52 ± 1,32	3,0
AF245040	Dkk3 (dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis))	cell adhesion [0007155]	3,14 ± 0,15	1,11 ± 0,35	2,8 ‡
U12520	Tmed7 (transmembrane emp24 protein transport domain containing 7)	biological_process unknown [0000004]	5,03 ± 0,5	1,8 ± 0,29	2,8
NM_013092	Cma1 (chymase 1, mast cell)	proteolysis and peptidolysis [0006508]	4,86 ± 0,07	1,75 ± 0,14	2,8 ‡
NM_013146	Cald1 (caldesmon 1)	muscle development [0007517]	5,88 ± 0,9	2,14 ± 1,13	2,7
U05224	F344 clone pCRJT4	biological_process unknown [0000004]	16,72 ± 2,49	6,18 ± 0,8	2,7
L10339	Eef1a2 (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2)	protein synthesis elongation [0006414]	26,44 ± 0,17	9,79 ± 0,76	2,7 ‡
NM_019380	Sdfr1 (stromal cell derived factor receptor 1)	cell surface receptor linked signal transduction [0007166]	3,44 ± 0,15	1,29 ± 0,26	2,7 ‡
NM_020075	Elf5 (eukaryotic initiation factor 5)	translational regulation, initiation [0006446]	6,7 ± 1,47	2,53 ± 0,67	2,7
AB022209	Hnrpf (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F)	RNA processing [0006396]	5,68 ± 0,81	2,22 ± 0,35	2,6
AF178669	P34 (p34 protein)	biological_process unknown [0000004]	5,1 ± 0,39	2 ± 0,64	2,5
NM_017181	Fah (fumarylacetoacetate hydrolase)	tyrosine catabolism [0006572]	4,9 ± 0,48	1,97 ± 1,09	2,5
X82636	Uba52 (ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1)	polyubiquitylation [0000209]	5,66 ± 0,36	2,29 ± 1	2,5
NM_019285	Adcy4 (adenylate cyclase 4)	ion transport [0006811]	4,89 ± 1,17	2,11 ± 1,25	2,3
NM_013050	Ube2i (ubiquitin conjugating enzyme E2i)	ubiquitin-dependent protein degradation [0006511]	4,44 ± 0,25	1,94 ± 0,02	2,3

Tableau 6. Gènes inhibés dans les cellules PC12 après 3 h de SHF.

1 moyenne du niveau d'expression (± l'intervalle de confiance) en unité arbitraire dans la condition contrôle.

2 moyenne du niveau d'expression (± l'intervalle de confiance) en unité arbitraire dans l'échantillon soumis à la stimulation électrique à haute fréquence (SHF)

3 facteur de variation de l'expression entre les conditions contrôles et SHF. Les différences entre les valeurs contrôle et SHF sont statistiquement significatives (test de Student, unilatéral, hétéroscédastique) avec $p < 5\%$ (‡ : $p < 1\%$).

GenBank #	Gene name	Gene ontology	control ¹	HFS ²	fold change ₃
NM_012919	Cacna2d1 (calcium channel, voltage-dependent, alpha2/delta subunit 1)	ion transport [0006811]	0	2,57 ± 0,37	ND
M16758	alpha-1-RNA (small cytoplasmic RNA)	biological_process unknown [0000004]	0	5,04 ± 0,91	ND
X67877	Phax (phosphorylated adaptor for RNA export)	biological_process unknown [0000004]	0	2,61 ± 1,06	ND
NM_012825	Aqp4 (aquaporin 4)	water transport [0006833]	0	8,49 ± 2,08	ND
L19658	Cd36 (cd36 antigen)	transport [0006810]	0,43 ± 0,79	4,35 ± 0,54	10,1
M32509	Hbb (hemoglobin beta chain complex)	transport [0006810]	1,46 ± 0,71	8,63 ± 0,31	5,9 ‡
AF042714	Nxph4 (neurexophilin 4)	transcription regulation [0006355]	0,43 ± 0,3	1,72 ± 0,6	4,0
U95001	DRCF-5 (developmentally-regulated cardiac factor)	biological_process unknown [0000004]	1,12 ± 0,91	3,84 ± 0,7	3,4
AF034241	similar to mitochondrial ribosomal protein S24	biological_process unknown [0000004]	3,2 ± 1,76	8,77 ± 0,61	2,7
D13061	Ak2 (adenylate kinase 2)	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism [0006139]	0,69 ± 0,33	1,79 ± 0,47	2,6
U14533	Nr1h2 (nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2)	transcription regulation [0006355]	1,46 ± 0,21	3,75 ± 0,7	2,6
D84336	Dlk1 (delta-like 1 homolog (Drosophila))	developmental processes [0007275]	2,79 ± 0,78	6,85 ± 0,49	2,5
AF034239	DD6A4-2(5)	biological_process unknown [0000004]	2,75 ± 1,63	6,55 ± 1,84	2,4
AF040954	Pp1r10 (protein phosphatase 1, regulatory subunit 10)	protein-nucleus import [0006606]	9,35 ± 2,18	19,71 ± 2,4	2,1
AF287301	Kcnk13 (potassium channel, subfamily K, member 13)	potassium transport [0006813]	2,48 ± 0,52	5,23 ± 0,13	2,1
AF044081	Star (steroidogenic acute regulatory protein)	C21-steroid hormone biosynthesis [0006700]	0,89 ± 0,2	1,82 ± 0,41	2,1
AJ238392	Sult1c2 (sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2)	steroid metabolism [0008202]	36,88 ± 0,3	69,07 ± 2,35	1,9
M57235	Cebpb (CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta)	transcription regulation [0006355]	3,56 ± 0,79	6,37 ± 1,03	1,8
NM_012632	Prp15 (proline-rich protein 15)	biological_process unknown [0000004]	28,31 ± 4,23	49,37 ± 1,8	1,7

Tableau 7. Gènes activés dans les cellules PC12 après 3 h de SHF.

¹ moyenne du niveau d'expression (± l'intervalle de confiance) en unité arbitraire dans la condition contrôle.

² moyenne du niveau d'expression (± l'intervalle de confiance) en unité arbitraire dans l'échantillon soumis à la stimulation électrique à haute fréquence (SHF)

³ facteur de variation de l'expression entre les conditions contrôles et SHF. Les différences entre les valeurs contrôle et SHF sont statistiquement significatives (test de Student, unilatéral, hétéroscédastique) avec p<5% (‡ : p<1%).

Cette action majoritairement inhibitrice, sur des gènes liés notamment à la synthèse (eef1 α 2, eif5, uba56, nudt6-gfg, protéines ribosomales P34, S2, S9, L8, L8a, L13a, L14, L32, ubiquitine-L40) ou à la dégradation (psma2, psmd1, uba52, ube2i, prei3, trypsine Vb, cma1, ubiquitine-L40) protéique nous ont conduit à réaliser une analyse de l'expression protéique dans des conditions de stimulation. Il faut aussi noter la régulation de gènes liés à la transcription et à la maturation des ARN (npm1, hnrpk, hnrpa1, hnrpf, nol5, nxph4, ak2, nr1h2, cebpb).

2. Analyse de l'expression protéique

Afin de vérifier si la SHF a une influence globale sur la production protéique des cellules, telle que suggérée par les résultats de l'analyse transcriptomique, nous avons utilisé deux méthodes : l'incorporation de méthionine marquée au ³⁵S et la spectrométrie de masse SELDI-TOF.

2.1. Incorporation de méthionine marquée

Des expériences indépendantes ont été menées sur les lignées cellulaires PC12 et GH3. Elles montrent une diminution significative de l'incorporation de méthionine marquée dans les conditions de stimulation HF par rapport au contrôle. Cette diminution est constatée après une stimulation de 24 h mais également après une stimulation de 3 h.

Les protéines sont détectées après électrophorèse (SDS-PAGE) de l'extrait cellulaire puis analysées quantitativement à l'aide d'un détecteur à haute-sensibilité PhosphoImager.

La comparaison avec les bandes du standard de masse moléculaire *Full range Rainbow*TM (Amersham), montre que les protéines détectées présentent des masses comprises entre 20 et 75 kDa.

Les quantités de radioactivité incorporée, mesurées par unité de surface de gel, ont été comparées entre les cellules témoins et stimulées (Figures 25 à 32). Une analyse statistique des résultats par le test de Student montre que la diminution de l'incorporation de méthionine marquée est significative dans les cellules stimulées par rapport aux cellules contrôles et ceci quelles que soient les cellules (GH3 ou PC12) ou le temps de stimulation (3 h ou 24 h).

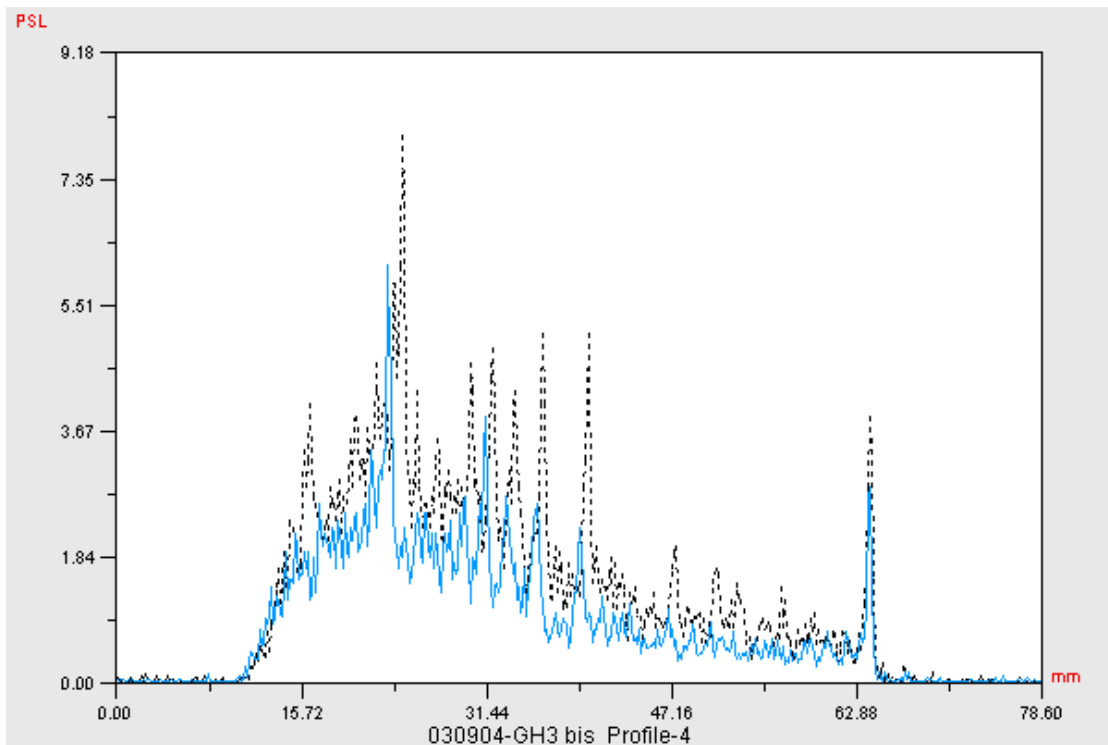


Figure 25. Profil de migration protéique pour les cellules GH3 après 3h de stimulation. noir : contrôle ; bleu : SHF 3h.

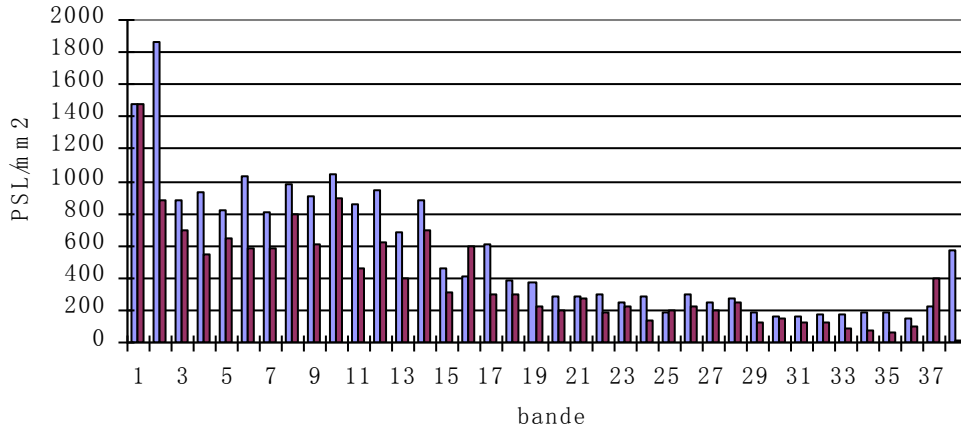


Figure 26. Comparaison pour les cellules GH3, après 3h de traitement, de la quantité de radioactivité par unité de surface pour chacune des bandes protéiques. Bleu : contrôle ; rose : SHF. L'inhibition globale est de 28,64%. Pour chacune des 4 expériences indépendantes l'inhibition globale est de 25,85% ($p=0,044$) ; 22,16% ($p<0,001$) ; 26,85% ($p=0,055$) ; 39,69% ($p<0,001$).

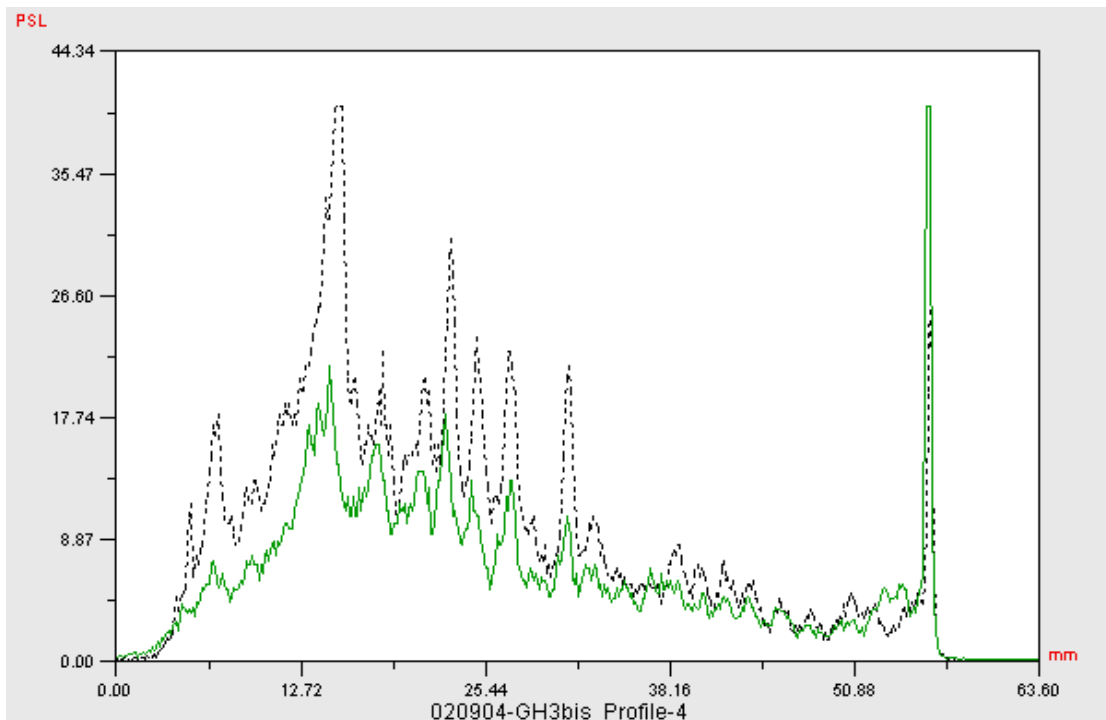


Figure 27. Profil de migration protéique pour les cellules GH3 après 24h de stimulation. noir : contrôle ; vert : SHF 24h.

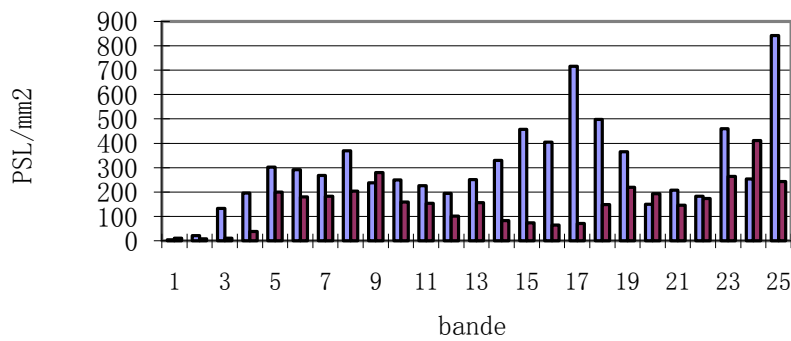


Figure 28. Comparaison pour les cellules GH3, après 24h de traitement, de la quantité de radioactivité par unité de surface pour chacune des bandes protéiques. Bleu : contrôle ; rose : SHF. L'inhibition globale est de 46,53%. Pour chacune des 4 expériences indépendantes l'inhibition globale est de 58,35% ($p < 0,001$) ; 52,58% ($p < 0,001$) ; 40,94% ($p = 0,001$) ; 34,27% ($p = 0,001$)

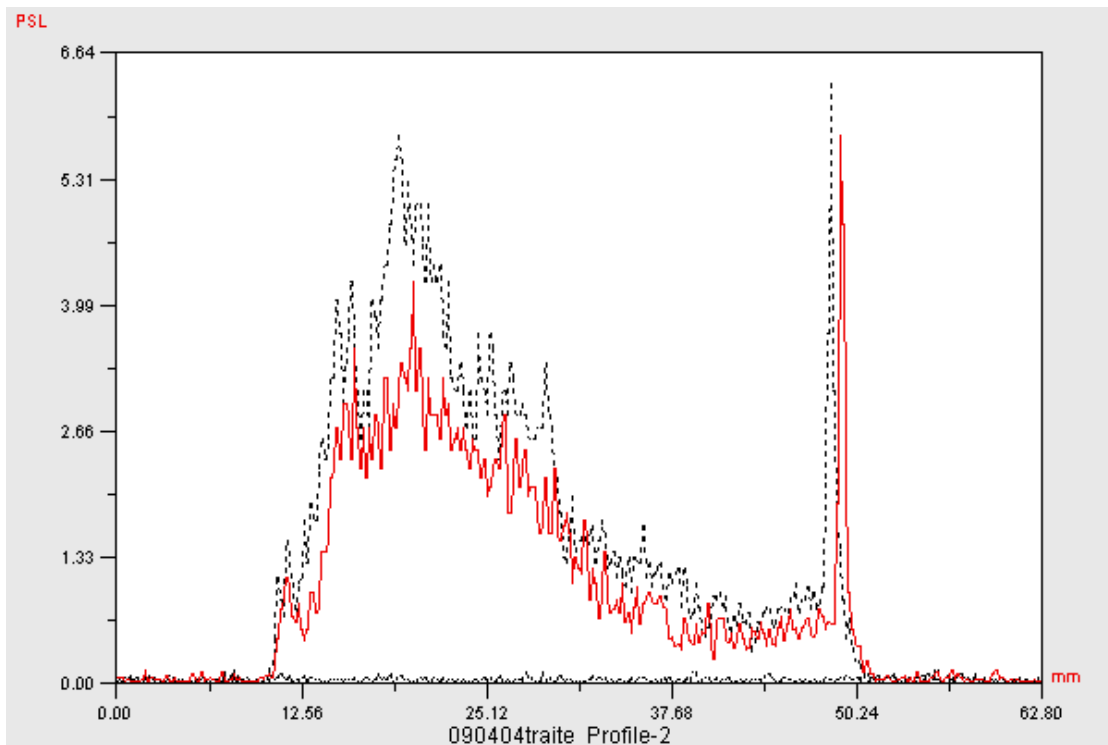


Figure 29. Profil de migration protéique pour les cellules PC12 après 3h de stimulation. noir : contrôle ; rouge : SHF 3h.

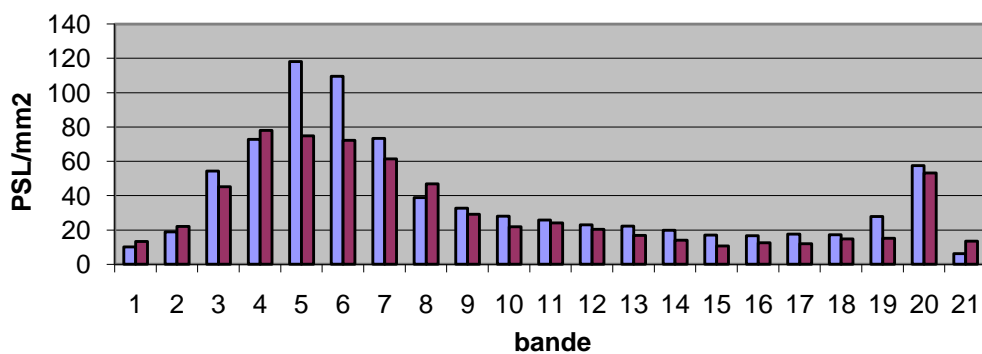


Figure 30. Comparaison pour les cellules PC12, après 3h de traitement, de la quantité de radioactivité par unité de surface pour chacune des bandes protéiques. Bleu : contrôle ; rose : SHF. Pour chacune des 2 expériences indépendantes l'inhibition globale est de 16,73% ($p < 0,001$) ; 12,59% ($p < 0,01$).

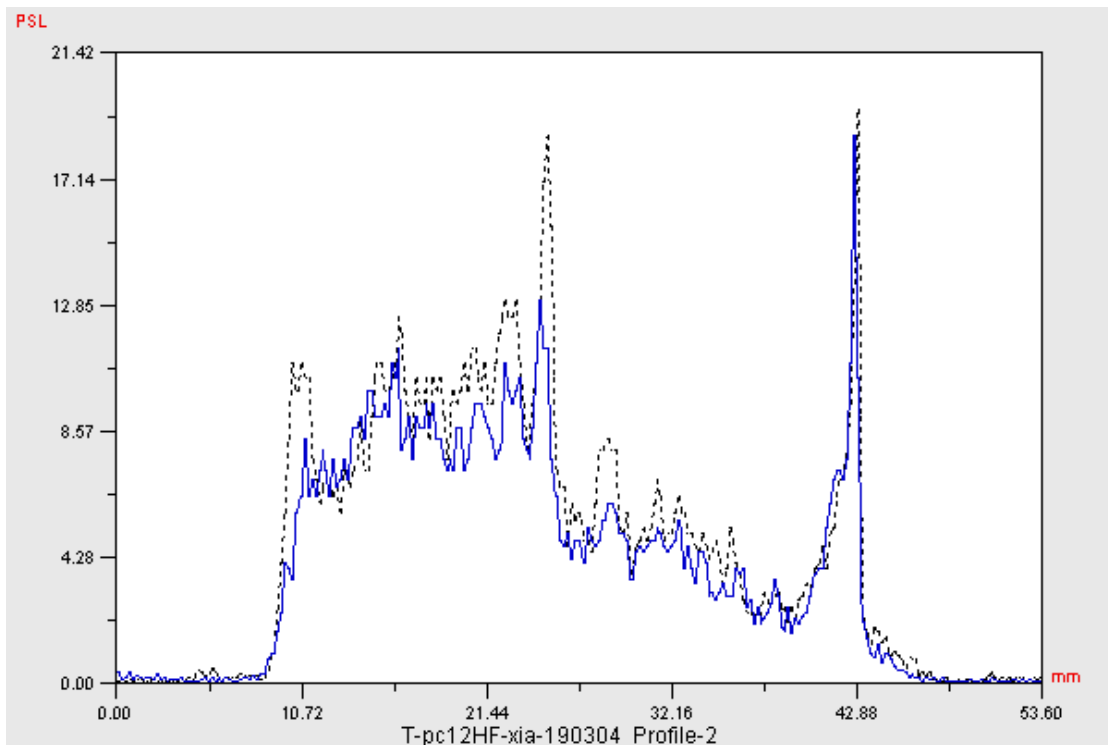


Figure 31. Profil de migration protéique pour les cellules PC12 après 24h de stimulation. Noir : contrôle ; bleu : SHF 24h.

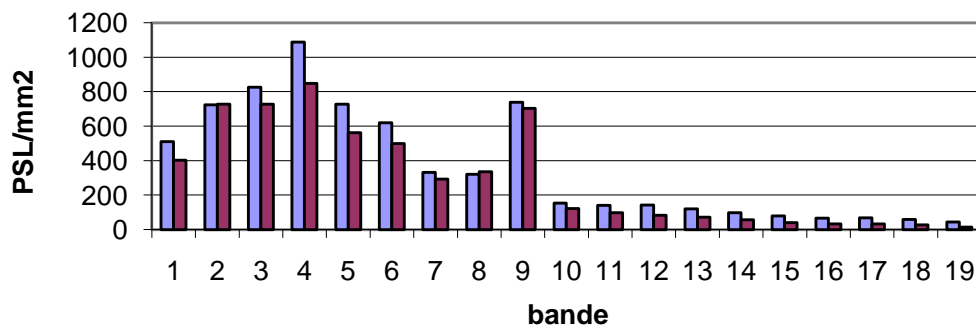


Figure 32. Comparaison pour les cellules PC12, après 24h de traitement, de la quantité de radioactivité par unité de surface pour chacune des bandes protéiques. Bleu : contrôle ; rose : SHF. Pour chacune des 2 expériences indépendantes l'inhibition globale est de 17,16% ($p < 0,001$) ; 25,62% ($p = 0,003$).

Ces résultats de l'incorporation de méthionine par les cellules montrent que la SHF a une action inhibitrice globale sur la synthèse protéique des cellules avec des diminutions de 12 à 58 %. Il apparaît que les cellules GH3 sont plus sensibles quantitativement à la stimulation que les cellules PC12.

2.2. SELDI-TOF

Devant la difficulté pour réaliser *in vivo* l'étude de l'expression protéique globale, nous avons utilisé la technique d'imagerie protéomique *in situ* mise au point par le labo (Bouamrani et al. 2006) qui permet d'effectuer une cartographie globale des protéines. Il nous est apparu intéressant de réaliser au cours de cette étude une analyse avec un spectromètre de masse SELDI-TOF (*Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*).

De plus, avec le choix des différentes surfaces chromatographiques, il est possible de faire des analyses sur des fractions de l'échantillon ayant des propriétés physico-chimiques particulières (sub-protéomes). Après des études préliminaires nous avons choisi la surface H50 (hydrophobe) qui montre les profils les plus discriminants. Deux types d'analyse ont été appliqués sur les résultats bruts, une comparaison multiparamétrique des données quantitatives de différentes protéines et peptides détectés afin de déterminer ceux qui augmentent ou diminuent et une analyse non supervisée par *clustering* (*Eisen's Cluster* et *Treeview software*). Cette dernière méthode permet de regrouper les échantillons en fonction de similarités dans les niveaux de chaque pic protéique. Il est ainsi possible d'obtenir un profil typique des conditions expérimentales.

Les résultats SELDI-TOF sur les cellules GH3 et PC12 montrent que la plupart des peptides et protéines détectés sont quantitativement diminués après un traitement de 3h par SHF (Figure 33).

Pour les cellules GH3, 32 des 47 pics détectés, soit 68%, sont diminués par la SHF. Pour les cellules PC12 ce sont 28 des 33 pics qui sont diminués par la SHF, soit 85%. Il existe donc un certain nombre de pics qui sont augmentés par la SHF ce qui tend à montrer que la SHF agit par des mécanismes spécifiques et non par une simple diminution de l'activité cellulaire.

Il semble que les cellules PC12 soient plus sensibles qualitativement à la stimulation que les cellules GH3.

L'analyse par *clustering* non supervisé permet de regrouper les cellules contrôles d'une part et les cellules traitées par SHF d'autre part, faisant apparaître ainsi une signature protéomique spécifique de la SHF (Figure 34).

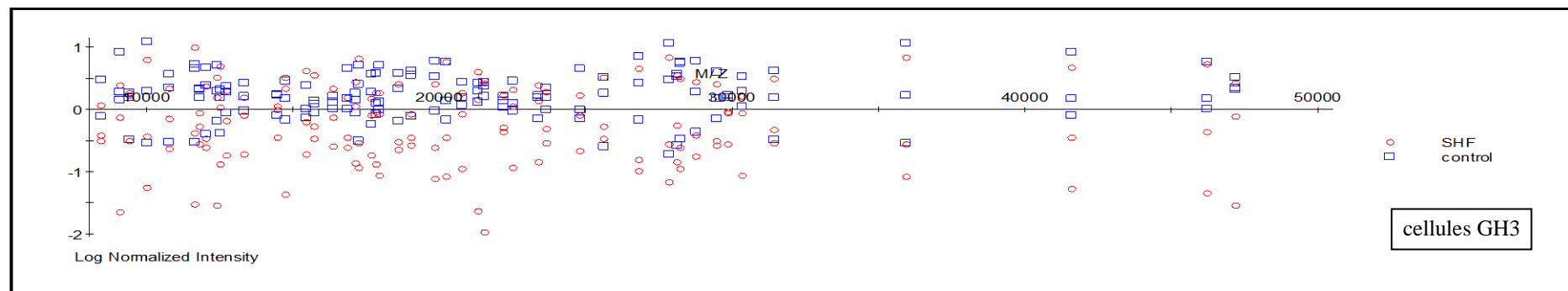
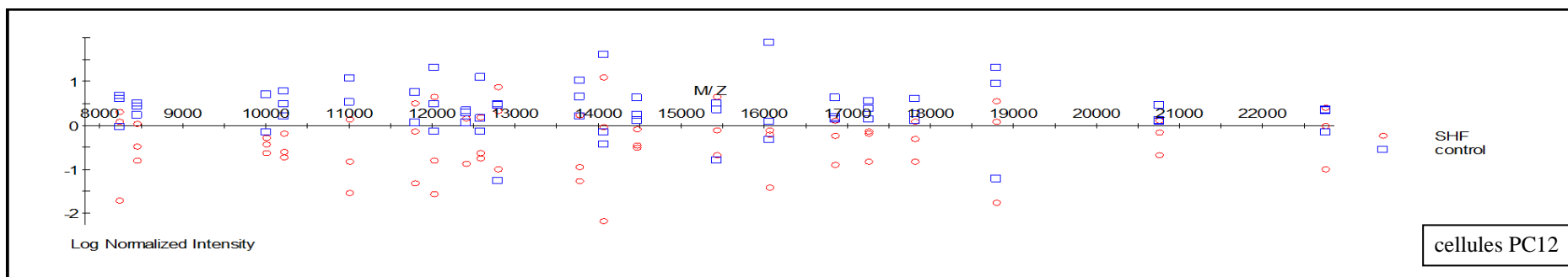


Figure 33. Distribution des peptides et protéines détectés. Comparaison entre les groupes contrôle et SHF pour les cellules PC12 et GH3 sur barrettes H50.

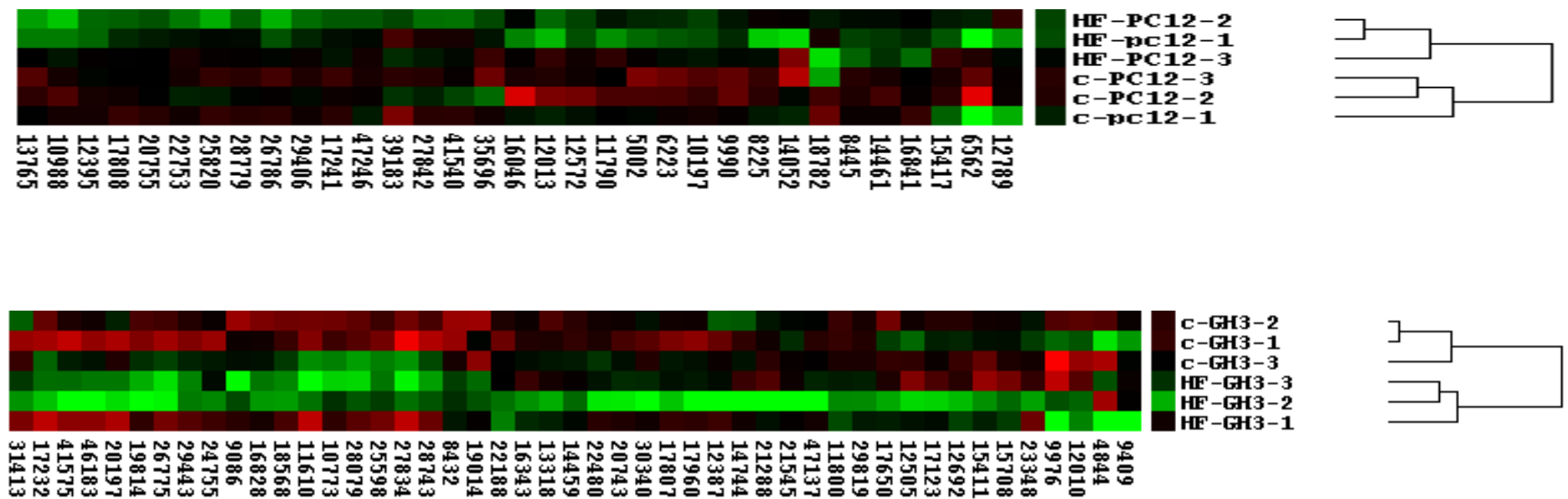


Figure 34. Clustering de Eisen des données SELDI-TOF en fonction de la moyenne des intensités. Comparaison entre les groupes contrôle et SHF pour les cellules PC12 et GH3.

D. Validation *in vivo*

Afin de valider ces résultats nous avons voulu revenir sur une expérimentation *in vivo*.

La technique SELDI-TOF peut être appliquée sur des coupes fines de tissus de manière géographique, permettant ainsi d'obtenir une imagerie tissulaire protéomique.

Nous avons réalisé une stimulation électrique à haute fréquence au niveau cortical sur des cerveaux de souris. Après 3 heures de stimulation le cerveau est disséqué au niveau de la zone de stimulation. Après avoir vérifié l'absence de lésion par une analyse histologique nous avons analysé les niveaux d'expression protéique locaux par imagerie tissulaire protéomique SELDI-TOF, avec des barrettes H50 et CM10, sur une zone de 2 mm à partir du point d'implantation de l'électrode (Figure 35). On observe que l'expression protéique est très faible au contact de l'électrode et sur une zone de 1 mm environ. Puis l'expression protéique augmente en s'éloignant de l'électrode jusqu'à une distance de 2 mm environ à partir de laquelle le courant électrique paraît ne plus avoir d'effet.

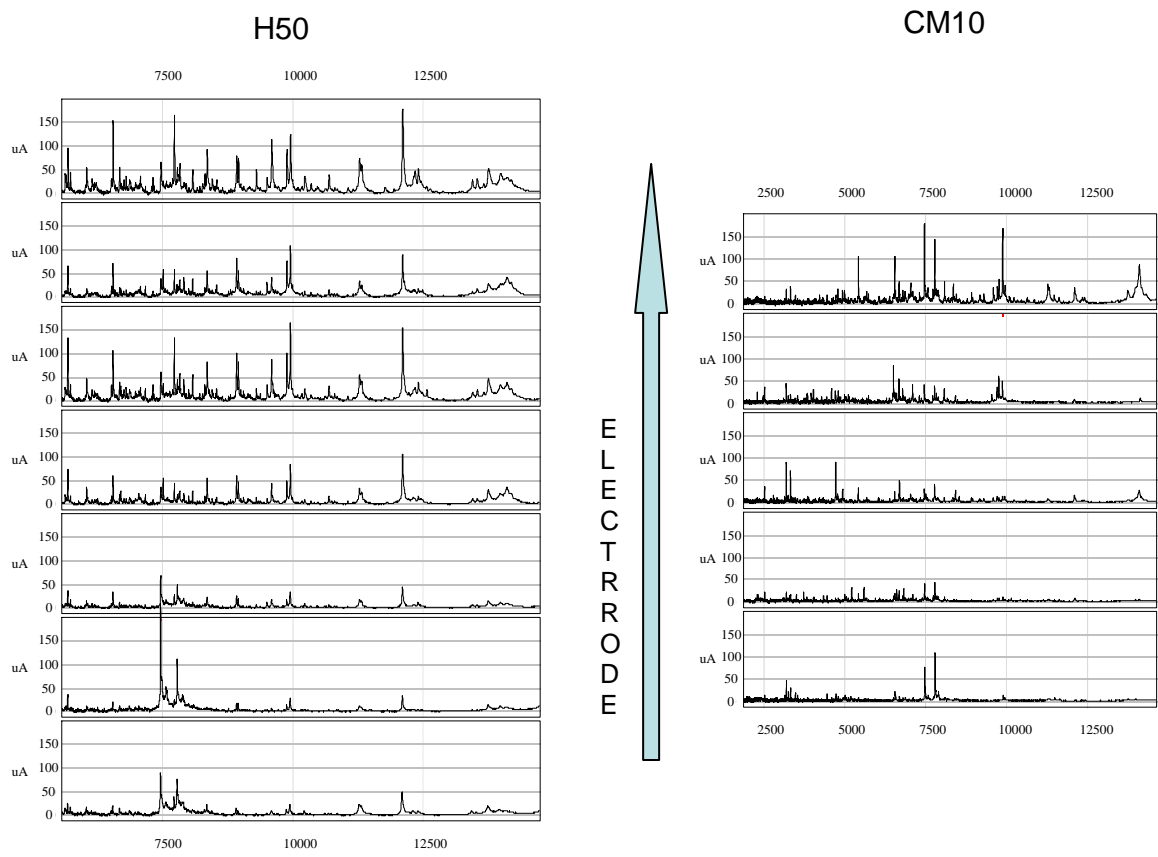


Figure 35. Figure. Analyse protéomique SELDI-TOF in situ sur coupe autour de l'électrode de stimulation corticale.

Chapitre V : Discussion

A. Première approche in vivo

Afin de nous rapprocher le plus possible des conditions expérimentales d'autres études nous avons d'abord envisagé de réaliser cette étude sur des modèles de rat. Le modèle de lésion par la 6-OHDA et le système de SCP est bien maîtrisé dans le laboratoire mais nous devons nous assurer de la compatibilité de ces protocoles avec l'étude du transcriptome par micro-array envisagée.

1. Importance du contrôle qualité

Nos études préliminaires ont montré que le protocole habituel de fixation des cerveaux au PFA était incompatible avec l'obtention d'ARN de qualité satisfaisante. Nous avons pu mettre au point un protocole de conservation et coloration des coupes de cerveau compatible avec l'étude du transcriptome. Cette méthode consiste en une congélation rapide du cerveau immédiatement après la dissection, la réalisation de coupes microscopiques, l'utilisation d'un traitement de préservation des ARN au *RNA later* et enfin une coloration à l'hématoxyline.

La plupart des articles, utilisant la technique de micro-array, ne faisant pas mention d'un contrôle de qualité des ARN autre que l'obtention de résultats ou la possibilité de faire la rétro-transcription d'un ARN de contrôle, nous avons voulu vérifier si une dégradation partielle des ARN affecte la validité des données. Nous avons donc réalisé

en parallèle l'hybridation, sur deux membranes micro-array MWG, d'un ARN de bonne qualité et d'un ARN partiellement dégradé d'après l'analyse sur Bioanalyzer. Cette étude montre un impact majeur de la dégradation sur le profil d'expression apparent (Tableau 4 et Figure 22). Certains gènes ont une expression apparente largement augmentée et d'autres largement diminuée, donnant l'impression de deux échantillons totalement différents. Il apparaît donc crucial de pouvoir effectuer un contrôle de la qualité de l'échantillon ARN avant l'hybridation sur membrane micro-array.

2. Limites technologiques

Il est connu que la zone d'efficacité de la SCP est très petite, de l'ordre de 1 à 2 mm de l'électrode, nous avons donc essayé de micro-disséquer les structures cérébrales d'intérêt afin que les résultats obtenus ne perdent pas leur significativité du fait d'une dilution de l'effet de la stimulation. Nous avons utilisé un microscope à microdissection *PALM laserbeam microsystem* et il a été possible d'isoler certaines structures cérébrales de manière précise. Malheureusement les quantités de tissus isolées ne permettaient que l'extraction d'une quantité d'ARN trop faible pour pouvoir réaliser les contrôles de qualité nécessaires et l'analyse par micro-array. Ces limites nous ont conduits à réorienter l'étude par une approche *in vitro* qui permet l'obtention d'une quantité d'ARN suffisante pour la réalisation des contrôles de qualité indispensables à la fiabilité des résultats.

B. Étude *in vitro*

Nous avons mené cette étude à l'aide d'un système de stimulation de cellules en culture mis au point dans le laboratoire.

1. Criblage d'expression génique par micro-array

Cette étude a été menée par micro-array en utilisant la banque d'oligonucléotides *Sigma Genosys Pan rat 5K* de façon à explorer globalement les changements d'expression génique induits par la stimulation haute fréquence (SHF). La méthode utilisée permet la normalisation des résultats en fonction de la quantité de sonde oligonucléotique déposée sur la membrane. L'absence de ce type de contrôle, ainsi que du contrôle de la qualité des échantillons d'ARN, pourrait être à l'origine d'une part de la non-reproductibilité des résultats parfois relevée dans le domaine de l'analyse transcriptomique.

Parmi les gènes analysés environ 200 ont été détectés comme exprimés dans les cellules, 56 de ces gènes ont leur expression modifiée d'un facteur supérieur à deux par la SHF. 37 gènes sont inhibés par la SHF dont 3 totalement (Tableau 6) alors que 19 gènes sont surexprimés dont 4 qui ne sont pas exprimés dans la condition contrôle (Tableau 7). On remarque que les 2/3 des gènes modulés le sont à la baisse et que 1/3 seulement des gènes modulés le sont à la hausse. Bien que les phénomènes d'inhibition apparaissent largement majoritaires il semble bien s'agir d'une véritable reprogrammation du fonctionnement de la cellule.

Les gènes dont l'expression est modifiée peuvent être classés en plusieurs catégories selon leur fonction biologique :

- canaux ioniques et transduction du signal (- : *mclc*, *cacna1d*, *rsg4*, *stmn1*, *rhoA*, *rheb*, *cald1*, *sdf1*, *adcy4* ; + : *cacna2d1* ; *nr1h2*, *kcnk13*)
- transcription et maturation des ARN (- : *npm1*, *hnrpk*, *nol5*, *hnrpa1*, *hnrpf* ; + : *phax*, *nxph4*, *cebpb*)
- synthèse, élongation, maturation et dégradation des protéines (- : *nudt6*, *psma2*, *prei3*, *psmd1*, *lin7a*, *trypsine Vb*, *cma1*, *Eef1a2*, *Eif5*, *uba52*, *ube2i*)
- énergétique cellulaire (- : *atp5b*, *pgk1*)

Un certain nombre de gènes ne peuvent pas être classés, soit parce que leur fonction est inconnue, soit parce qu'elle est difficile à relier aux conditions étudiées. Bien que devant être pris avec certaines précautions du fait de la moindre qualité de la sélection des oligonucléotides, les résultats de l'analyse protéomique avec le set MWG (Tableau 5) sont intéressants car ils montrent une inhibition de la transcription des gènes de plusieurs sous-unités du ribosome (S2, S9, L8, L8a, L13a, L14, L32, L40).

Une vue d'ensemble de ces données suggère une diminution de l'activité cellulaire globale (modification de la régulation de la transcription, diminution de l'énergétique cellulaire et diminution des synthèses protéiques). Il était intéressant de vérifier cet effet sur la synthèse protéique des cellules.

2. Analyse de l'expression protéique

Nous avons utilisé deux méthodes : l'incorporation de méthionine radioactive et la spectrométrie de masse SELDI-TOF.

Ces techniques ont confirmé une inhibition globale de la synthèse protéique dans les cellules soumises à la SHF mais, de même qu'au niveau transcriptomique, il existe un certain nombre de pics protéiques qui sont augmentés. La SHF produit donc une véritable modification de l'activité de la cellule qui est beaucoup plus complexe qu'une simple mise en sommeil.

C. Retour *in vivo*

Après avoir validé cette diminution de la synthèse protéique il était important de revenir sur un modèle *in vivo* afin de vérifier l'existence d'un tel effet dans une situation de stimulation cérébrale.

L'expérience clinique a montré que la zone d'efficacité de la stimulation n'est que de quelques millimètres autour du plot de l'électrode, avec une diminution rapide de l'efficacité en fonction de l'éloignement. La faiblesse des volumes tissulaires dans la zone d'efficacité fait qu'il est difficile d'observer les effets moléculaires de la stimulation sans un important effet de dilution. Il était important de pouvoir mettre en évidence des différences d'expression protéique entre des points situés à très courte distance de l'électrode. L'utilisation d'une analyse SELDI-TOF géographique a permis de confirmer la diminution de la quantité de protéines à proximité immédiate de l'électrode (Figure 35). La diffusion de l'effet sur une distance de 1 à 2 mm correspond à ce qui est observé chez l'homme au niveau de l'effet clinique.

Chapitre VI : Conclusion

Le but de ce travail était de mettre en évidence des mécanismes nouveaux sous-tendant les effets de la neurostimulation à haute fréquence dans le cerveau. Prenant en compte la similitude d'effet entre la lésion et la neurostimulation à haute fréquence, un effet inhibiteur de cette approche est parfois proposé. Les données de la micro-dialyse cérébrale, dosant le GABA et le glutamate, ont donné des résultats contradictoires montrant à la fois une inhibition et une augmentation en particulier du glutamate. L'une des explications probables de ces incohérences apparentes pourraient être que le matériel utilisé provoque des microlésions des tissus analysés. De la même façon les analyses électro-physiologiques font apparaître des résultats dont l'analyse est rendue difficile par les artefacts dus à la stimulation elle-même.

Nous écartant des approches électro-physiologiques/dosages de neuromédiateurs classiques qui ont quasiment été les seules utilisées pour comprendre les mécanismes de la neurostimulation, nous avons mené une étude transcriptomique *in vitro* des effets de la SHF.

Parmi les gènes pour lesquels nous avons mis en évidence une régulation par la SHF, une sous-expression dans la majorité des cas, nous avons été surpris de constater la présence de nombreux gènes impliqués dans la synthèse protéique en particulier des gènes d'élongation (EEF) ou ribosomiaux. À travers cette conjonction de données transcriptomiques nous avons posé l'hypothèse d'un effet sur la synthèse protéique. Les

données obtenues *in vitro* montrent de façon très significative une inhibition de la synthèse protéique qui est confirmée *in vivo* sur une étude de la cartographie protéique *in situ*. L'effet de la neurostimulation étant très local, il est très difficile de prélever la zone d'efficacité de la neurostimulation qui se mélange avec la zone non efficace ce qui moyenne les résultats par un effet de dilution. Ainsi, seule une analyse *in situ* utilisant l'imagerie protéomique à grande résolution permet de confirmer, chez l'animal, notre hypothèse.

Des données récentes sont venues confirmer l'importance de la synthèse protéique (traduction, élongation) dans la physiologie neuronale, par exemple la régulation locale de la synthèse protéique intervient dans l'apprentissage (Tsokas et al. 2007). Il a également été montré qu'une diminution de la traduction est un mécanisme neuronal de protection en réponse à un stress (Paschen et al. 2007). Une diminution rapide de la synthèse protéique et l'inhibition de la synthèse protéique est un mécanisme neuroprotecteur puissant en particulier vis à vis du glutamate.

Ainsi il pourrait être envisagé que la neurostimulation à haute fréquence constitue un stress pour la structure cible et que les cellules réagiraient par une sidération rapide de la synthèse protéique, participant ainsi, par un mécanisme complémentaire de ceux précédemment révélés, à inactiver la structure tout en la protégeant. Ce type de réponse est également mis en évidence dans les phénomènes liés à l'hibernation chez les animaux (Frerichs et al. 1998).

En conclusion nous avons pu mettre en évidence un mécanisme original. Il pourrait passer par l'activation de molécules membranaires puis par la cascade de signalisation calcique en régulant notamment l'élongation protéique comme le suggèrent les gènes

dont l'expression est modifiée. Ce mécanisme inhibiteur global de la synthèse protéique dans le cerveau participant probablement aux effets de la SHF en inhibant la structure fonctionnellement mais aussi en la protégeant. Les données moléculaires rapportées dans cette étude montrent que l'impact de la SHF n'est pas un unique problème d'activation ou d'inhibition de la structure cible mais qu'il y a une véritable reprogrammation cellulaire qui est faite.

Les perspectives sont cruciales, pour mimer les effets de la neurostimulation par exemple en inhibant par des drogues injectées localement le NST comme cela a été fait récemment avec la GAD. Mais aussi en mettant au point de nouveaux dispositifs intracérébraux inhibant les structures cérébrales, par le froid par exemple.

Bibliographie

- (2000). "Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson disease: A randomized controlled trial. Parkinson Study Group." Journal of the American Medical Association **284**(15): 1931-8.
- (2000). Press Release October 9, 2000: Nobel Prize in Physiology or Medicine 2000, Nobelförsamlingen Karolinska Institutet. **2004**.
- (2002). "Factors impacting on quality of life in Parkinson's disease: results from an international survey." Movement Disorders **17**(1): 60-7.

A

- Agid, Y. et J. Blin (1987). "Nerve cell death in degenerative diseases of the central nervous system: clinical aspects." Ciba Foundation Symposium **126**: 3-29.
- Agid, Y. (1991). "Parkinson's disease: pathophysiology." Lancet **337**(8753): 1321-4
- Agid, Y. (2001). "Levodopa. Is toxicity a myth? 1998." Neurology **57**(10 Suppl 3): S46-51.
- Albin, R. L., J. W. Aldridge, et al. (1989). "Feline subthalamic nucleus neurons contain glutamate-like but not GABA- like or glycine-like immunoreactivity." Brain Research. **491**(1): 185-188.
- Albin, R. L., A. B. Young, et al. (1989). "The functional anatomy of basal ganglia disorders." Trends in Neurosciences **12**(10): 366-75.
- Alexander, G. E., Crutcher, M. D. (1990). "Functionnal architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing." Trends in Neurosciences **13**(7): 266-71.
- Aoyama, K., K. Matsubara, M. Kondo, Y. Murakawa, M. Suno, K. Yamashita, S. Yamagushi et S. Kobayashi (2001). "Nicotinamide-N-methyltransferase is higher in the lumbar cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease." Neuroscience Letters **298**: 78-80.
- Araki, M., P. L. McGeer, et al. (1985). "Striatonigral and pallidonigral pathways studied by a combination of retrograde horseradish peroxidase tracing and a pharmacohistochemical method for gamma-aminobutyric acid transaminase." Brain Research **331**(1): 17-24.

B

- Bacci JJ, Salin P, Kerkerian-Le Goff L. (2004) "Systemic administration of dizocilpine maleate (MK-801) or L-dopa reverses the increases in GAD65 and GAD67 mRNA expression in the globus pallidus in a rat hemiparkinsonian model." Synapse **46**(4):224-34.

Baldereschi, M., A. Di Carlo, W. A. Rocca, P. Vanni, S. Maggi, E. Perissinotto, F. Grigoletto, L. Amaducci et D. Inzitari (2000). "Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. ILSA Working Group. Italian Longitudinal Study on Aging." Neurology **55**(9): 1358-63.

Barkats, M., A. Bilang-Bleuel, M. H. Buc-Caron, M. N. Castel-Barthe, O. Corti, F. Finiels, P. Horellou, F. Revah, O. Sabate, J. Mallet (1998). "Adenovirus in the brain: recent advances of gene therapy for neurodegenerative diseases." Progress in Neurobiology **55**: 333-41.

Benabid, A. L., P. Pollak, A. Louveau, S. Henry and J. de Rougemont (1987). "Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease." Applied Neurophysiology **50**(1-6): 344-6.

Benabid, A. L. et L. Jeaugey (1989). "Cells of the rat lateral habenula respond to high-threshold somatosensory inputs." Neuroscience Letters **96**(3): 289-94.

Benabid, A. L., P. Pollak, C. Gervason, D. Hoffmann, D. M. Gao, M. Hommel, J. E. Perret et J. de Rougemont (1991). "Long-term suppression of tremor by chronic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus." Lancet **337**(8738): 403-6.

Benabid, A. L. et P. Pollak (1993). "Maladie de Parkinson - Les nouvelles approches chirurgicales et médicales." Der informierte Arzt - Gazette Médicale **14**: 885-891.

Benabid, A. L., P. Pollak, C. Gross, D. Hoffmann, A. Benazzouz, D. M. Gao, A. Laurent, M. Gentil et J. Perret (1994). "Acute and long-term effects of subthalamic nucleus stimulation in Parkinson's disease." Stereotactic and Functional Neurosurgery **62**(1-4): 76-84.

Benabid, A. L., P. Pollak, D. Gao, D. Hoffmann, P. Limousin, E. Gay, I. Payen et A. Benazzouz (1996). "Chronic electrical stimulation of the ventralis intermedius nucleus of the thalamus as a treatment of movement disorders." Journal of Neurosurgery **84**(2): 203-14.

Benabid, A. L., A. Benazzouz, D. Hoffmann, P. Limousin, P. Krack et P. Pollak (1998). "Long-term electrical inhibition of deep brain targets in movement disorders." Movement Disorders **13**(Suppl 3): 119-25.

Benabid, A. L., A. Koudsie, P. Pollak, P. Kahane, S. Chabardes, E. Hirsch, C. Marescaux et A. Benazzouz (2000). "Future prospects of brain stimulation." Neurological Research **22**(3): 237-46.

Benabid, A. L., A. Benazzouz and P. Pollak (2002). "Mechanisms of deep brain stimulation." Movements Disorders **17** (Suppl 3): S73-4.

Benabid, A. L., A. Koudsie, A. Benazzouz, J. F. Le Bas and P. Pollak (2002). "Imaging of subthalamic nucleus and ventralis intermedius of the thalamus." Movement Disorders **17**(Suppl 3): S123-9.

Benabid, AL. L., J. F. Le Bas, P. Pollak (2003). "Apport thérapeutique et physiologique de la stimulation des structures cérébrales profondes dans la maladie de Parkinson." Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine **187**(2): 305-322.

Benazzouz, A., B. Piallat, P. Pollak and A. L. Benabid (1995). "Responses of substantia nigra pars reticulata and globus pallidus complex to high frequency stimulation of the subthalamic nucleus in rats: electrophysiological data." Neuroscience Letter **189**(2): 77-80.

Bennett, D. A., L. A. Beckett, A. M. Murray, K. M. Shannon, C. G. Goetz, D. M. Pilgrim et D. A. Evans (1996). "Prevalence of parkinsonian signs and associated mortality in a community population of older people." New England Journal of Medicine **334**(2): 71-6.

Betarbet, R., T. B. Sherer, G. Mac Kenzie, M. Garcia-Osuna, A. V. Panov et J. T. Greenamyre (2000). "Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease." Nature Neuroscience.

Bezard, E. et C. E. Gross (1998). "Compensatory mechanisms in experimental and human parkinsonism: towards a dynamic approach." Progress in Neurobiology **55**: 93-116.

Bilang-Bleuel, A., F. Revah, P. Colin, I. Locquet, J-J. Robert, J. Mallet et P. Horellou (1997). "Intrastriatal injection of an adenoviral vector expressing glial-cell-line-derived neurotrophic factor prevents dopaminergic neuron degeneration and behavioral impairment in a rat model of parkinson disease." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**: 8818-23.

Blandini, F., M. Garcia-Osuna et J. T. Greenamyre (1997). "Subthalamic ablation reverses changes in basal ganglia oxydative metabolism and motor response to apomorphine induced by nigrostriatal lesion in rats." European Journal of Neuroscience **9**:1407-13.

Blandini, F., G. Nappi, C. Tassorelli et E. Martignoni (2000). "Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease." Progress in Neurobiology **62**: 63-88

Blum, D., S. Torch, et al. (2001). "Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease." Progress in Neurobiology **65**(2): 135-72.

Bonifati, V., P. Rizzu, M. J. van Baren, O. Schaap, G. J. Breedveld, E. Krieger, M. C. J. Dekker, F. Squitieri, P. Ibanez, M. Joosse, J. W. van Dongen, N. Vanacore, J. C. van Swieten, A. Brice, G. Meco, C. M. van Duijn, B. A. Oostra et P. Heutink (2003). "Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism." Science **299**(5604):256-9

Boraud, T., E. Bezard, B. Bioulac et C. Gross (1996). "High frequency stimulation of the internal Globus Pallidus (GPi) simultaneously improves parkinsonian symptoms and reduces the firing frequency of GPi neurons in the MPTP-treated monkey." Neuroscience Letters **215**(1): 17-20.

Bouamrani, A., J. Ternier, D. Ratel, A. L. Benabid, J. P. Issartel, E. Brambilla et F. Berger (2006). "Direct-tissue SELDI-TOF mass spectrometry analysis: a new application for clinical proteomics." Clinical Chemistry **52**(11): 2103-6.

Bowers, W. J., D. F. Howard et H. J. Federoff (1997). "Gene therapeutic strategies for neuroprotection: implications for Parkinson's disease." Experimental Neurology **144**(1): 58-68.

Bravo, G., P. Mata and G. Seiquer (1967). "Surgery for bilateral Parkinson's disease." Confinia Neurologica **29**(2): 133-8.

Brevet, A., E. Pinto, J. Peacock et F. E. Stockdale (1976). "Myosin synthesis increased by electrical stimulation of skeletal muscle cell cultures." Science **193**(4258): 1152-4.

Brotchie, J. M., I. J. Mitchell, et al. (1991). "Alleviation of parkinsonism by antagonism of excitatory amino acid transmission in the medial segment of the globus pallidus in rat and primate." Movement Disorders **6**(2): 133-8.

Burbaud P, Gross C, Benazzouz A, Coussemaque M, Bioulac B (1995) "Reduction of apomorphine-induced rotational behaviour by subthalamic lesion in 6-OHDA lesioned rats is associated with a normalization of firing rate and discharge pattern of pars reticulata neurons." Experimental Brain Research; **105**(1):48-58.

Burton, E. A., J. C. Glorioso et D. J. Fink (2003). "Gene therapy progress and prospects: Parkinson's disease." Gene Therapy **10**: 1721-7.

C

Carvalho, G. A. et G. Nikkhah (2001). "Subthalamic nucleus lesions are neuroprotective against terminal 6-OHDA-induced striatal lesions and restore postural balancing reactions." Experimental Neurology **171**(2): 405-17.

Chan, P., C. M. Tanner, X. Jiang et J. W. Langston (1998). "Failure to find the α -synuclein gene missense mutation (G209A) in 100 patients with younger onset Parkinson's disease." Neurology **50**(2): 513-4.

Charcot, J-M. "Leçons sur les maladies du système nerveux." Paris: Delahaye, 1872-1873.

Cooper, I. S. (1965). "Surgical Treatment of Parkinsonism." Annual Reviews of Medicine **16**: 309-30.

D

Dauer, W. et S. Przedborski (2003). "Parkinson's disease: mechanisms and models." Neuron **39**(6): 889-909.

Dawson, T. M. and V. L. Dawson (2003). "Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease." Science **302**(5646): 819-22.

de Rijk, M. C., L. J. Launer, K. Berger, M. M. Breteler, J. F. Dartigues, M. Baldereschi, L. Fratiglioni, A. Lobo, J. Martinez-Lage, C. Trenkwalder et A. Hofman (2000). "Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group." Neurology **54**(11 Suppl 5): S21-3.

DeLong, M. R. (1990). "Primate models of movement disorders of basal ganglia origin." Trends in Neurosciences **13**(7): 281-285.

DeLong, M. R. (2002). Ch. 43: The Basal Ganglia. Principles of Neural Science. S. Kandel: 853-867.

Dostrovsky, J. O., R. Levy, J. P. Wu, W. D. Hutchison, R. R. Tasker et A. M. Lozano (2000). "Microstimulation-induced inhibition of neuronal firing in human globus pallidus." J Neurophysiol **84**(1): 570-4.

Di Monte, D. A. (2003). "The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins?" The Lancet **2**: 531-8

During, M. J., M. G. Kaplitt, M. B. Stern et D. Heidelberg (2001). "Subthalamic GAD gene transfer in Parkinson disease patients who are candidates for deep brain stimulation." Human Gene Therapy **12**(12): 1589-91.

E

Eisen, M. B., P. T. Spellman, P. O. Brown et D. Botstein (1998). "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns." Proceedings of the National Academy of Sciences USA **95**(25): 14863-8.

El Atifi, M., I. Dupré, B. Rostaing, E. M. Chambaz, A. L. Benabid et F. Berger (2002). "Long oligonucleotide arrays on nylon for large-scale gene expression analysis." Biotechniques **33**(3): 612-6.

El Atifi, M., I. Dupré, B. Rostaing, A. L. Benabid et F. Berger (2003). "Quantification of DNA probes on nylon micro-arrays using T4 polynucleotide kinase labeling." Biotechniques **35**(2): 262-4.

Elbaz, A., J. H. Bower, D. M. Maraganore, S. K. McDonnell, B. J. Peterson, J. E. Ahlskog, D. J. Schaid et W. A. Rocca (2002). "Risk tables for parkinsonism and Parkinson's disease." Journal of Clinical Epidemiology **55**(1): 25-31.

Emborg, M. E., M. Carbon, J. E. Holden, M. J. During, Y. Ma, C. Tang, J. Moirano, H. Fitzsimons, B. Z. Roitberg, E. Tuccar, A. Roberts, M. G. Kaplitt et D. Eidelberg (2007). "Subthalamic glutamic acid decarboxylase gene therapy: changes in motor function and cortical metabolism." Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism **27**(3): 501-9.

Engel, L. S., H. Checkoway, M. C. Keifer, N. S. Seixas, W. T. Longtreth Jr, K. C. Scott, K. Hudnell, W. K. Angers et R. Camicioli (2001). "Parkinsonism and occupational exposure to pesticides." Occupational and Environmental Medicine **58**: 582-9.

F

Fahn, S. (2003). "Description of Parkinson's Disease as a Clinical Syndrome." Annals of the New York Academy of Sciences

Fahn, S. (2003). "Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome." Annals of the New-York Academy of Sciences **991**: 1-14.

Freef, C. R., Greene, P. E., Breeze, R. E., Wei-Yann Tsai, DuMouchel, W., Kao, R., Dillon, S., Winfield, H., Culver, S., Trojanowsji, J. Q., Eidelberg, D., Fahn, S. (2001). "Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease." New England Journal of Medicine **344**(10): 710-19

Frerichs, K. U., C. B. Smith, M. Brenner, D. J. DeGracia, G. S. Krause, L. Marrone, T. E. Dever et J. M. Hallenbeck (1998). "Suppression of protein synthesis in brain during hibernation involves inhibition of protein initiation and elongation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **95**(24): 14511-6

G

Garcia, L., J. Audin, G. D'Alessandro, B. Bioulac et C. Hammond (2003). "Dual effect of high-frequency stimulation on subthalamic neuron activity." Journal of Neuroscience **23**(25): 8743-51.

García de Yébenes J. (2001). "Genética de la enfermedad de Parkinson." Neurología **16**: 1-6.

Garcia Ruiz, P. J. et E. Meseguer (2002). "Breve historia de la L-Dopa." Neurologia **17**(4): 214-7.

Gerfen, C. R. et T. M. Engber (1992). "Molecular neuroanatomic mechanisms of Parkinson's disease: a proposed therapeutic approach." Neurol Clin **10**(2): 435-49.

Gerfen, C. R., K. A. Keefe, et al. (1995). "D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons." Journal of Neuroscience **15**(12): 8167-76.

Gill, S. S., N. K. Patel, G. R. Hotton, K. O'Sullivan, R. McCarter, M. Bunnage, D. J. Brooks, C. N. Svendsen et P. Heywood (2003). "Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease." Nature Medicine **9**(5): 589-95.

Gluck, L., L. Alazay, D. Ratel, S. Puget et D. Wion (2001). "Quality control of plasmid preparations." Nature Biotechnology **19**(8):715

Gorell, J. M., C. C. Johnson, B. A. Rybicki, E. L. Peterson et R. J. Richardson (1998). "The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living." Neurology **50**(5): 1346-50.

Greene, L. A. et A. S. Tischler (1976). "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor." Proceedings of the National Academy of Sciences U S A **73**(7): 2424-8.

Groenewegen, H. J. and H. W. Berendse (1990). "Connections of the subthalamic nucleus with ventral striatopallidal parts of the basal ganglia in the rat." Journal of Comparative Neurology **294**(4): 607-22.

Gross, C. E., T. Boraud, D. Guehl, B. Bioulac et E. Bezard (1999). "From experimentation to the surgical treatment of Parkinson's disease: prelude or suite in basal ganglia research?" Progress in Neurobiology **59**(5): 509-32.

Guridi J., Herrero M. T., Luquin R., Guillen J. et J. A. Obeso (1994) "Subthalamotomy improves MPTP-induced parkinsonism in monkeys." Stereotactic and Functional Neurosurgery. **62**(1-4):98-102.

H

Hagell, P. et P. Brundin (2001). "Cell survival and clinical outcome following intrastriatal transplantation in Parkinson disease." Journal of Neuropathology and Experimental Neurology **60**(8): 741-52.

Hely, M. A., J. G. Morris, R. Traficante, W. G. Reid, D. J. O'Sullivan et P. M. Williamson (1999). "The sydney multicentre study of Parkinson's disease: progression and mortality at 10 years." Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry **67**(3): 300-7.

Hamada O., Garcia-Rill E. et R. D. Skinner (1992). "Respiration in vitro: I. Spontaneous activity." Somatosensory and Motor Research. **9**(4):313-26.

Hamada O., Garcia-Rill E. et R. D. Skinner (1992). "Respiration in vitro: II. Electrical stimulation." Somatosensory and Motor Research. **9**(4):327-37.

Hashimoto, T., C. M. Elder, M. S. Okun, S. K. Patrick et J. L. Vitek (2003). "Stimulation of the subthalamic nucleus changes the firing pattern of pallidal neurons." Journal of Neuroscience **23**(5): 1916-23.

Henderson, J. M., L. E. Annett, L. J. Ryan, W. Chiang, S. Hidaka, E. M. Torres et S. B. Dunnett (1999). "Subthalamic nucleus lesions induce deficits as well as benefits in the hemiparkinsonian rat." European Journal of Neuroscience **11**: 2749-57.

Horelou, P., A. Bilang-Bleuel et J. Mallet (1997). "In vivo adenovirus-mediated gene transfer for Parkinson's disease." Neurobiology of disease **4**: 280-7

Hughes, A. J., S. E. Daniel, L. Kilford et A. J. Lees (1992). "Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases." Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry **55**:181-4.

J

Jankovic, J., F. Cardoso, R. G. Grossman and W. J. Hamilton (1995). "Outcome after stereotactic thalamotomy for parkinsonian, essential, and other types of tremor." Neurosurgery **37**(4): 680-6; discussion 686-7.

K

Kaplitt, M. G., A. Feigin, C. Tang, H. L. Fitzsimons, P. Mattis, P. A. Lawlor, R. J. Bland, D. Young, K. Strybing, D. Heidelberg et M. J. Doring (2007). "Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial." The Lancet **369**(9579): 2097-105.

Kita, H. et S. T. Kitai (1987). "Efferent projections of the subthalamic nucleus in the rat: light and electron microscopic analysis with the PHA-L method." Journal of Comparative Neurology **260**(3): 435-52.

Kitada, T., S. Asakawa, N. Hattori, H. Matsumine, Y. Yamamura, S. Minoshima, M. Yokochi, Y. Mizuno et N. Shimizu (1998). "Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism." Nature **392**: 605-8.

Koller, W. C. et W. Tse (2004). "Unmet medical needs in Parkinson's disease." Neurology **62**(90011): 1S-8.

Kontakos, N. et J. Stokes (1999). "Série de monographies sur les maladies liées au vieillissement: XII. Maladie de Parkinson Percées récentes et nouvelles orientations." Maladies chroniques au Canada **20**(2): 65-85.

Kordower, H. J., T. B. Freeman, B. J. Snow, F. J. G. Vingerhoets, E. J. Mufson, P. R. Sanberg, R. A. Hauser, D. A. Smith, G. M. Nauert, D. P. Perl et C. W. Olanow (1995). "Neuropathological evidence of graft survival and striatum reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease." The New England Journal of Medicine **332**(17): 1118-24.

Krauss, G. L. et M. Z. Koubeissi (2007) " Cerebellar and thalamic stimulation treatment for epilepsy." Acta Neurochirurgica Supplement **97**(Pt 2): 347-56.

Krack, P., P. Pollak, P. Limousin, D. Hoffmann, J. Xie, A. Benazzouz et A. L. Benabid (1998). "Subthalamic nucleus or internal pallidal stimulation in young onset Parkinson's disease." Brain **121**: 451-7.

Krack, P., P. Pollak, P. Limousin, D. Hoffmann, A. Benazzouz, J. F. Le Bas, A. Koudsie et A. L. Benabid (1998). "Opposite motor effects of pallidal stimulation in Parkinson's disease." Annals of Neurology **43**(2): 180-92.

Krack, P., A. Batir, N. Van Blercom, S. Chabardes, V. Fraix, C. Ardouin, A. Koudsie, P. D. Limousin, A. Benazzouz, J. F. LeBas, A. L. Benabid and P. Pollak (2003). "Five-year follow-up of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease." New England Journal of Medicine **349**(20): 1925-34.

Kreiss, D. S., C. W. Mastropietro, S. S. Rawji et J. R. Walters (1997) "The response of subthalamic nucleus neurons to dopamine receptor stimulation in a rodent model of Parkinson's disease." Journal of Neuroscience **17**(17): 6807-19.

Krüger, R., W. Kuhn, T. Müller, D. Woitalla, M. Graeber, S. Kösel, H. Przuntek, J. T. Epplen, L. Schols et O. Riess (1998). "Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease." Nature Genetics **18**(2):106-8.

L

Le Cavorzin, P. (1999). "Pharmacologie de la maladie de Parkinson." **2004**.

Leroy, E., R. Boyer, G. Auburger, B. Leube, G. Ulm, E. Mezey, G. Harta, M. J. Brownstein, S. Jonnalagada, T. Chernova, A. Dehejia, C. Lavedan, T. Gasser, P. J. Steinbach, K. D. Wilkinson et M. H. Polymeropoulos (1998). "The ubiquitin pathway in Parkinson's disease." Nature **395**(6701):451-2.

Limousin, P., P. Pollak, A. Benazzouz, D. Hoffmann, J. F. Le Bas, E. Broussolle, J. E. Perret et A. L. Benabid (1995). "Effect on parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation." Lancet **345**(8942): 91-5.

Limousin, P., P. Krack, P. Pollak, A. Benazzouz, C. Ardouin, D. Hoffmann and A. L. Benabid (1998). "Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease." New England Journal of Medicine **339**(16): 1105-11.

Linazasoro, G. (2001). "Fisiopatología del parkinsonismo y las discinesias: enseñanzas de las observaciones quirúrgicas." Neurología **16**(1): 17-29

Lindvall, O. (2001). "Parkinson disease. Stem cell transplantation." Lancet **358** (Suppl): S48.

Lipsman, N., J. S. Neimat et A. M. Lozano (2007). " Deep brain stimulation for treatment-refractory obsessive-compulsive disorder: the search for a valid target." Neurosurgery **61**(1): 1-13

Lücking, C. B., A. Dürr, V. Bonifati, J. Vaughan, G. De Michele, T. Gasser, B. S. Harhangi, G. Meo, P. Denèfle, N. W. Wood, Y. Agid et A. Brice (2000). "Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene." New England Journal of Medicine **342**(21): 1560-7

Louis, E. D., K. Marder, L. Cote, M. Tang et R. Mayeux (1997). "Mortality from Parkinson disease." Archives of Neurology **54**(3): 260-4.

Luo, J., M. G. Kaplitt, H. L. Fitzsimons, D. S. Zuzga, Y. Liu, M. L. Oshinsky et M. J. Dearing (2002). "Subthalamic GAD gene therapy in a Parkinson's disease rat model." Science **298**(5592): 425-9.

M

Madrazo, I., Aguilera, M. et Franco-Bourland, R. (1990). "Cell implantation in Parkinson's disease." British Medical Journal **301**(6756): 874.

Magarinos-Ascone, C., J. H. Pazo, O. Macadar and W. Buno (2002). "High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus silences subthalamic neurons: a possible cellular mechanism in Parkinson's disease." Neuroscience **115**(4): 1109-17.

Mandel, S., E. Grunblatt, et al. (2003). "Neuroprotective strategies in Parkinson's disease : an update on progress." CNS Drugs **17**(10): 729-62.

Marder, K., M-X. Tang, H. Mejia, B. Alfaro, L. Cote, E. Louis, J. Groves et R. Mayeux (1996). "Risk of Parkinson's disease among first degree relatives: a community-based study." Neurology **47**(1): 155-60

Mayeux, R. (2003). "Epidemiology of neurodegeneration." Annual Review of Neuroscience **26**: 81-104.

Menegen, A., P. G. Board, A. C. Blackburn, G. D. Mellick et D. G. Le Couteur (1998). "Parkinson's disease, pesticides, and glutathione transferase polymorphisms." The Lancet **352**: 1344-6.

Mochizuki, H., H. Hayakawa, M. Migita, M. Shibata, R. Tanaka, A. Suzuki, Y. Shimo-Nakanishi, T. Urabe, M. Yamada, K. Tamayose, T. Shimada, M. Miura et Y. Mizuno (2001). "An AAV-derived Apaf-1 dominant negative inhibitor prevents MPTP toxicity as antiapoptotic gene therapy for Parkinson's disease." Proceedings of the National Academy of Sciences **98**(9): 10918-23

Morens, D. M., A. grandinetti, D. Reed, L. R. White et G. W. Ross (1995). "Cigarette smoking and protection from Parkinson's disease: False association or etiologic clue?" Neurology **45**(6): 1041-51.

Morens, D. M., J. W. Davis, A. Grandinetti, G. W. Ross, J. S. Popper et L. R. White (1996). "Epidemiologic observations on Parkinson's disease: incidence and mortality in a prospective study of middle-aged men." Neurology **46**(4): 1044-50.

Moro, E., R. J. Esselink, J. Xie, M. Hommel, A. L. Benabid et P. Pollak (2002). "The impact on Parkinson's disease of electrical parameter settings in STN stimulation." Neurology **59**(5): 706-13.

N

Nakao, N., E. Nakai, et al. (1999). "Ablation of the subthalamic nucleus supports the survival of nigral dopaminergic neurons after nigrostriatal lesions induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid." Ann.Neurol. **45**(5): 640-651.

Nicklas, W. J., I. Vyas, et al. (1985). "Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine." Life Science **36**(26): 2503-8.

O

Obeso, J. A., C. W. Olanow et J. G. Nutt (2000). "Levodopa motor complications in Parkinson's disease." Trends in Neurosciences **23**(10 Suppl): S2-7.

Olanow, C. W., J. H. Kordower et T. B. Freeman (1996). "Fetal nigral transplantation as a therapy for Parkinson's disease." Trends in Neurosciences **19**(3): 102-9

Olanow, W., A. H. Schapira et O. Rascol (2000). "Continuous dopamine-receptor stimulation in early Parkinson's disease." Trends in Neurosciences **23**(10 Suppl): S117-26.

Olanow, C. W., R. L. Watts et W. C. Koller (2001). "An algorithm (decision tree) for the management of Parkinson's disease (2001): treatment guidelines." Neurology **56**(11 Suppl 5): S1-S88.

Olanow, C. W. (2002). "Surgical therapy for Parkinson's disease." European Journal of Neurology **9**(Suppl 3): 31-9.

Orth, M. and A. H. Schapira (2001). "Mitochondria and degenerative disorders." American Journal of Medical Genetics **106**(1): 27-36.

P

Paschen, W., C. G. Proud et G. Mies (2007). "Shut-down of translation, a global neuronal stress response: mechanisms and pathological relevance." Current Pharmaceutical Design **13**(18): 1887-902.

Paul, G., W. Meissner, et al. (2004). "Ablation of the subthalamic nucleus protects dopaminergic phenotype but not cell survival in a rat model of Parkinson's disease." Experimental Neurology **185**(2): 272-80.

Piallat, B., Benazzouz A. et A. L. Benabid (1996). "Subthalamic nucleus lesion in rats prevents dopaminergic nigral neuron degeneration after striatal 6-OHDA injection: behavioural and immunohistochemical studies" European Journal of Neuroscience **8**: 1408-14

Poewe, W. H. (1991). Clinical differential diagnosis of Parkinson's disease. International workshop Berlin Parkinson's disease, Berlin, Medicom.

Polymeropoulos, M. H., C. Lavedan, E. Leroy, S. E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E. S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W. G. Johnson, A. M. Lazzarini, R. C. Duvoisin, G. Di Iorio, L. I. Golbe et R. L. Nussbaum (1997). "Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease." Science **276**: 2045-7

Q

Quinn, N. (1999). "Progress in functional neurosurgery for Parkinson's disease." Lancet **354**(9191): 1658-9.

R

Rajput, A. H., M. Fenton, S. Birdi et R. Macaulay (1997). "Is levodopa toxic to human substantia nigra?" Movement Disorders **12**(5): 634-8.

Rasche, D., P. C. Rinaldi, R. F. Young et V. M. Tronnier (2006) " Deep brain stimulation for the treatment of various chronic pain syndromes." Neurosurgical Focus **21**(6): E8

Rascol, O., D. J. Brooks, A. D. Korczyn, P. P. De Deyn, C. E. Clarke et A. E. Lang (2000). "A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. 056 Study Group." New England Journal of Medicine **342**(20): 1484-91.

Reiner, A. et K. D. Anderson (1990). "The patterns of neurotransmitter and neuropeptide co-occurrence among striatal projection neurons: conclusions based on recent findings." Brain Research Brain Research Review **15**(3): 251-65.

Ross, G. W., R. D. Abbott, H. Petrovitch, D. M. Morens, A. Grandinetti, K-H. Tung, C. M. Tanner, K. H. Masaki, P. L. Blanchette, J. D. Curb, J. S. Popper et L. R. White (2000). "Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease." Journal of American Medical Association **283**(20): 2674-9.

S

Saji, M., A. D. Blau, et al. (1996). "Prevention of transneuronal degeneration of neurons in the substantia nigra reticulata by ablation of the subthalamic nucleus" Experimental Neurology **141**(1): 120-129.

Salin, P., C. Manrique, C. Forni and L. Kerkerian-Le Goff (2002). "High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus selectively reverses dopamine denervation-induced cellular defects in the output structures of the basal ganglia in the rat." Journal of Neuroscience **22**(12): 5137-48.

Schapira, A. H., M. Gu, et al. (1998). "Mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease." Annals of Neurology **44**(3 Suppl 1): S89-98.

Schrag, A. et N. Quinn (2000). "Dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. A community-based study." Brain **123** (Pt 11): 2297-305.

Scott, W. K., M. A. Nance, R. L. Watts, J. P. Hubble, W. C. Koller, K. Lyons, R. Pahwa, M. B. Stern, A. Colcher, B. C. Hiner, J. Jankovic, W. G. Ondo, F. H. Allen Jr, C. G. Goetz, G. W. Small, D. Masterman, F. Mastaglia, N. G. Laing, J. M. Stajich, B. Slotterbeck, M. W. Booze, R. C. Ribble, E. Rampersaud, S. G. West, R. A. Gibson, L. T. Middleton, A. D. Roses, J. L. Haines, B. L. Scott, J. M. Vance et M. A. Pericak-Vance (2001). "Complete genomic screen in Parkinson disease. Evidence for multiple genes." Journal of the American Medical Association **286**(18): 2239-44.

Seidler, A., W. Hellenbrand, B.-P. Robra, P. Vieregge, P. Nischan, J. Joerg, W. H. Oertel, G. Ulm et E. Schneider (1996). "Possible environmental, occupational, and other etiologic factors for Parkinson's disease: a case-control study in Germany." Neurology **45**(5): 1275-84.

Sherer, T. B., R. Betarbet, et al. (2002). "An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage." Journal of Neurosciences **22**(16): 7006-15.

Siderowf, A. et M. Stern (2003). "Update on Parkinson disease." Annals of Internal Medicine **138**(8): 651-8.

Siegfried, J. et B. Lippitz (1994). "Bilateral chronic electrostimulation of ventroposterolateral pallidum: a new therapeutic approach for alleviating all parkinsonian symptoms." Neurosurgery **35**(6): 1126-9; discussion 1129-30.

Smith, Y. and A. Parent (1988). "Neurons of the subthalamic nucleus in primates display glutamate but not GABA immunoreactivity." Brain Research **453**(1-2): 353-6.

Steece-Collier K., E. Maries et J. H. Kordower (2002). "Etiology of Parkinson's disease: genetics and environment revisited." Proceeding of the National Academy of Sciences **99**(22): 13972-4.

Sun, B., S. Chen, S. Zhan, W. Le et S. E. Kahl (2007). " Subthalamic nucleus stimulation for primary dystonia and tardive dystonia." Acta Neurochirurgica Supplement **97**(Pt 2): 207-14

T

Tanaka, M., A. Sotomatsu, H. Kanai et S. Hirai (1991). "Dopa and dopamine cause cultured neuronal death in the presence of iron." Journal of Neurol. Sci. **101**: 198-203.

Tanner, C. M., R. Ottman, S. M. Goldman, J. Ellenberg, P. Chan, R. Mayeux et J. W. Langston (1999). "Parkinson disease in twins: an etiologic study." Journal of the American Medical Association **281**(4): 341-6.

Tanner, C. M. et D. A. Aston (2000). "Epidemiology of Parkinson's disease and akinetic syndromes." Current Opinion in Neurology **13**(4): 427-30.

Tashjian, A. H., Jr., Y. Yasumura, L. Levine, G. H. Sato et M. L. Parker (1968). "Establishment of clonal strains of rat pituitary tumor cells that secrete growth hormone." Endocrinology **82**(2): 342-52.

Troster, A. I., L. D. Stalp, A. M. Paolo, J. A. Fields et W. C. Koller (1995). "Neuropsychological impairment in Parkinson's disease with and without depression." Archives of Neurology **52**(12): 1164-9.

Tsokas, P, T. Ma, R. Iyengar, E. M. Landau et R. D. Blitzer (2007). "Mitogen-activated protein kinase upregulates the dendritic translation machinery in long-term potentiation by controlling the mammalian target of rapamycin pathway." Journal of Neurosciences **27**(22): 5885-94.

V

van der Walt, J. M., E. R. Martin, et al. (2003). "Genetic polymorphisms of the N-acetyltransferase genes and risk of Parkinson's disease." Neurology **60**(7): 1189-91.

Vila, M. and S. Przedborski (2003). "Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases." Nature Reviews Neuroscience **4**(5): 365-75.

W

Walkinshaw, G. et C. M. Waters (1995). "Induction of apoptosis in catecholergic PC12 cells by L-DOPA. Implications for the treatment of Parkinson's disease." J. Clin. Invest. **95**: 2458-64.

Wallace B. A. "The neuroprotective effects of subthalamic nucleus (STN) suppression." Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier Grenoble 1, juin 2004.

Wichmann, T. et M. R. DeLong (2003). "Functional neuroanatomy of the basal ganglia in Parkinson's disease." Advances in Neurology **91**: 9-18.

X

Xia, R. Etude des effets de la stimulation électrique à haute fréquence dans un modèle cellulaire in vitro. Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier Grenoble 1, juin 2005.

Xia, R., F. Berger, B. Piallat et A. L. Benabid (2007). "Alteration of hormone and neurotransmitter production in cultured cells by high and low frequency electrical stimulation." Acta Neurochirurgica 149: 67-73

Z

Zigmond, M. J., E. D. Abercrombie, T. W. Berger, A. A. Grace et E. M. Stricker (1990). "Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications." Trends in Neurosciences 13(7): 290-6

Que ceci soit la fin du livre, mais non la fin de la recherche.
Bernard de Clairvaux