ETUDE DES EFFETS DE LA STIMULATION ELECTRIQUE A HAUTE FREQUENCE DANS UN MODELE CELLULAIRE IN VITRO

Rong Xia

▶ **To cite this version:**

Rong Xia. ETUDE DES EFFETS DE LA STIMULATION ELECTRIQUE A HAUTE FREQUENCE DANS UN MODELE CELLULAIRE IN VITRO. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT : . tel-00009865

HAL Id: tel-00009865

https://theses.hal.science/tel-00009865

Submitted on 1 Aug 2005

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.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE 1
SCIENCES TECHNOLOGIE MEDECINE

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement
par

夏 蓉
Rong XIA

Le 30 Juin 2005

ETUDE DES EFFETS DE

LA STIMULATION ELECTRIQUE A HAUTE FREQUENCE

DANS UN MODELE CELLULAIRE *IN VITRO*

COMPOSITION DU JURY:

Président :	**Pr AL BENABID**
Rapporteurs :	**Dr C NGUYEN** **Dr L KERKERIAN – LE GOFF**
Examinateur :	**Pr F BERGER**

Thèse préparée à l'INSERM U318, Laboratoire de Neurosciences précliniques,
CHU de Grenoble, Université Joseph Fourier, Grenoble

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE 1
SCIENCES TECHNOLOGIE MEDECINE

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement
par

夏 蓉
Rong XIA

Le 30 Juin 2005

ETUDE DES EFFETS DE

LA STIMULATION ELECTRIQUE A HAUTE FREQUENCE

DANS UN MODELE CELLULAIRE *IN VITRO*

COMPOSITION DU JURY:

Président :	**Pr AL BENABID**
Rapporteurs :	**Dr C NGUYEN** **Dr L KERKERIAN – LE GOFF**
Examinateur :	**Pr F BERGER**

Thèse préparée à l'INSERM U318, Laboratoire de Neurosciences précliniques,
CHU de Grenoble, Université Joseph Fourier, Grenoble

A mes parents

A mon mari Bin

A ma fille ZhiXing

A la mémoire de ma grand-mère

Au temps à Grenoble en France

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été effectuée à l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité 318 de Grenoble et je remercie tout d'abord sincèrement Monsieur le Pr. BENABID pour m'y avoir accueillie. Je remercie le Pr. François BERGER pour son accueil au sein de l'équipe de neurobiologie moléculaire. Je remercie ces deux professeurs pour les précieux conseils qu'ils m'ont prodigués tout au long de ma thèse.

Je remercie les Drs C NGUYEN et L KERKERIAN – LE GOFF pour avoir manifesté leur intérêt pour mes travaux et pour avoir accepté de juger cette thèse.

Mes remerciements vont ensuite à Nadine et Philippe qui m'ont aidée patiemment dans le domaine scientifique et par leur amitié tout au long de ces trois années.

Je remercie Annick, Chantal, Blandine, Frank, Rolande et Luis pour leur aide dans les problèmes quotidiens et pratiques.

Mes remerciements vont aussi à Danielle, Marie-Pierre, Didier, Laurent et à tous les membres de l'équipe de neurobiologie moléculaire pour leur gentillesse et leurs aides. Les trois années de cette thèse n'auraient pas été aussi agréables sans tous mes camarades enthousiastes et disponibles. J'adresse de sincères remerciements à tous les membres de l'INSERM unité 318, à ceux qui m'ont aidées par leurs conseils, leurs réflexions.

Je tiens à remercier le Dr Evelyne BEURRIAND du service de neurophysiologie du CHU de Grenoble, pour son aide dans la technique d'EnzymoImmunoAssay, le Dr M BAYLE du service Gammatographie du CHU de Grenoble pour son aide dans la technique de RadioImmunoAssay, ainsi que Ludovic Alazay avec qui j'ai travaillé en collaboration pour l'étude du transcriptome ; Ali Bouamrami en collaboration de SELDI-TOF-MS.

Je remercie Brigitte qui m'a accompagnée dans mes études pendant la première année de ma thèse. J'adresse un grand merci à Michèle pour la technique d'incorporation, pour le transcriptome et pour la correction de ma thèse en version française, ainsi que Nadine et Béatrice également pour la correction de la version française.

J'ai pu réaliser ce travail grâce au financement de l'INSERM et de MEDTRONIC, je les remercie de m'avoir soutenue pendant les 3 ans de thèse.

Je souhaite également adresser à mes amis qui m'ont accompagnée durant cette période ma reconnaissance pour leur soutien et leur amitié sans faille. Donc, un grand merci aux Soutif (Roths et M), Bouchet (Y et C), et Massenet (Jacqueline et Olivier) ; de même à mes amis d'ici et de Chine : Valérie, Jacqueline, Marie-thérèse, Nicole, Catherine, Nadine et QunQun, YongZhong, YiJun, AiDong, ShaoShuai, ZhaoJie, WangHong, WangHua, PeiHua, PeiZhu, LiuLei, Francois-Tcheou, HuYi, ChenYao, PanQiong, YuZheng, BeiYuan etc… et etc…, avec qui j'ai partagé de bons moments au cours de ces 44 mois où j'ai vécu à Grenoble en France.

En fin, je remercie du fond du cœur toute ma grande famille XIA, mes parents, mon mari Bin, ma fille ZhiXing, et tous mes parents proches à Shanghai, à l'île ChongMing, à WuHan, à Nanjing dans le province ShanDong et JiangSu en CHINE, pour leurs encouragements et soutiens constants tout au long de ce parcours. Mille excuses pour toutes mes indisponibilités durant ces 44 mois.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

I : INTRODUCTION **1**

I – 1 MALADIE de PARKINSON 2

I – 1 – 1 Historique 2

I – 1 – 2 Symptomatologie 3

I – 1 – 3 Les causes 3

I – 2 LES TRAITEMENTS 4

I – 2 – 1 Traitement pharmacologique 4

I – 2 – 2 Traitement neurochirurgical 4

I – 2 – 2 – 1 La chirurgie 4

I – 2 – 2 – 2 Les essais thérapeutiques en cours : Greffes et thérapie génique 5

I – 3 STIMULATION ELECTRIQUE A HAUTE FREQUENCE 6

I – 3 – 1 Histoire de la SHF 6

I – 3 – 2 Les Paramètres de SHF 9

I – 3 – 3 L'efficacité pour de la SHF dépend de la fréquence 11

I – 4 EXPERIMENTATIONS DE STIMULATION ELECTRIQUE A HAUTE FREQUENCE 13

I – 4 – 1 Les données électrophysiologique 13

I – 4 – 2 Les données neurochimiques et les données fonctionnelles 15

I – 4 – 3 Les données « moléculaires » 16

I – 5 OBJECTIFS DU TRAVAIL 18

II : MATERIELS ET METHODES **19**

II – 1 LIGNEES CELLULAIRES ET CONDITIONS DE CULTURE 20

II – 2 PROTOCOLE D'ACTIVATION DES CELLULES PAR STIMULATION ELECTRIQUE 21

II – 2 – 1 Montage expérimental d'une plaque de 24 puits en série, ou d'une boite de Pétri avec 2 fils de titane 21

II – 2 – 2 Les paramètres de la stimulation électrique 24

II – 3 PROTOCOLE D'ACTIVATION PHARMACOLOGIQUE DES CELLULES 25

II – 4 TESTS DE VIABILITE CELLULAIRE 26

II – 4 – 1 Comptage cellulaire avec un hématimètre 26

II – 4 – 2 Test colorimétrique au bleu de thiazolyl (essai MTT) pour le dosage des cellules PC12 adhérentes 26
II – 4 – 3 Test colorimétrique au sel de tétrazolium WST-1 pour le dosage des cellules GH3 flottantes 27
II – 5 PREPARATION DES ECHANTILLONS PROTEIQUES 29
II – 5 – 1 Préparation des extraits cellulaires par lyse des cellules 29
II – 5 – 2 Dosage des protéines des extraits 30
II – 6 IMMUNODOSAGES 31
II – 6 – 1 Dosage radioimmunologique de la prolactine 31
II – 6 – 2 Dosage radioenzymatique des catécholamines 31
II – 7 ANALYSE DES PROFILS PROTEIQUES PAR LA TECHNOLOGIE SELDI-TOF-MS 33
II – 7 – 1 Principe 33
II – 7 – 2 Etablissement des profils protéiques des cellules GH3 et PC12 activées par stimulation électrique et traitement à la Dopamine 36
II – 7 – 2 – 1 Prétraitement des barrettes 36
II – 7 – 2 – 2 Dépôt des échantillons protéiques sur spot 37
II – 7 – 2 – 3 Lavage des barrettes 38
II – 7 – 2 – 4 Dépôt de la matrice 38
II – 7 – 2 – 5 Lecture 38
II – 8 MARQUAGE METABOLIQUE DES CELLULES PAR INCORPORATION DE METHIONINE ^{35}S 40
II – 8 – 1 Principe 40
II – 8 – 2 Incorporation de méthionine ^{35}S 40
II – 8 – 3 Traitement de l'extrait protéique 40
II – 8 – 4 Analyse par autoradiographie 40
II – 9 ANALYSE GLOBALE DE L'EXPRESSION GENIQUE PAR MICROARRAY 42
II – 10 ANALYSE STATISTIQUE 44

III : PRESENTATION DES RESULTATS **45**
III – 1 PRESENTATION DES MODELES CELLULAIRES 46
III – 1 – 1 Cellules GH3 46
III – 1 – 2 Cellules PC12 47

III – 2 INVESTIGATION DES EFFETS DE LA STIMULATION ELECTRIQUE SUR LA SECRETION CELLULAIRE 48

III – 2 – 1 Premiers essais de stimulation électrique *in vitro* sur les cellules endocrines GH3 et INS-1 48

III – 2 – 2 Mise en place d'un procédé expérimental de stimulation électrique *in vitro* dédié à la neurostimulation à l'échelle cellulaire 49

III – 2 – 3 Les effets de la stimulation électrique sur les cellules endocrines GH3 et comparaison de cet effet avec un traitement par la Dopamine 51

III – 2 – 3 –1 Quantification et viabilité des cellules 51

III – 2 – 3 –2 Effets de la stimulation électrique et de la Dopamine sur la sécrétion de Prolactine 55

III – 2 – 4 Les effets de la stimulation électrique sur les cellules neuronales PC12 58

III – 3 ANALYSE DU TRANSCRIPTOME DES CELLULES SHF PAR DNA MICROARRAY 64

III – 4 EFFETS INHIBITEURS DE SHF SUR LA SYNTHESE PROTEIQUE DES CELLULES 71

III – 4 – 1 Mise en évidence par la technique d'incorporation de méthionine 71

III – 4 – 2 Analyse protéomique par la technique SELDI-TOF-MS 76

III – 4 – 2 – 1 Expression protéique des cellules GH3 et des cellules PC12 77

III – 4 – 2 – 2 Effets d'un facteur bloquant des canaux ioniques et effets d'un inhibiteur de la PKC 82

III – 4 – 2 – 3 Confirmation des effets inhibiteurs de la synthèse protéique in vivo dans le cerveau de souris 86

IV : DISCUSSION ET PERSPECTIVES **88**

IV – 1 VALIDATION DE LA TECHOLOGIE UTILISEE ET CHOIX DES SYSTEMES CELLULAIRE 89

IV –2 LES EFFETS DE LA STIMULATION ELECTRIQUE IN VITRO SUR LA SECRETION DE PROLACTINE DES GH3 ET DES CATECHOLAMINES DE PC12 91

IV – 3 LES MECANISMES POSSIBLES DE LA STIMULATION ELECTRIQUE DES CELLULES 94

IV – 3 – 1 Effets de la stimulation électrique sur la transcription 96

IV – 3 – 2 Inhibition globale de la synthèse protéique des cellules stimulées 100

IV – 4 LES MECANISMES POSSIBLES EN SYNTHESE **103**

V : BIBLIOGRAPHIE **110**

VI : PUBLICATION **122**

ABREVIATION

AD	adrénaline
ATCC	American Type Culture Collection
DA	dopamine
DBS	deep brain stimulation
EIA	enzymo-immuno-assay
Hz	hertz
LaCl3	Lanthanum chloride heptahydrate
MEM	modified Eagle's medium
MP	Maladie Parkinsonienne
MTT	Méthylthiazolyldiphényl-tétrazolium bromide, Thiazolyl blue
NA	noradrénaline
NGF	Nerve Growth Factor ou facteur de croissance nerveux
NS	non significatif
NST	noyau sub-thalamique
PBS	phosphate buffered saline
PRL	prolactine
PKC	Protéine Kinase C
PS	Penicilline-Streptomycin
RIA	radio-immuno-assay
SAX2	Strong anionic exchange surface
SBF	stimulation électrique à basse fréquence
SCP	stimulation cérébrale profonde
SELDI	surface enhanced laser desorption/ionization
SEIDI-TOF-MS	Surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
SHF	stimulation électrique à haute fréquence
SPA	sinapinic acid
STN	subthalamic nucleus
TMA	Tetraméthylammonium
WCX2	weak cationic exchange surface
WST-1	2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl) -5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt

INTRODUCTION

Le but de notre travail est d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires affectés par la stimulation électrique à haute fréquence (SHF). Afin de mieux situer ce travail et ses motivations, il est important de revenir sur les bases de la maladie de Parkinson qui est le point de départ de l'introduction de la neurostimulation cérébrale à haute fréquence, puis de discuter les travaux déjà publiés dans le domaine de l'étude des mécanismes de la SHF.

I – 1 MALADIE DE PARKINSON

I – 1 –1 Historique

En 1817, James Parkinson (1755-1827), décrivit pour la première fois un trouble moteur particulier. Les principaux symptômes consistaient en un ensemble de troubles posturaux accompagnés d'un tremblement. Charcot (1880) désigna cette atteinte fonctionnelle sous le nom général de maladie de Parkinson (MP).

La MP atteint environ 1,5 % - 2,0 % de la population âgée de plus de 65 ans en Europe et aux Etats-Unis.

Au cours d'études anatomopathologiques, Lewy (1913) constata la présence d'inclusions cytoplasmiques, les corps de Lewy dans la substance noire de malades parkinsoniens. La dégénérescence observée au cours de la maladie de Parkinson affecte en effet préférentiellement les neurones dopaminergiques formant la voie nigrostriatale de la substantia nigra pars compacta (SNc). Cette dénervation dopaminergique est à l'origine du syndrome moteur de la MP. La neurodégénérescence concerne aussi différents noyaux catécholaminergiques et sérotoninergiques du cerveau et du tronc cérébral.

La vitesse de dégénérescence des neurones de la voie nigro-striée dopaminergique est deux fois plus rapide chez le sujet parkinsonien que lors du vieillissement normal (Agid et al

1991). Ce processus se répercute au niveau du striatum qui est alors moins alimenté en dopamine. Ehringer et Hornykiewicz (1960) sont les premiers à rapporter une diminution importante du taux de dopamine au niveau de la SNc et du striatum. Les symptômes de la maladie apparaissent alors que le processus dégénératif a déjà atteint 50 % à 60 % de la population neuronale dopaminergique au sein de la SNc et que la concentration en dopamine striatale est abaissée d'environ 70 % (Agid et al, 1987).

I – 1 –2 Symptomatologie

Un syndrome Parkinsonien se caractérise cliniquement par l'association plus ou moins complète d'une akinésie (bradykinésie), d'une rigidité (hypertonie musculaire) et d'un tremblement de repos.

I – 1 –3 Les causes

La maladie de Parkinson idiopathique est caractérisée par une dégénérescence des noyaux du cerveau et des voies extrapyramidales qui contrôlent la motricité volontaire. L'étiologie reste inconnue. Différentes causes sont évoquées, dont les facteurs environnementaux (des pesticides, des herbicides), les facteurs génétiques (formes familiales parkin et l'α-synucléine) et les toxines.

I – 2 LES TRAITEMENTS

Le traitement de première intention est médicamenteux (la levodopa, les inhibiteurs de la dégradation de la dopamine, les agonistes dopaminergiques, les libérateurs de dopamine…), puis dans les formes plus évoluées, neurochirurgical.

I – 2 – 1 Le traitement pharmacologique

Le traitement pharmacologique vient en premier lieu. La tyrosine est le point de départ de la voie de synthèse de dopamine. Elle est hydrolysée en dihydroxyphénylalanine (dopa) grâce à la tyrosine hydroxylase (TH), enzyme limitant de ce métabolisme. La dopa est alors décarboxylée par la dopa-décarboxylase pour synthétiser la dopamine. six classes de médicaments sont principalement disponibles : la levodopa, les agonistes dopaminergiques, les anticholinergiques, l'amantadine, les inhibiteurs de la monoamine-oxydase B (MAO-B) et les inhibiteurs de la catechol-O-methyltransferase (COMT) (Pollak 1997).

I – 2 – 2 Le traitement neurochirurgical

I – 2 – 2 – 1 La chirurgie

Les premières interventions étaient particulièrement invasives avec des résections de parties du cortex responsable du mouvement. Par la suite, la source des manifestations de la maladie a été mieux localisée au niveau des noyaux gris centraux ou ganglions de la base. Des thalamotomies et pallidotomies ont été pratiquées pendant les années 1950 à 1960 (Cooper and Bravo, 1958). Vers 1970, la levodopa a fait son apparition et s'est avérée si efficace que les recours à la chirurgie ont diminué. Depuis les années 1990, la pallidotomie a recommencé à être pratiquée, non plus pour les problèmes de rigidité, mais pour tenter de contrecarrer les dyskinésies qui surviennent après une exposition prolongée à la levodopa et aux autres agents

parkinsoniens (Jankovic et al, 1995). Quant à la thalamotomie, elle continue à être recommandée pour les tremblements sévères (Gray et al, 2002), excepté dans le cas des ablations bilatérales induisant des complications irréversibles d'ordre cognitif et neuropsychologique.

La neurochirurgie fonctionnelle a permis une approche thérapeutique non lésionnelle à travers la stimulation cérébrale profonde (SCP) à haute fréquence (HF) qui a été effectuée tout d'abord dans le thalamus (VIM : noyau intermédiaire ventral du thalamus) (Benabid et al, 1987 ; 1989) puis par la suite dans le noyau subthalamique (NST) (Benabid et al, 1998 ; Krack et al, 1998) et le pallidum (Gpi : Globus pallidus interne) (Siegfried and Lippitz, 1994 ; Krack et al, 1998). L'efficacité de la neurostimulation en fait le traitement de référence dans les formes sévère de MP ; avec un recul maintenant important.

I – 2 –2 – 2 Les essais thérapeutiques en cours : Greffes et thérapie génique

Les greffes restent une thérapeutique expérimentale chez l'homme, l'efficacité observée dans les modèles animaux n'ayant pas encore été confirmée (Brundin et al 2001 ; Hagell et al 2001).

Très récemment, la thérapie génique a été utilisée chez le rat, puis appliquée à l'homme, pour transformer le noyau subthalamique, qui est glutamatergique, en noyau GABAergique par transfection in situ du gène de la GAD (glutamate décarboxylase) à l'aide d'un vecteur viral (AAV, adénovirus associatif virus) (Bowers et al, 1997 ; Luo et al, 2002).

Des essais d'infusion locale de GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor) ont aussi été réalisés avec succès chez l'animal puis chez l'homme. Les premiers résultats étaient proches de l'efficacité de la neurostimulation, mais l'essai thérapeutique vient d'être arrêté en raison d'une toxicité immunoallergique (Gill and Svendsen et al 2003).

I –3 LA STIMULATION ELECTRIQUE A HAUTE FREQUENCE

I – 3 – 1 Historique de la SHF

Les études électrophysiologiques ont permis de mettre en relation le tremblement parkinsonien avec un « pattern » spécifique de décharge des neurones du VIM. Le tremblement est complètement supprimé par destruction de cette structure cérébrale (Riechert et al, 1973 ; Cooper et al, 1977). Malheureusement, l'imprécision de cet acte chirurgical est son caractère lésionnel est à l'origine de complications, telles que des déficits moteurs aggravés par le caractère irréversible des lésions ou des récidives quand la taille de la lésion était insuffisante (Cooper et al, 1965) et parfois même, de troubles neuropsychologiques lors d'interventions bilatérales (Bravo et al, 1967), pourtant souvent nécessaires quand les malades ont des symptômes bilatéraux.

L'investigation des structures cibles par l'électrophysiologie a mis en évidence la disparition du tremblement lors de la stimulation à haute fréquence du VIM. (Benabid et al, 1987 ; 1989 ; 1996 ; 2002) ont été les premiers à démontrer l'effet bénéfique de la stimulation à haute fréquence chronique de ce noyau sur le tremblement parkinsonien permettant ainsi de remplacer la thalamotomie. Cette neurochirurgie thérapeutique non destructrice « fonctionnelle » a été introduite pour la première fois à Grenoble (Benabid et al, 1987). Contrairement aux techniques ablatives qui présentent des risques d'effets secondaires irréversibles, la SHF est réversible et modulable.

Devant les résultats spectaculaires de la SHF dans le traitement du tremblement parkinsonien et du tremblement essentiel, et après la mise en évidence chez le singe du rôle crucial du noyau subthalamique (NST) dans la MP, la SHF a été appliquée au NST chez l'homme (Limousin et al 1995 ; Benabid et al 2000 ; Krack and Pollak 2003).

Les résultats ont été remarquables et en ont fait à ce jour le traitement chirurgical de référence des formes avancées de la MP. Pour mieux comprendre sa responsabilité dans les manifestations motrices et envisager son implication dans la MP, nous devons rappeler certains aspects anatomo-fonctionnels du NST.

Au sein du cerveau, le cortex, le diencéphale et le mésencéphale se trouvent reliés par un ensemble de structures sous-corticales, qui, connectées les unes aux autres, constituent le circuit des noyaux gris centraux ou ganglions de la base. Le NST est un de ces noyaux gris centraux. C'est une petite structure cérébrale, présentant une forte densité cellulaire et située entre le zona incerta et le pédoncule cérébral. De chaque côté du noyau, il y a 25.000 neurones chez le rat et 560.000 neurones chez l'homme. Leurs volumes sont respectivement de 0,8 mm^3 et de 240 mm^3 (Hamani and Lozano et al 2004).

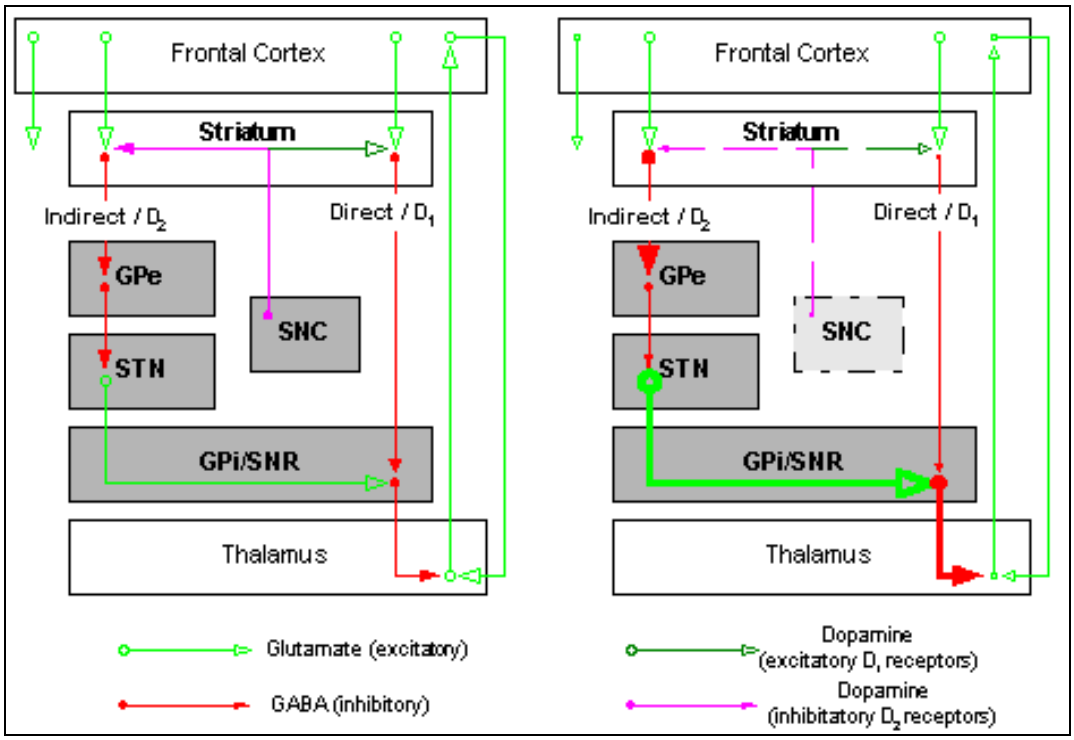


Figure I-1 *Schéma modifié de l'organisation fonctionnelle des ganglions de la base d'après Alexander et Crutcher (1990).*

Schéma : Modèle fonctionnel des ganglions de la base chez des sujets sains (gauche) et chez des patients parkinsoniens (droite). D1 et D2 : récepteurs dopaminergiques. GPe : Globus pallicus externe. GPi : Globus pallidus interne. STN : noyau sub-thalamique. SNC et

SNR : substance noire pars compacta et pars reticulata. Thalamus : comprend la région ventro-latérale et antérieure ventrale. Cortex : inclut les aires motrices et le cortex prémoteur. GABA: acide γ-aminobutyrique.

Plusieurs études (Mitchell and Crossman et al; 1986) suggèrent que la diminution de dopamine dans la MP a pour conséquence finale une augmentation de l'activité inhibitrice de l'efférence des ganglions de la base vers le thalamus. L'activité du pallidum interne et celle de la substance noire pars reticulata, qui sont GABAergiques, seraient ainsi augmentées. Comme nous l'avons vu précédemment, d'après le schéma ci-dessus (Figure I-1), au niveau du striatum, la dopamine a un double effet, grâce à la présence sur les neurones striataux de deux types de récepteurs, D1 et D2. D'une part, la dopamine active les neurones striataux exprimant des récepteurs D1 de la voie directe, qui inhibent les structures de sortie. La déplétion en dopamine induira donc une désinhibition des structures de sortie en réduisant l'influence inhibitrice de la voie directe qui coexprime le GABA et la enképhaline. D'autre part, au travers de l'activation des récepteurs D2, la dopamine inhibe les neurones striataux, projetant sur le Gpe, qui coexpriment GABA et enképhalines. Ceci aboutit à une levée de l'inhibition exercée par ce dernier sur le NST qui devient alors hyperactif. L'augmentation de l'activité des neurones du NST exerce, par le biais de leur neurotransmetteur endogène, le glutamate, un effet activateur pathologique sur les neurones de la substance noire pars reticulata et du globus pallidus interne. L'activité finale de ces neurones est accrue du fait de l'hyperactivation venant de la voie indirecte par le biais du NST glutamatergique et de la perte d'inhibition Gabaergique qui venait du striatum par la voie directe.

Les structures afférentes et efférentes sont directement connectées par la « voie directe » monosynaptique et indirectement par la « voie indirecte », passant par le Globus pallidum externe. La principale structure d'entrée du réseau des GB est le striatum qui est la cible majeure des projections, celles d'origine corticale, d'origine thalamique et les projections DA

de la SNc. Le NST reçoit également les afférences glutamatergiques issues du cortex et du noyau centre médian-parafascicularis (CM-Pf). Les principaux noyaux de sortie des GB, SNr/GPi, envoient leurs projections GABAergiques vers le thalamus qui a des connections glutamatergiques réciproques avec le cortex. La dopamine nigrostriatale a un effet double, puisqu'elle active, au travers des récepteurs de type D1, les neurones de la voie directe et augmente ainsi la sortie inhibitrice striatale vers le SNr/GPi, et qu'elle inhibe au travers des récepteurs D2, les neurones de la voie indirecte réduisant ainsi l'inhibition striatale du GPe. Ainsi, les effets opposés de la dopamine sur ces deux voies tendent en fait vers le même effet: la réduction de l'inhibition des neurones thalamocorticaux qui aboutit à la facilitation des mouvements initiés au niveau du cortex.

C'est par une altération de ce mécanisme que la déplétion en dopamine est vraisemblablement responsable des troubles moteurs observés dans la MP. La dénervation dopaminergique aboutit à un accroissement de l'activité de la voie indirecte qui induit une inhibition du GPe, la subséquente désinhibition des NST et GPi/SNr aboutissant à une réduction de l'activité via la voie inhibitrice directe. Le résultat final est un accroissement de l'output GABAergique de GP vers le thalamus qui aboutit à un accroissement de l'inhibition des neurones thalamocorticaux.

I – 3 – 2 Les paramètres de la SHF

Après l'implantation d'électrodes, la stimulation est appliquée à l'aide d'un générateur de courant (pacemaker placé sous la clavicule) relié aux électrodes implantées intra cérébralement (Figure I-2). Cette opération est pratiquée à l'aide de l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), de la ventriculographie et des techniques électrophysiologiques d'enregistrement et de stimulation par microélectrodes.

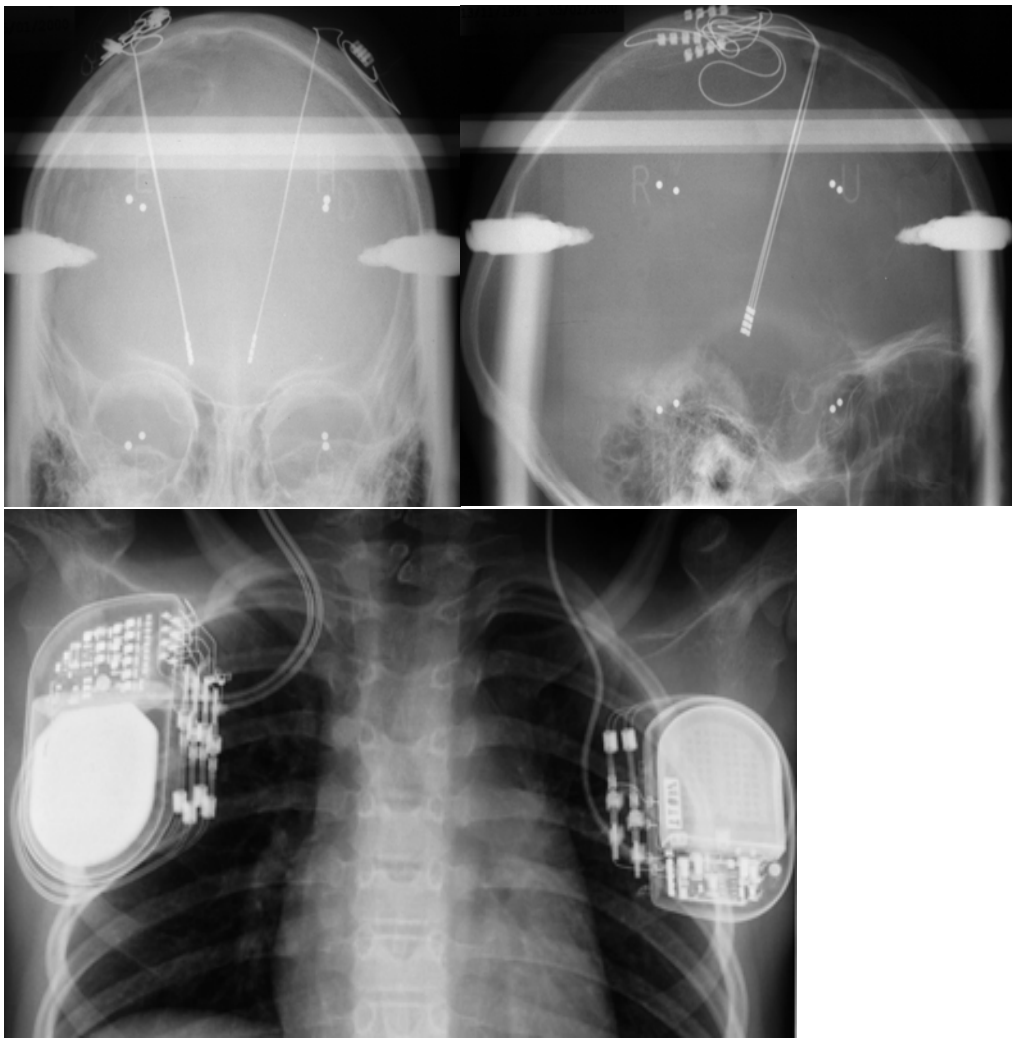


Figure I-2 *Dispositif de stimulation cérébrale profonde. Document issu du CHU de Grenoble.*

Le système se compose d'un générateur de courant (pacemaker) relié à une (ou plusieurs) électrodes implantées dans le NST. Les photos en haut représentent la mise en place d'un système bilatéral avec des électrodes de chaque côté. A gauche en haut : vue antéro-postérieure. A droite en haut : vue latérale. En bas : deux générateurs sont placés dans les régions sous-claviculaires.

La stimulation a réellement amélioré la qualité de vie des patients en agissant sur la triade des symptômes de la maladie de Parkinson : le tremblement, la raideur et l'akinésie. Elle peut être unilatérale dans le cas de tremblements unilatéraux chez des patients parkinsoniens, mais la chirurgie est plus généralement bilatérale en ce qui concerne la cible

sub-thalamique. Les plots de contacts sont choisis en fonction des résultats obtenus lors de l'optimisation des paramètres électriques. En moyenne, les paramètres appliqués sont les suivants :

- Stimulation cathodique intracérébrale
- Monopolaire
- La fréquence des impulsions électriques est, en pratique, de 130 Hz (la durée entre deux impulsions est 7,7 ms) à 185 Hz
- La largeur des impulsions est de 60 à 120 µs
- La tension électrique est de 1 à 3 volts.

(Benabid and Pollak et al. 1991; Limousin et al. 1995; Limousin et al. 1998)

La stimulation haute fréquence mime les effets d'une lésion dans le noyau Vim du thalamus. L'effet est « fréquence dépendant », et ne devient significatif qu'au-delà de 100Hz. La constatation est la même concernant les GP et les NST. La tendance est à la stimulation de NST, considérée comme plus efficace que celle de GPi, même si aucune étude ne l'a prouvé.

L'utilisation de la SHF s'est ensuite étendue à d'autres pathologies comme les dystonies, l'épilepsie (Benabid et al 2001, Lozano et al 2004), les troubles obsessionnels compulsifs (TOC) (Nuttin et al 1999, Mallet et al 2002), les «cluster headache» (Leone and Franzini et al 2004) et la dépression (Lozano, Neuron, sous presse, communication personnelle).

I – 3 – 3 L'efficacité de la SHF dépend de la fréquence

L'efficacité de la DBS (deep brain stimulation) sur les symptômes de la MP dépend de la fréquence (Benabid et al 1991, 1994, Moro et al 2002). L'effet bénéfique sur le tremblement commence à des fréquences supérieures à 60 Hz ; 130 à 185 Hz est une gamme de fréquence couramment appliquée pour la MP, et disponible sur les stimulateurs

commerciaux. La stimulation électrique est efficace dans la région de NST, pour une fréquence au moins égale à 100 Hz, et dans le Pallidum au-dessus de 80 Hz (Wu et al, 2001).

Il y a une relation linéaire avec l'intensité jusqu'à apparition de mouvements anormaux. Il n'y a pas d'effet majeur sur la largeur d'impulsion.

I – 4 ETUDE DES MECANISMES DE LA STIMULATION ELECTRIQUE A HAUTE FREQUENCE

Les mécanismes de la stimulation restent peu étudiés et restent très discutés contrastant avec sa remarquable efficacité thérapeutique. Le fait qu'une stimulation électrique d'une structure neuronale entraîne des effets de type inhibiteur n'est pas aisément conciliable avec le fait que la stimulation électrique est en général considérée comme excitatrice. L'apparente identité entre les effets de la lésion du NST et de la SHF du même noyau a fait évoquer une hypothèse inhibitrice, vite génératrice d'une polémique entre les partisans de l'inhibition ou au contraire de l'activation. Il est important de reprendre en détail, les résultats, souvent discordants, des différentes études publiées, pour mieux appréhender les problèmes méthodologiques et mettre en évidence la nécessité d'approches physiopathologiques nouvelles visant à progresser, au-delà de la polémique, dans la compréhension physiopathologique de la SHF.

Trois approches différentes et complémentaires ont été menées : des études électrophysiologiques, des études neurochimiques et plus nouvelles des études moléculaires.

1 – 4 – 1 Les données électrophysiologiques

Une hyperactivité électrophysiologique des neurones glutamatergiques de NST a été décrite dans les modèles lésionnels de maladie de Parkinson, accompagnée d'une hyperactivité des structures de sortie, SNr et GPi (EP chez le rat). Chez le rat 6-OHDA, la destruction du NST ou la SHF du NST entraîne une diminution de l'activité spontanée de la SNr, une suppression de l'activité spontanée du EP et une augmentation de l'activité GP (Burbaud 1995, Benazzouz, 1995). Ces résultats sont obtenus pour des intensités supérieures à 300µA. Chez les singes MPTP, la lésion du NST induit aussi une diminution de l'activité pallidale (Hamada 1992, Guridi 1994). Ces études électrophysiologiques sont réalisées

immédiatement après la stimulation, chez des animaux anesthésiés. Plusieurs études électrophysiologiques ont confirmé ces données au niveau du NST, comme du GPi (Dostrevsky et al 2000, Boraud et al 1995), ainsi qu'une étude réalisée sur tranche toujours au niveau du NST (Magarinos et al 2002).

Le travail de Hashimoto (2003) vient contredire ces données en faveur de l'hypothèse inhibitrice, en montrant chez le singe MPTP, une activation des efférences du NST au niveau du GPe et du GPi, en utilisant des voltages supérieurs à 2 volts.

L'équipe du Dr Hammond (Garcia et Hammond 2003) obtient des résultats associant l'hypothèse inhibitrice et activatrice. Elle a réalisé une étude électrophysiologique sur tranche de tissu, déplétée en dopamine, avec une technique de suppression des artefacts permettant un enregistrement électrophysiologique pendant la stimulation. Les enregistrements effectués montrent un effet double : d'abord une suppression de l'activité spontanée du NST, puis en parallèle la genèse d'une activité induite par la stimulation, comprenant des bouffées de « spikes » de 64-84 HZ. Cet effet est observé sur un temps maximum de 2 heures sans adaptation, il est reversible, post-synaptique car indépendant de la suppression GABAergique ou aminergique. Il semble faire intervenir une activation des canaux Na+, L-type Ca2+ responsables de l'entrée de Na et des bouffées de « spikes ». Ces résultats sont un peu paradoxaux, car ils impliquent des phénomènes d'activation/inhibition réputés incompatibles. Ces données sont enfin contradictoires avec celles publiées par Dostrevsky et Magarinos, qui ont utilisé des amplitudes de stimulation plus faibles (5-80 mA et 0.2 à 1 mA) afin d'éviter les artefacts. Ces paramètres plus faibles ne permettraient pas la dépolarisation membranaire via l'activation des canaux Na+. Hashimoto, en accord avec C Hammond, utilise lui aussi des amplitudes plus fortes (3V). Les mécanismes proposés pour expliquer les résultats de ce travail pourraient impliquer la stimulation des afférences GABAergiques au niveau du NST et le relargage de GABA (Beurier 2001), alors que l'activation pourrait elle s'expliquer par

l'activation des terminaisons glutamatergiques en accord avec les résultats de montrant une augmentation du glutamate. Cependant la neutralisation de ces deux éléments ne modifient pas les patterns electrophysiologiques obtenus, de la même façon que la déplétion réserpinique. L'hypothèse est donc faite d'une stimulation post-synaptique et non pre-synaptique, en rapport avec l'activation des canaux ioniques évoquée précédemment, en désaccord d'ailleurs avec les résultats de Beurrier et al (2001).

I – 4 – 2 Les données neurochimiques et les données fonctionnelles

Les données neurochimiques sont issues de différentes méthodologies impliquant des dosages par microdialyse cérébrale où des données fonctionnelles obtenues en PET (Positron Emission Tomographique) avec le [11C]-Raclopride. Les données de dialyse montrent une augmentation des dosages de métabolites de la dopamine. Le glutamate est aussi décrit comme augmenté toujours en utilisant la microdialyse. On peut se demander si les canules de microdialyse, de dimensions importantes, n'entraîne pas une lésion qui explique cette augmentation, de plus non confirmée chez l'homme où c'est une diminution qui est observe où en PET où aucune modification n'est observée.

L'implication des voies GABAergique et glutamatergique dans les effets de la neurostimulation a été explorée essentiellement à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques. Ces études conduisent aussi à des résultats contradictoires.

L'hypothèse d'une implication des systèmes GABA/glutamatergiques dans les effets de la neurostimulation du STN a fait poser l'hypothèse logique d'un effet neuroprotecteur sur les neurones dopaminergiques de la neutralisation des afférences glutamatergiques du NST. Les travaux de B Piallat ont les premiers confirmé cette hypothèse, ainsi que ceux de Carvalho (2001). La publication du groupe de Lozano montrant l'intérêt du transfert de la GAD dans le NST va dans le même sens.

I – 4 – 3 Les données « moléculaires »

Les articles dépassant l'analyse électrophysiologique et neurochimique sont rares. Les données sont issues essentiellement du groupe de Kerkérian Le-Goff (2002 et 2004). Ce groupe a montré que la SHF induit l'expression de c-fos au niveau du NST, tout en diminuant l'expression du cytochrome oxydase. Les niveaux d'enképhalines ne sont pas modifiés au niveau du striatum homolatéral, l'augmentation de la GAD67 induite par la lésion 6-OHDA chez le rat est aussi neutralisée dans la substance noire (SNr), le noyau endopédonculaire mais pas le GP. Pour la première fois, ces données ont montré une inhibition de l'activité métabolique du NST, et la neutralisation des modifications moléculaires observées dans les structures de sortie du NST.

Enfin, plus récemment, cette équipe (2004) a étudié les modifications différentielles observées après une stimulation courte versus chronique, en étudiant aussi les effets différentiels de la lésion et de la neurostimulation. Ces travaux montrent l'existence d'effets adaptatifs à long terme ainsi que des différences entre les résultats lésionnels versus ceux issus de la neurostimulation. Perier a aussi montré que la lésion du NST neutralise l'hyperexpression de PPE (Preproenkephaline) induit par la L-Dopa.

En conclusion, les mécanismes de la neurostimulation restent discutés, contrastant avec l'efficacité clinique remarquable de cette thérapeutique. Le débat reste enfermé dans une polémique autours de l'inhibition et/ou l'activation induites par la stimulation à haute fréquence en particulier au niveau du NST et de ses efférences. Les données électrophysiologiques restent gênées par la difficulté à supprimer rigoureusement les artefacts de la stimulation rendant difficile les enregistrement per-stimulation ; les données neurochimiques obtenues par microdialyse ne peuvent empêcher de probables lésions qui

pourraient expliquer des données contradictoires avec le PETscan. Enfin, le passage de paramètres électriques « cliniques utilisés chez l'homme » aux paramètres expérimentaux utilisés en tranche ou *in vivo* est difficile à formaliser comme en témoigne l'absence de consensus sur ces paramètres. Des paramètres électriques différents, des électrodes différentes, sans mesure de l'impédance sont utilisés, qui rendent très difficile la comparaison de ces différentes études, réalisées le plus souvent chez l'animal anesthésié. Des lésions tissulaires ont clairement été montrées avec certains dispositifs et pas avec d'autres, qui pourraient expliquer des données paradoxales, en particulier d'augmentation du glutamate post-lésionnelles (Harnack, 2004).

I – 5 OBJECTIFS DU TRAVAIL

Le but de notre travail est d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires affectés par la stimulation électrique à haute fréquence (SHF). Nous avons choisi d'utiliser un modèle simple cellulaire, pour pouvoir appréhender sans facteur confondant l'impact de la SHF sur des mécanismes fondamentaux comme la neurosécrétion et l'expression génique.

Plus spécifiquement, plusieurs questions ont été posées :

- Est-ce que la SHF inhibe la sécrétion cellulaire des produits synthétisés par la cellule?

Nous avons étudié la sécrétion de la prolactine par les cellules endocriniennes GH3, de l'insuline par les cellules endocriniennes INS-1 et la sécrétion des catécholamines (DA, AD et NA) par les cellules neuronales PC12.

- Est-ce que la SHF module l'expression des ARN messagers ?

L'analyse du transcriptome des cellules par DNA microarray peut apporter des éléments de réponse, en ciblant des voies moléculaires non impliquées précédemment. Nous avons pour cela dû mettre en place la technique des microarray de type filtres oligo-longs avec détection radioactive dédiés à l'étude de l'expression génique chez le rat.

MATERIELS ET METHODES

II – 1 LIGNEES CELLULAIRES ET CONDITIONS DE CULTURE

Les cellules GH3 ont été établies en 1965 par Tashjian et al, à partir d'une tumeur pituitaire de rat (Tashjian et al, 1968) chez une femelle Wistar-Furth de 7 mois. Ces cellules ont la propriété de produire des facteurs de croissance et de sécréter de la prolactine. Nous les avons obtenues de la collection ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, USA). Les cellules GH3 sont cultivées:

- soit en monocouche adhérente en milieu Ham's F10 (SIGMA-Aldrich, France) 81,5 %, supplémenté de 15 % sérum de cheval (GIBCO, Invitrogen France), 2,5% de sérum de veau fœtal (SIGMA-Adrich, France), 200 mM L-Glutamine (Bio-Whittaker, France), et d'un mélange de 100 u/ml pénicilline et 50 g/ml streptomycine (GIBCO, Invitrogen France),
- soit en suspension en Eagle's minimum essentiel (EME) (SIGMA-Aldrich, France) 81.5 %, supplémenté de 15 % de sérum de cheval, 2.5 % de sérum de veau fœtal et du mélange pénicilline-streptomycine.

Les cellules PC12, établies en 1976 par Greene LA et al, ont été isolées à partir d'une tumeur de la glande surrénale (phéochromocytome) de rat. Elles présentent un phénotype neuronal en réponse à un traitement par le NGF (Nerve Growth Factor ou facteur de croissance nerveux), et synthétisent les catécholamines dopamine , adrénaline et noradrénaline, ce qui en fait un modèle d'étude en neurobiologie.

Ces cellules sont cultivées en monocouche adhérente en RPMI 1640 84% (SIGMA-Aldrich, France), supplémenté de 10 % sérum de cheval, 5% de sérum de veau fœtal, 200mM de L-Glutamine, et d'un mélange de 100 u/ml pénicilline et 50 ng/ml streptomycine.

Les cellules INS-1, établies en 1977 par Chick et al et modifiées en 1990 par Traumann et al, ont été isolées à partir d'une tumeur (insulinome) de rat. Elles synthétisent l'insuline.

Ces cellules sont cultivées en monocouche adhérente en RPMI 1640 87 % (SIGMA-Aldrich, France), supplémenté de 10 % sérum de veau fœtal, 1 mM pyruvate sodium, 10 mM Hepes, 50 µM β-Mercaptoéthanol, 200 mM de L-Glutamine, et d'un mélange de 100 u/ml pénicilline et 50 ng/ml streptomycine, dans un incubateur à 37 °C en atmosphère humide contenant 5 % CO_2.

Lorsque la confluence ou la densité sont suffisantes, les cellules adhérentes sont détachées à l'aide d'une solution de trypsine/EDTA (0,25%/1mM), et les cellules flottantes sont centrifugées à 1500 rpm pendant 5 à 10 minutes.

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 en azote liquide (-196°C) dans un milieu de cryoprotection (milieu de culture supplémenté de 5 % DMSO (v/v)).

II – 2 PROTOCOLE D'ACTIVATION DES CELLULES PAR STIMULATION ELECTRIQUE

II – 2 – 1 Montage expérimental d'une plaque de 24 puits en série, ou d'une boite de Pétri avec 2 fils de titane

Notre montage expérimental (modifié d'après Brevet et al, 1976) consiste soit en une plaque de 24 puits où 12 puits sont reliés en série par un pont de fils en titane entre 2 puits adjacents (voir figure II-1 ou photo II-1), soit en une boite de Pétri de 10 cm de diamètre dans laquelle sont collées 2 fils en titane de 8 cm de long parallèles et séparés par 3 cm (voir figure II-2 ou photo II-2). Ce dernier système a l'avantage de permettre la stimulation d'une plus grande quantité de cellules (voir figures 1,2 et photos 1,2). Ces 2 types de support de culture

peuvent ainsi être intégrés dans un circuit de courant électrique après branchement à un générateur et un isolateur. La stimulation électrique est contrôlée par un oscilloscope pendant la période d'expérimentation.

Figure II-1

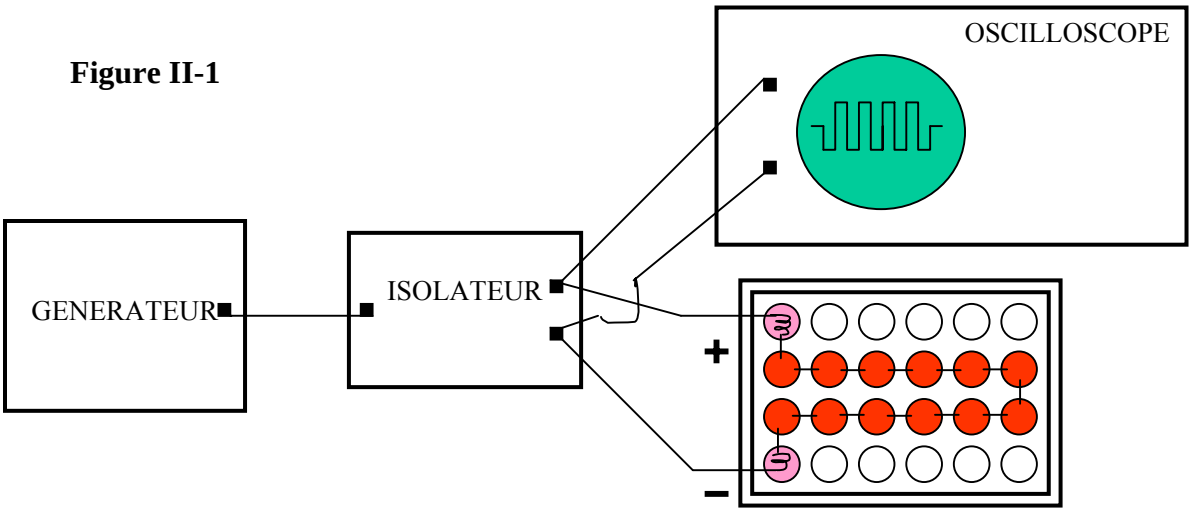


Schéma du montage expérimental en série d'une plaque de 24 puit pour la stimulation électrique des cellules in vitro.
Les puits adjacents sont reliés entre eux par des fils de titane.

Figure II-2

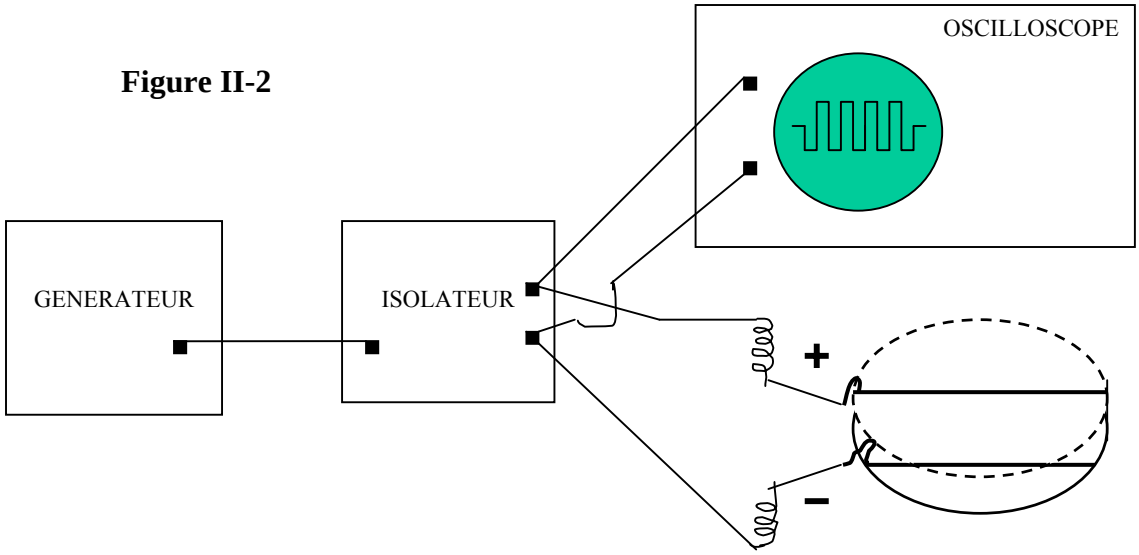


Schéma du montage expérimental d'une boite de Pétri
pour la stimulation électrique des cellules in vitro.

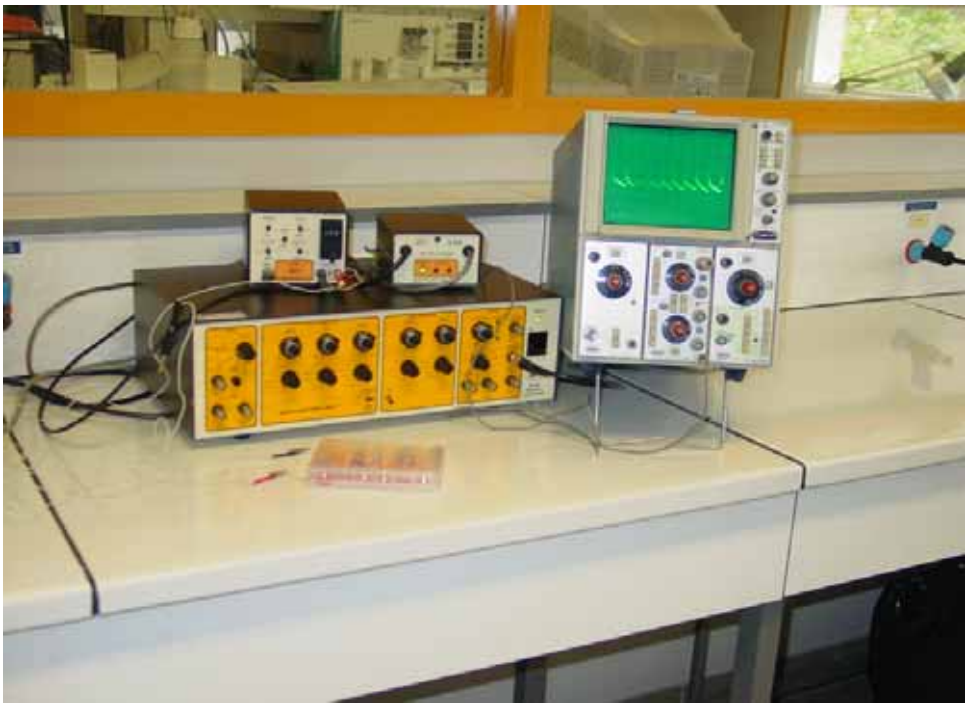


Photo II-1 *Montage expérimental en série d'une plaque de 24 puits pour la stimulation électrique des cellules in vitro. Les puis adjacents sont reliés entre eux par des fils de titane. Le support de culture peut être inséré dans un circuit électrique après branchement à un générateur et un isolateur. La stimulation électrique est contrôlée par un oscilloscope pendant la période d'expérimentation.*

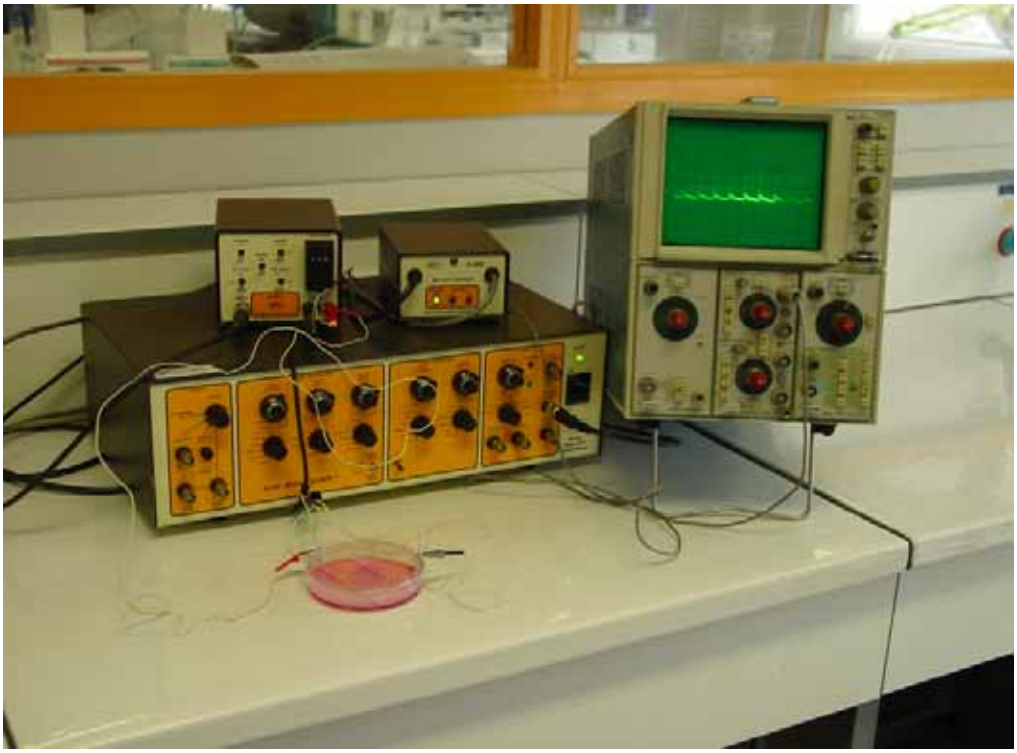


Photo II-2 *Montage expérimental d'une boite de Pétri de 10 centimètres de diamètre pour la stimulation électrique des cellules in vitro. Le support de culture peut être inséré dans un circuit électrique après branchement à un générateur et un isolateur. La stimulation électrique est contrôlée par un oscilloscope pendant la période d'expérimentation.*

II – 2 – 2 Les paramètres de la stimulation électrique

Les cellules GH3 ou PC12 sont ensemencées dans les boîtes de culture du montage précédemment décrit. Lorsqu'elles atteignent la confluence, elles sont soumises à la stimulation électrique par application d'un courant monophasique de 500 µA pendant des durées de 3 ou 24 heures, en mode bipolaire, à des fréquences différentes (voir tableau II-1):

- Stimulation à Haute Fréquence (SHF): à 130 Hz, la durée entre deux impulsions ("event interval") est de 7.7 ms;

- Stimulation à Basse Fréquence (SBF): à 10 Hz, la durée entre deux impulsions ("event interval") est de 100 ms;

La largeur de l'impulsion est toujours de 60 µs.

L'impulsion électrique est une onde carrée monophasique (voir figure II-3).

Les cellules témoins sont ensemencées de la même manière mais ne sont pas stimulées électriquement.

Condition électrique	Intervalle entre pulses / Fréquence	Durée d'impulsion	Courant électrique	Durée d'exposition
SHF	7.7ms / 130 Hz	60 µs	500 µA	3 ou 24 heures
SBF	100ms / 10 Hz	60 µs	500 µA	3 ou 24 heures
Contrôle	–	–	–	3 ou 24 heures

Tableau II-1 *Paramètres de la stimulation électrique des cellules in vitro dans les montages expérimentaux précédemment décrits.*

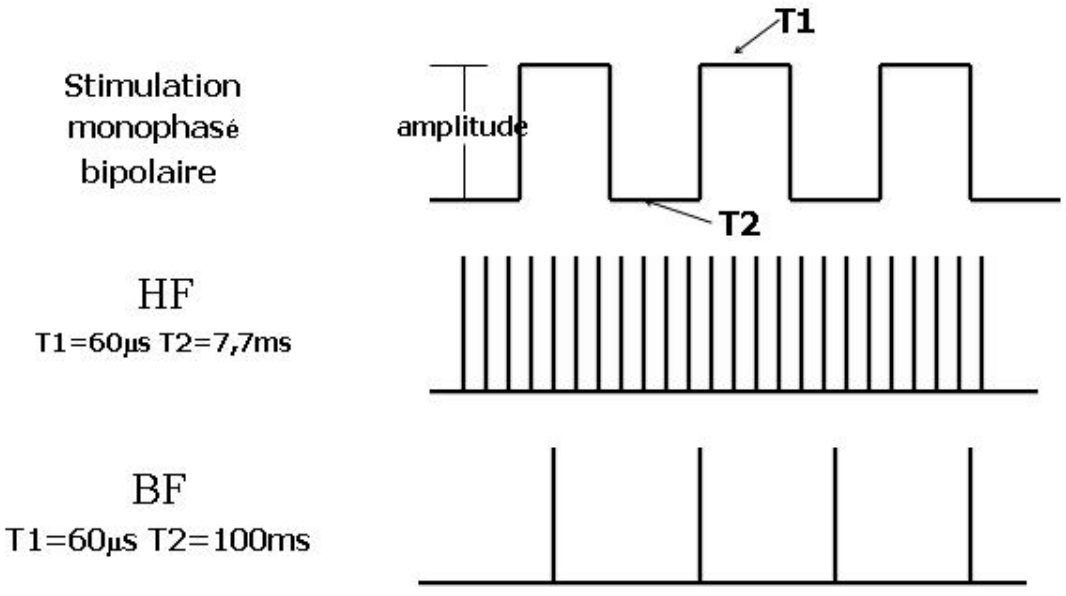


Figure II-3 *Schéma de la stimulation électrique par onde carrée en conditions de HF et BF.*

II – 3 PROTOCOLE D'ACTIVATION PHARMACOLOGIQUE DES CELLULES

Les cellules sont ensemencées dans des plaques à 24 puits ou des boîtes de Pétri. Lorsqu'elles atteignent la confluence, elles sont rincées une fois avec du PBS puis remises en milieu complet et soumises au traitement pharmacologique.

La stimulation pharmacologique consiste à traiter les cellules pendant les mêmes durées (3 et 24 heures) que lors de la stimulation électrique par les traitements suivants :

- les cellules GH3 sont traitées par 0.1 ou 0.01 mM de Dopamine.
- les cellules PC12 subissent 6 types de traitement : par le NGF (nerve growth factor) 50 ng/ml, le tétraméthylammonium chloride (TMA) 0.5 mM, le lanthanum bichloride heptahydrate ($LaCl_3$) 100 µM, la nifédipine 20 µM, ou le 1-(5-Isoquinolinylsulfonyl)-2-méthylpiperazine dihydrochloride (H7) 20 µM et 6-hydroxydopamine hydrochloride (6-OHDA) 30 µM.

Les cellules témoins sont ensemencées de manière identique, mais ne subissent aucun traitement.

Pendant toute la durée du traitement, les cellules sont incubées à 37˚C, en atmosphère humide avec 5 % CO_2.

II – 4 TESTS DE VIABILITE CELLULAIRE

II – 4 – 1 Comptage cellulaire avec un hématimètre

Les cellules sont comptées à l'aide, d'un hématimètre de Neubauer avec exclusion par 4% bleu trypan sous un microscope.

II – 4 – 2 Test colorimétrique au bleu de thiazolyl (essai MTT) pour le dosage des cellules PC12 adhérentes

Le MTT (bromure de 3-[4,5-diméthyl-2-thiazolyl]-2,5-diphényltétrazolium, Sigma M5655) est un sel de tétrazolium donnant une solution de couleur jaune quand il est dilué dans le milieu. Il est converti en formazan violet insoluble dans le milieu de culture après

clivage du cycle tétrazolium par les déshydrogénases mitochondriales actives des cellules vivantes seules. Les cellules mortes ne peuvent être le siège de ce changement.

10^5 cellules PC12 sont ensemencées par puits dans une plaque 24 puits. Après 24 heures d'incubation, les cellules sont soumises aux différents traitements pharmacologiques ou à la stimulation électrique selon le protocole réalisé. Après 3 heures ou 24 heures de stimulation, on ajoute la solution de MTT, soit 1/10 du volume initial de culture et une concentration finale de 0.5 mg/ml. Après 3 heures d'incubation, le milieu est aspiré avec précaution afin de ne pas aspirer les cristaux de formazan formés qui sont solubilisés dans 100 µl d'une solution 50% éthanol absolu/50% DMSO. Le matériel dissout est mesuré par spectrophotométrie, donnant une absorbance proportionnelle à la concentration de colorant converti. L'absorbance de chaque puits est mesurée à 540 nm après soustraction du bruit de fond sur le spectrophotomètre Elx800G (Bio-TEK Instrument, USA).

II – 4 – 3 Test colorimétrique au sel de tétrazolium WST-1 pour le dosage des cellules GH3 flottantes

Le sel de tétrazolium WST-1 (4-(3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzène disulfonate) est un dérivé du MTT précédemment décrit. WST1 est également clivé via les réductases de la chaîne respiratoire des mitochondries des cellules vivantes, mais le formazan produit par clivage présente l'avantage d'être soluble dans l'eau. La réaction peut ainsi être lue directement dans le milieu de culture, ce qui permet le dosage des cellules cultivées en suspension.

3.10^5 cellules GH3 dans 1000 µl de milieu sont ensemencées par puits dans une plaque 24 puits. Avant de démarrer la stimulation, on ajoute 20 µl de WST-1 100 mM dans chacun des puits, soit une concentration finale de 2 mM. Les cellules sont soumises aux différents traitements pharmacologiques ou à la stimulation électrique selon le protocole réalisé. Après 3

heures ou 24 heures de stimulation, l'absorbance de chaque puits est mesurée à 450 nm après soustraction du bruit de fond sur le spectrophotomètre Elx800G (Bio-TEK Instrument, USA).

II – 5 PREPARATION DES ECHANTILLONS PROTEIQUES

Après que les cellules GH3 et PC12 aient été stimulées soit par un traitement pharmacologique, soit électriquement, les surnageants de culture sont récupérés, et réservés à -80°C, pour les dosages ultérieurs en protéine totale et les dosages de prolactine et catécholamines.

Les extraits protéiques cellulaires sont préparés comme suit:

II – 5 – 1 Préparation des extraits cellulaires par lyse des cellules

Après récupération des surnageants, les cellules adhérentes sont rincées 2 fois avec du PBS et décollées avec un "grattoir" dans 2 ml de PBS, puis centrifugées 5 minutes à 1500 rpm. Le culot est repris dans 80 µl de tampon de lyse (Reporter Lysis Buffer 5X (Promega®)), supplémenté de deux cocktails d'inhibiteurs de protéases (Complete, Roche®) pour 50 ml (1X), puis centrifugé 10 minutes à 10000 rpm. Le surnageant contenant les extraits protéiques cellulaires est aliquoté et conservé à -80°C.

Les cellules en suspension sont centrifugées 5 minutes à 1500 rpm, le surnageant récupéré et réservé à -80°C. Le culot est repris dans le tampon de lyse et traité comme décrit précédemment.

Toutes ces étapes sont conduites à 0°C sur la glace.

II – 5 – 2 Dosage des protéines des extraits

Nous avons utilisé la méthode de Bradford. C'est une méthode de mesure de concentration protéique basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et un colorant : le bleu de Coomassie G250. Ce réactif, rouge/brun à l'état libre, prend une teinte bleue quand il est lié aux protéines et par conséquent possède un coefficient d'extinction molaire élevé dans le visible (à 595 nm) qui permet un dosage protéique sensible.

5 µl d'extrait protéique à doser sont ajoutés à 200µl de réactif de Bradford et 795 µl d'eau distillée. 5 minutes plus tard, on mesure l'absorbance au spectrophotomètre à 595 nm. Le zéro servant de référence correspond à un échantillon témoin ne contenant pas de protéines. La concentration de l'échantillon protéique dosé est alors déterminée à l'aide d'une courbe étalon réalisée dans les mêmes conditions avec des échantillons d'albumine sérique bovine (BSA) de concentrations connues.

II – 6 - IMMUNODOSAGES

II – 6 – 1 Dosage radioimmunologique de la prolactine

Le dosage de la prolactine (PRL) a été réalisé avec la trousse de dosage immunoradiométrique "RIA Prolactine rat" commercialisée par Immunotech, France. Le dosage est basé sur la compétition entre la prolactine de l'échantillon à doser et un traceur prolactine de rat marqué à l'iode 125 pour se lier à un anticorps anti-prolactine en phase homogène. Les concentrations d'anticorps et de traceur étant constantes, la fraction radioactive liée et mesurée est directement proportionnelle à la PRL non radioactive contenue dans l'échantillon à doser.

Brièvement, 50 µl d'échantillons ou de standards (contenant des quantités de PRL permettant d'établir la gamme d'étalonnage entre 0 et 250 ng/ml) sont incubés en présence de 100 µl du traceur ^{125}I-rPRL et de 100 µl de l'anticorps polyclonal de lapin anti-PRL. Après incubation pendant toute la nuit à température ambiante, 2 ml d'anticorps secondaire anti-lapin dans une solution de PEG (poly éthylène glycol) sont rajoutés et incubés 30 minutes sous agitation, puis les tubes sont centrifugés, et la radioactivité précipitée est alors mesurée par un compteur gamma. Les quantités de prolactine des échantillons sont déterminées par interpolation avec la courbe d'étalonnage.

Le dosage de l'insuline a été réalisé avec le même dosage immunoradiométrique sauf l'anticorps porcine anti-insuline commercialisée par Immunotech, France.

II – 6 – 2 Dosage radioenzymatique des catécholamines

Le dosage des catécholamines a été réalisé avec le kit de dosage immunoenzymatique (immunoenzymométrique) "Catécholamine research assay system (catécholamines [^{3}H] radioenzymatic assay)" commercialisé par Amersham Pharmacia Biotech, UK.

Les catécholamines présentes dans l'échantillon à doser (inconnu ou standard) sont transformées en dérivés méthoxylés tritiés (normétanéphrine, métanéphrine et méthoxytyramine). La COMT (Catéchol-Ortho-Méthyl-Transférase) catalyse le transfert d'un groupe méthyl tritié de la SAMe (S-adénosyl-Méthionine) vers les catécholamines. Cette réaction a lieu à 37°C pendant 1 heures et 30 minutes.

Après passage dans la glace pour stopper le marquage, les dérivés méthoxylés sont extraits en milieu alcalin par un mélange organique composé de Toluène et d'alcool isoamylique (3v :2v). La phase organique ainsi obtenue est purifiée par passage en milieu acide acétique aqueux. La phase aqueuse acide contenant les dérivés méthoxylés est déposée sur une plaque de gel de silice (Silicagel Plastik Folien MERCK Darmstadt Allemagne) et mise à migrer dans un mélange de chloroforme – éthanol - éthylamine (6v :3v :2v). Quatre heures après, les « spots » correspondant à chacune des amines méthoxylées sont repérés et identifiés sous lumière ultraviolette à 254 nm. Le spot correspondant à chaque catécholamine est gratté et déposé dans une fiole à scintillation contenant une solution d'ammoniaque 0.1 N.

La Métanéphrine et la Nor-Métanéphrine sont soumises à une réaction d'oxydation au periodate de sodium avant d'être mesurées en scintillation liquide. La Méthoxytyramine est comptée directement dans la solution d'ammoniaque.

La radioactivité mesurée dans les échantillons est ensuite convertie en pg/ml.

La technique mise en œuvre précédemment permet d'atteindre des niveaux de sensibilité de l'ordre du picogramme (NA : 1.2pg ; AD : 0.9pg ; DA : 7pg.).

II – 7 ANALYSE DES PROFILS PROTEIQUES PAR LA TECHNOLOGIE SELDI-TOF-MS

II – 7 – 1 Principe

La technique SELDI-TOF (Surface enhanced laser désorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, commercialisée par *Ciphergen Biosystem*, Palo Alto, CA, USA) consiste en une plateforme unique d'analyse protéique combinant la technologie des puces à chromatographie d'affinité par rétention (ProteinChip®), la spectrométrie de masse et les logiciels d'exploitation informatique (voir figure II-4).

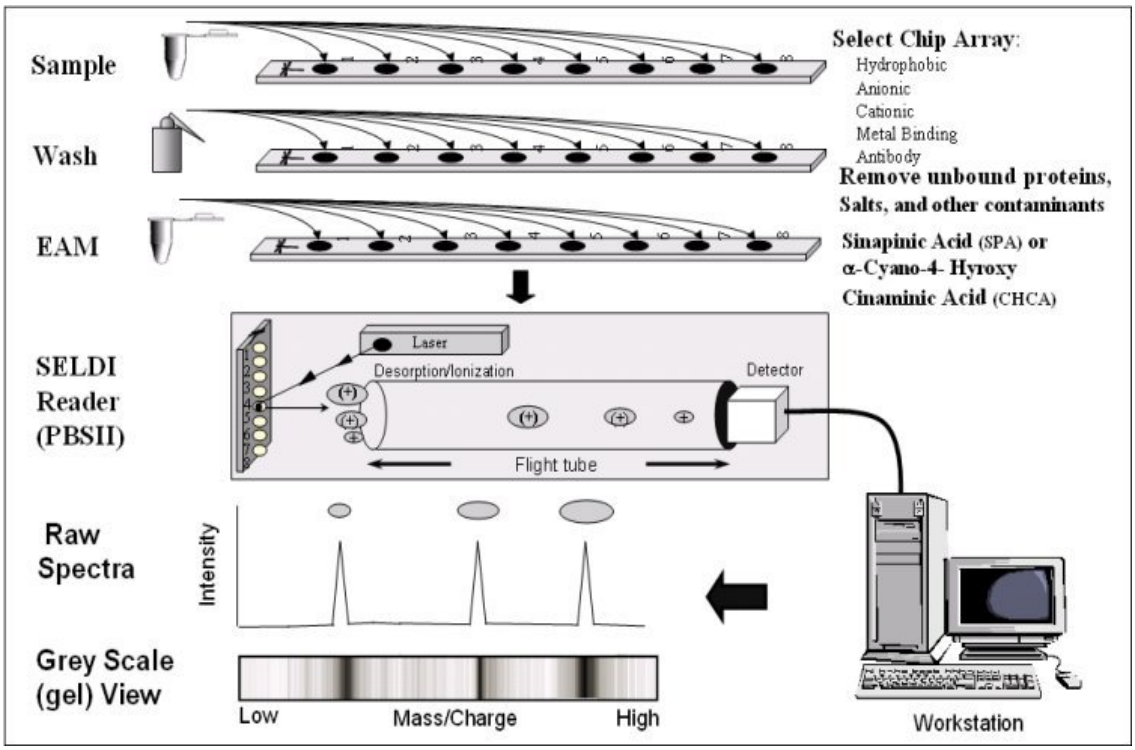


Figure II-4 *Principe de SELDI-TOF-MS*

Les puces ProteinChip offrent différentes surfaces chromatographiques de rétention (surfaces échangeuses d'anions, de cations, hydrophobes, ou de capture par affinité pour les métaux), ou de couplage covalent (via l'interaction à des appâts spécifiques, tels que des anticorps, ou toute autre molécule partenaire protéique ou nucléique). (Figure II-4)

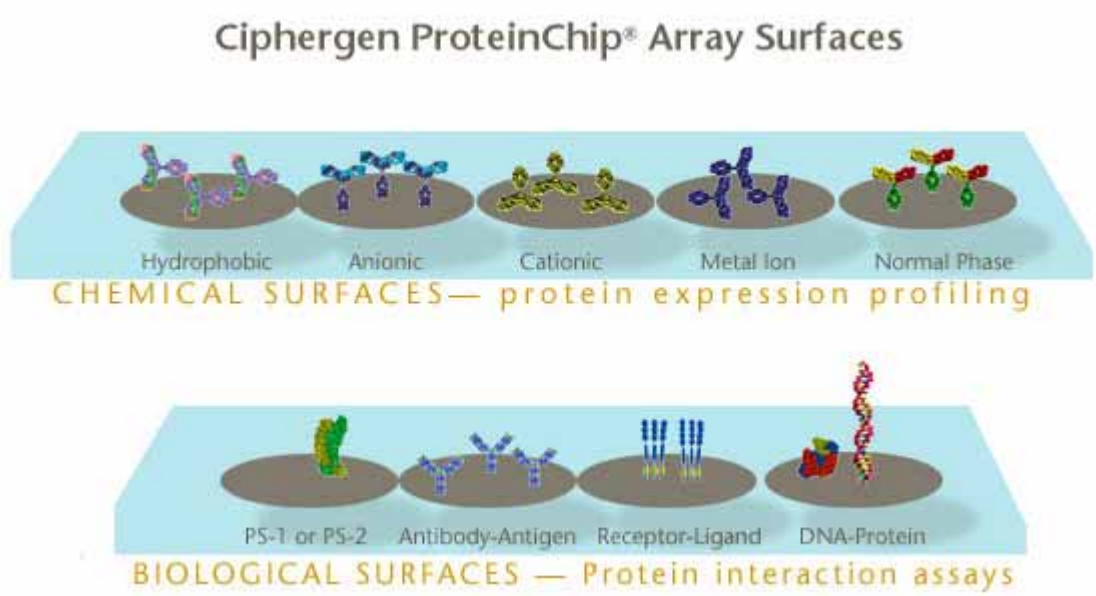


Figure II-5 *les différentes surfaces de SELDI. Issu de www.ciphergen.com.*

L'utilisation de ces différentes surfaces permet de réduire des échantillons protéiques complexes (soit des fluides biologiques : sérum, plasma, urines, liquide pleural…, soit des extraits bruts : tissus, cellules…) à des groupes basés sur des propriétés communes (figure II-5). Le SELDI permet aussi l'analyse d'un sous-protéome rendant ainsi possible l'étude de protéines non majoritaires. Enfin l'individualisation de protéines à partir d'un support chromotographique en couche mince est un garant pour une unification ultérieure.

La technologie ProteinChip® repose sur 4 étapes (voir figure II-6):

1- La première étape consiste à déposer sur chaque surface chromatographique ("spot") quelques µl d'un extrait brut. Grâce aux interactions par affinité, les protéines de l'échantillon se lient aux "sites d'amarrage" chimiques ou biologiques dont est dotée la surface de la puce ProteinChip®.

2 - Chaque spot est ensuite lavé pour éliminer les protéines retenues de manière non spécifique ainsi que toute substance contaminante (sels, détergents…). Le "bruit de fond" de l'échantillon est ainsi éliminé, quel que soit le tampon utilisé pour sa préparation.

3- Après lavage, la puce est séchée et une solution contenant la matrice ou EAM (Energy Absorbing Molecules) est ajoutée ; les molécules enrobent les protéines permettant la

cristallisation des protéines retenues sur la puce et facilitant leur désorption et leur ionisation générée par laser dans le lecteur SELDI - TOF - MS.

4- Les protéines retenues sont enfin analysées par le spectromètre de masse basé sur le temps de vol de chaque protéine. Un profil protéique est ainsi établi, le spectre donnant la masse des pics détectés (m/z) ainsi que leur intensité relative par le logiciel ProteinChip® Software et Biomarker Wizard Software.

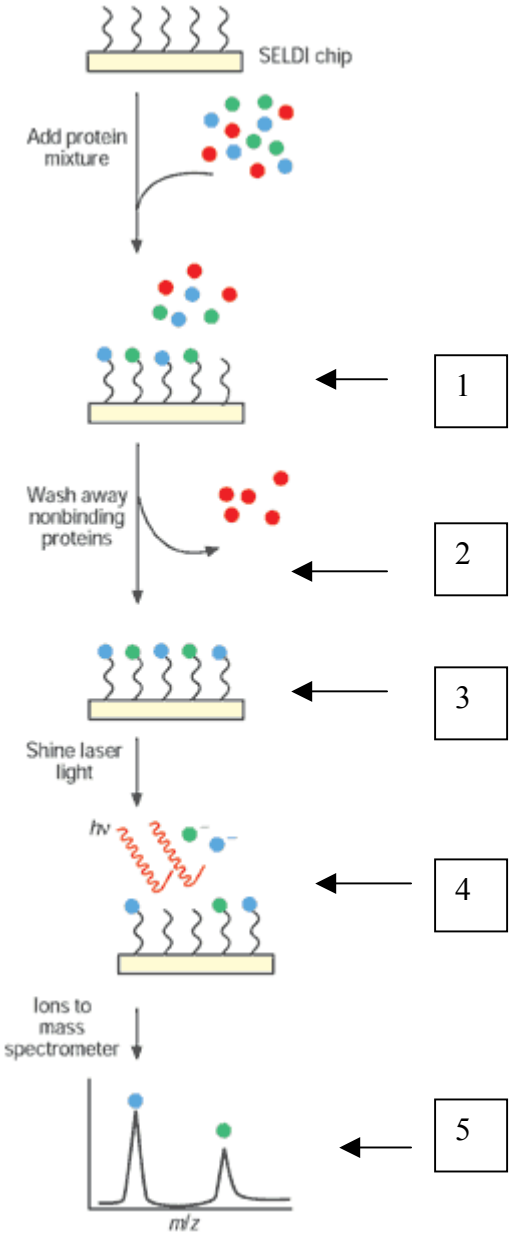


Figure II-6 *Le procédé technique de SELDI. Issue de www.cnic.es*

1) déposer les échantillons
2) laver les surfaces
3) ajouter le EAM
4) lecture
5) analyser

II – 7 – 2 Etablissement des profils protéiques des cellules GH3 et PC12 activées par stimulation électrique et traitement à la Dopamine :

Nous avons utilisé les barrettes H50, SAX2, et WCX2 permettant l'analyse de nos échantillons protéiques sur des surfaces respectivement hydrophobe, échangeuse d'anions et échangeuse de cations.

Les protocoles de traitement des barrettes sont réalisés par la technique dite "en goutte" pour ce qui concerne les barrettes de type H50, et SAX2 où les dépôts de petits volumes se font par capillarité sur le spot, ou grâce à l'utilisation d'un bioprocesseur qui crée une enceinte autour du spot (photo II-3 et photo II-4) pour les barrettes WCX2 et SAX2. Le bioprocesseur permet de travailler avec des volumes plus grands et de limiter les adsorptions non spécifiques dans le périmètre immédiat du spot. Il augmente aussi la reproductibilité des expériences.

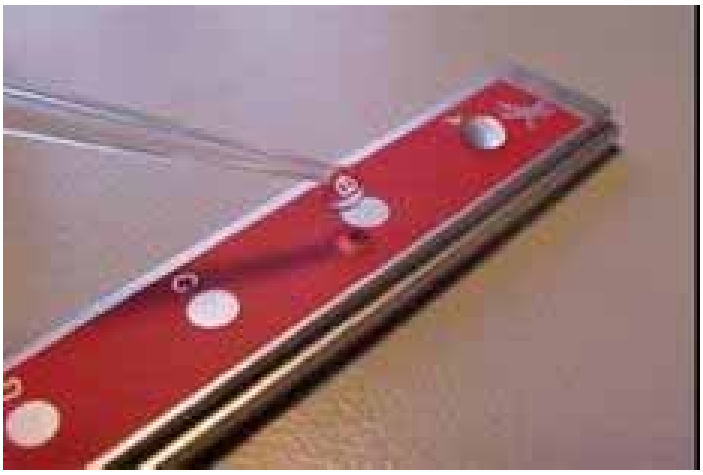


Photo II-3 *Technique en goutte avec une surface de la barrette (à gauche).*
Photo II-4 *Alignement de bioprocesseurs (à droite).*

II – 7 – 2 – 1 Prétraitement des barrettes

Les spots de chaque type de barrette sont spécifiquement activés par un prétraitement :

« En goutte » :

- la surface hydrophobe **H50**, est activée avec 5% d'acétonitrile (ACN) en PBS pendant 5 min à température ambiante, rincée à l'eau distillée, puis incubée en 10% ACN + 0.1% acide trifluoroacétique (TFA) + 200 mM NaCl dans PBS, 5 minutes supplémentaires.
- la surface d'anion SAX2 est activée avec Tris HCl 100mM (pH7.5) + 0.1% Triton pendant 5 minutes à température ambiante dans une chambre humide.

« Utilisation d'un bioprocesseur » :

- la **SAX2** est activée en Tris-HCl 100mM pH 8 + 0.1% Triton, 5 minutes à température ambiante ;
- la **WCX2**, est activée 10 minutes avec 10 mM d'acide chlorhydrique (HCl), puis après rinçage à l'eau distillée 5 minutes avec 50 mM d'acétate de sodium pH 4.5 + 0.1% Triton.

II – 7 – 2 – 2 Dépôt des échantillons protéiques sur spot :

« En goutte » :

- **H50** et **SAX2 :** 5 µg de protéines dans 10 µl de tampon de lyse des protéines (Promega) sont incubés en goutte sur la barrette pendant 30 minutes à température ambiante dans la chambre humide.

« Utilisation d'un bioprocesseur » :

- **SAX2** : 10 µg de protéines dans 100 µl de Tampon Tris HCl 100 mM pH 8.0 + 0.1% Triton sont déposés sur la barrette insérée dans le bioprocesseur en homogénéisant délicatement sans toucher le spot. L'incubation réalisée sous agitation dure 45 minutes à température ambiante.
- **WCX2** : 10 µg de protéines totales dans 100 µl de 50 mM d'acétate de sodium pH 4.5 + 0.1% Triton, sont déposés sur la barrette insérée dans le bioprocesseur en homogénéisant délicatement sans toucher le spot. L'incubation réalisée sous agitation dure 45 minutes à température ambiante.

II – 7 – 2 –3 Lavages des barrettes

« En goutte »

- **H50**: chaque spot est rincé 3 fois avec 5 µl de 10% ACN PBS+0.1% TFA+ 200 mM NaCl, puis séché.

- **SAX2** : chaque spot est rincé 2 fois avec 5 µl de Tris HCl 100 mM pH 7.5 + 0.1% Triton, 3 fois avec du Tris HCl 100 mM pH 7.5 sans Triton pendant 5minutes. La barette est enfin rincée rapidement en HEPES 2mM, puis séchée.

« Utilisation d'un bioprocesseur »

- **SAX2**: chaque spot est rincé 3 fois avec 200 µl de Tris HCl 100 mM pH 8.0 + 0.1% Triton, pendant 5 minutes sous agitation, puis 5 minutes supplémentaires avec 200 µl de Tris HCl 100 mM pH 8.0. La barrette est rincée rapidement en HEPES 2mM puis séchée.

- **WCX2** : chaque spot est rincé 3 fois avec 200 µl d'acétate de sodium 50 mM pH 4.5 + 0.1% triton, puis 1 fois avec 200 µl d'acétate de sodium 50 mM pH 4.5; chaque rinçage dure 5 minutes sous agitation. Après un rinçage rapide à l'eau distillée, la barrette est séchée.

II – 7 – 2 – 4 Dépôt de la matrice

La matrice consiste en une solution d'acide sinapinique préparée en 50% ACN et 0.5% de TFA. Cette solution est centrifugée 2 minutes à 14000 rpm à température ambiante, et la matrice est prélevée dans le surnageant en évitant les particules non dissoutes du culot. La matrice peut alors être conservée quelques jours à 4°C et à l'abri de la lumière.

Sur chaque spot, quel que soit le type de barrette, 2 dépôts successifs de 1 µl de matrice sont faits, puis les barrettes sont séchées à l'abri de la lumière jusqu'à la lecture.

II – 7 – 2 – 5 Lecture

En effet l'intensité du bombardement laser peut être modulée selon les masses des protéines d'intérêt. Plus l'intensité sera élevée, plus les protéines de haut poids moléculaire vont pouvoir être ionisées et donc détectées et inversement.

Nous travaillons sur 3 paramètres différents de lecture pour analyser chaque spot. Leurs intensités sont 160, 175 et 190. Ce sont les petites masses, les masse intermédiaires et les hautes masses.

Analyse des données : le profil SELDI-TOF est normalisé à l'aide du logiciel Bio-pattern, en utilisant une normalisation globale débutant après 2500 dalton afin d'éviter le bruit de fond de la matrice. Un repérage automatique des pics est effectué. Une analyse statistique des données quantitatives est ensuite réalisée (t-Test student), de même qu'une analyse de type clustering selon Eisen similaire à celle effectuée pour le transcriptome (http : www : microarrays.org /sofeware.html) (Eisen et al 1998).

II – 8 MARQUAGE METABOLIQUE DES CELLULES PAR LA METHIONINE ^{35}S

II – 8 – 1 Principe

Des cultures de cellules sont réalisées en présence de méthionine ^{35}S, utilisée par les cellules pour la synthèse protéique. Les protéines ainsi radio-marquées seront analysées par autoradiographie.

II – 8 – 2 Incorporation de méthionine ^{35}S.

Les cellules PC12 et GH3 non stimulées (condition contrôle) ou stimulées selon le protocole précédemment décrit dans une boite de Pétri de 10 centimètres sont cultivées en présence de 50 µCi de méthionine ^{35}S pendant la durée de stimulation électrique.

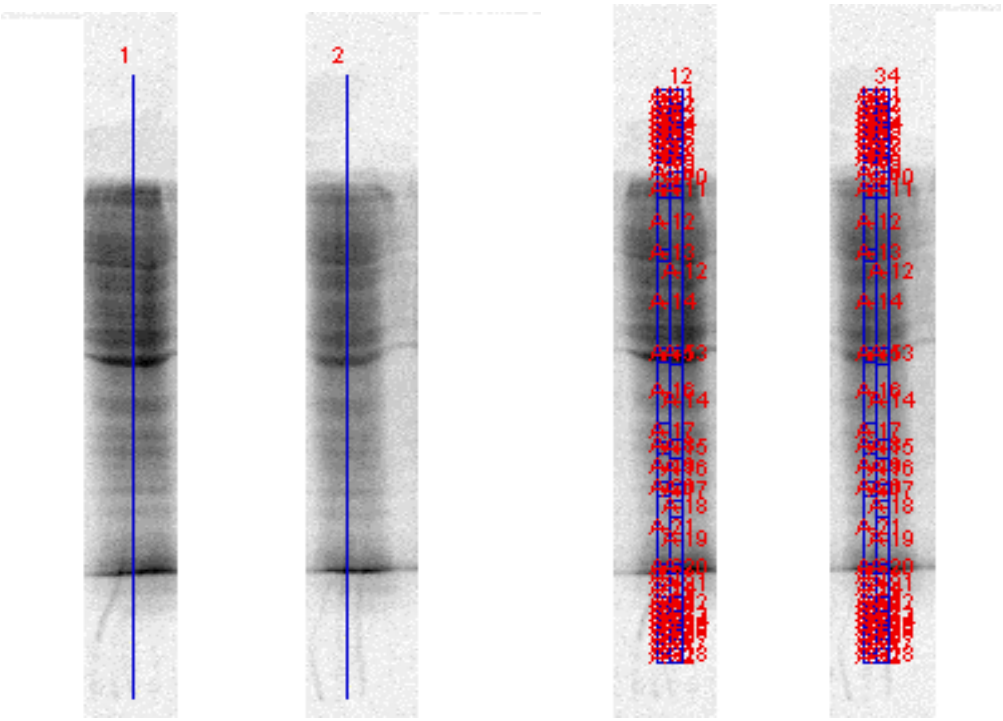
II – 8 – 3 Traitement de l'extrait protéique

Les cellules sont ensuite lavées 3 fois par du tampon PBS et collectées à l'aide d'un «grattoir», puis centrifugées. Le culot cellulaire est ensuite repris dans du tampon de lyse selon le protocole précédemment décrit.

II – 8 – 4 Analyse par autoradiographie

Après lyse des cellules, différents dépôts de 10 µg de protéines sont déposés sur un gel SDS-PAGE pour l'électrophorèse (gel à 12% d'acrylamide). Des marqueurs de masse moléculaire (Full range Rainbow™, Amersham Biosciences, UK) sont déposés parallèlement. Après migration, le gel est exposé sur un écran phosphore (Image Plate Fujifilm) environ 6 heures, puis la radioactivité est révélée par le détecteur (PhosphoImager BAS-5000, Fuji-Film™; Raytest, Paris la Defense, France). Nous avons utilisé la résolution 100, et la sensibilité S 30000 (Unités Arbitraires de Fuji). Après révélation, les profils de protéines et

les PSL/mm^2 (photostimulated luminescence par area), autrement dit les quantités de PSL sur la même surface, sont analysés par le logiciel Image Reader (Fuji) (voir figure II-7).



Figures II-7: *Méthodes d'analyse quantitative des gels de protéines.*

Sur les 2 pistes de gauche : Le logiciel repère les bandes sur l'ensemble de la piste d'électrophorèse et donne les profils de migration correspondant.

A droite : Le logiciel permet d'intégrer la quantité de radioactivité pour les bandes repérées.

II – 9 ANALYSE GLOBALE DE L'EXPRESSION GENIQUE PAR DNA MICROARRAY

Pour notre étude, ont été utilisés 4854 oligonucléotides de 65-mers, obtenus auprès de la société SIGMA Aldrich, correspondant à l'ensemble des séquences de mARN connues chez le rat (RATLIB96) .

Chaque oligonucléotide est déposé en double sur des membranes de nylon (Nytran+; Schleicher & Schuell) par un robot GMS 417 (MWG, Ebersberg, Germany), tous les 500 µm. Un oligonucléotide sonde pour l'ARN standard est également déposé en 48 exemplaires sur la membrane.

Les ARN totaux sont préparés à partir des cellules par une méthode d'extraction au phénol-chloroforme (RNAgent® Total RNA isolation system, Promega). Les ARN sont ensuite dosés et contrôlés au moyen du Bio-Analyser, (Agilent Technologies).

Les ARN (3 µg d'ARN total par échantillon) sont ensuite réverse-transcrits en cDNA en utilisant des amorces dT25 et de l'α[^{33}-P]dCTP. Un ARNm (0.3 ng) correspondant à une séquence d'Orysa sativa et servant de standard interne est ajouté à chaque échantillon.

Les cDNA radio-marqués sont aussi dénommés cibles complexes. L'hybridation des cibles complexes sur les filtres oligonucléotidiques est ensuite réalisée durant 4 jours à 55 °C dans un tampon constitué de 5X SSC, 5X Denhardt, 1mg/ml d'ADN de sperme de saumon et 0.5% SDS. Les membranes sont ensuite lavées durant 3 heures à 45˚C dans un tampon 2X SSC, 0.5% SDS; puis exposées pendant 4 jours sur écran phosphore avant acquisition des signaux au détecteur à haute résolution (PhosphoImager BAS-5000, Fuji-Film™; Raytest, Paris la Defense, France). Les intensités des spots sont ensuite quantifiées par le logiciel Array Gauge (Fuji) (Figure II-8).

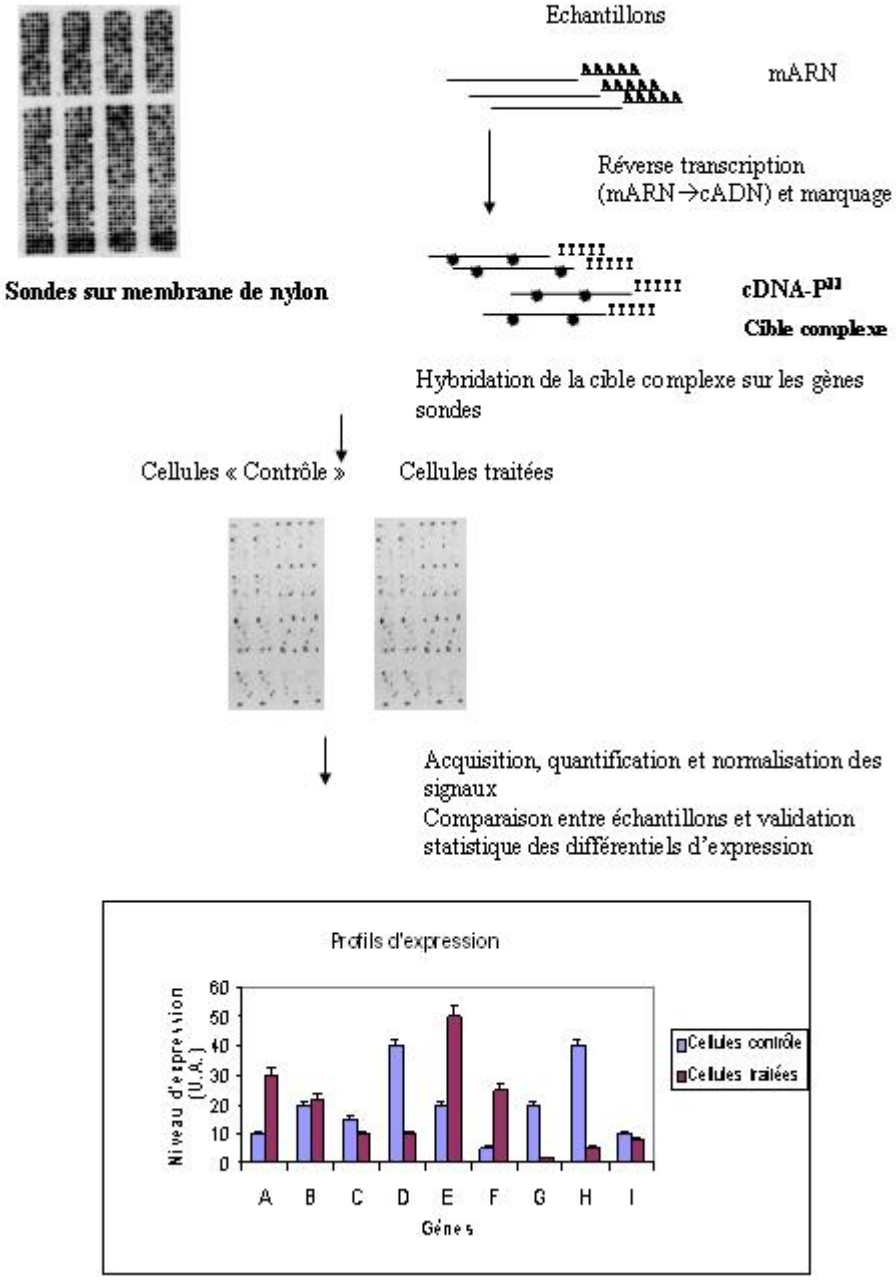


Figure II-8 *La méthode de DNA microarray*

Pour chaque filtre, le bruit de fond moyen et l'écart type sont calculés.

La valeur de la moyenne additionnée de 3 fois l'écart type est retranchée aux intensités brutes.

Pour la normalisation des expériences, la somme des signaux de chaque filtre est réalisée et son rapport avec la somme des signaux d'un filtre choisi comme référence est

effectué. Les intensités de chaque filtre sont ensuite corrigées par le facteur respectif obtenu.

Parmi ces 4854 gènes, nous avons retenu tous les gènes exprimés soit 2 fois plus ou soit 2 fois moins entre le contrôle et la SHF.

II – 10 ANALYSE STATISTIQUE

Les données numériques présentées dans cette étude sont les moyennes des mesures accompagnées de la déviation standard. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives lorsque $p<0.05$ à partir du Student's Two-Tails T-test quand on compare 2 groupes ou de l'ANOVA quand on compare des groupes multiples.

Des analyses bio-informatique en réseau ont aussi été effectuées a l'aide du logiciel Pathway Assist de Stratagène. Ce logiciel permet de relier les gènes significativement entre eux en fonction des données de la littérature et permet ainsi une analyse globale de la signification des données transcriptomiques.

PRESENTATION DES RESULTATS

III – 1 PRESENTATION DES MODELES CELLULAIRES

Nos études *in vitro* ont utilisé les propriétés de sécrétion de prolactine par les cellules pituitaires GH3 et des catécholamines par les cellules neuronales PC12. Nous avons pu ainsi évaluer les effets de la stimulation électrique sur ces capacités sécrétoires.

III – 1 – 1 Les cellules GH3

Les cellules GH3 sécrètent la prolactine de façon constitutive dans le milieu de culture (Tashjian AH Jr et al, 1968). D'autre part, ces cellules ont la propriété de pousser soit en suspension, soit en monocouche adhérente.

Lors de nos premiers essais de stimulation, nous avons utilisé les cellules cultivées en suspension dans un milieu à base de MEM (voir Matériels et Méthodes). Dans ces conditions, les cellules GH3 apparaissent sphériques, regroupées en amas, et polygonales. (Photo. III-1)

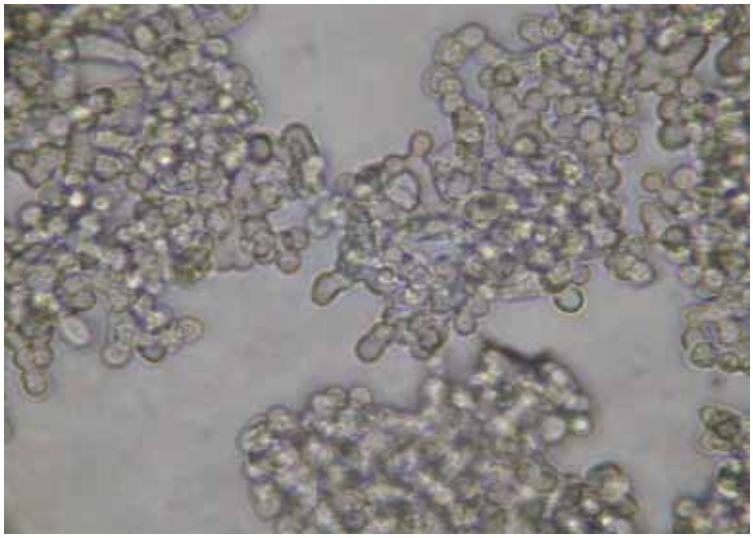


Photo III-1 : *Cellules GH3 en suspension (200x).*

Par la suite, nous avons modifié le milieu de culture (milieu à base de F10), ce qui conduit à l'obtention d'une culture en monocouche adhérente, où les cellules acquièrent une morphologie polygonale (photo III-2).

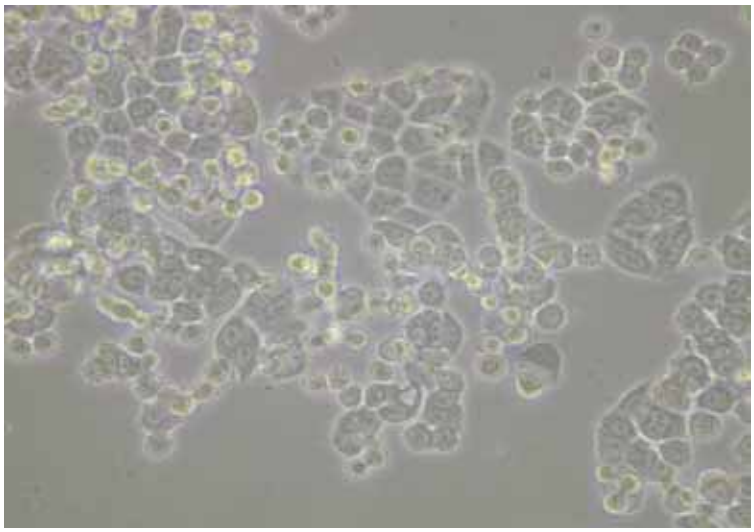


Photo III-2 : *Cellules GH3 en monocouche adhérente (200x)*

III – 1 – 2 Cellules PC12

Les cellules PC12 cultivées en monocouche adhérente poussent en amas cellulaire dans les conditions de culture initiale (photo III-3). Lorsqu'elles sont cultivées en absence de sérum et en présence de 50ng/ml de NGF (nerve growth factor), les PC12 présentent après 1 ou 2 jours de culture une différenciation neuronale se caractérisant par l'apparition de prolongements et un arrêt de la prolifération cellulaire (photo III-4).

Dans le milieu de culture initial, les cellules PC12 synthétisent des neurotransmetteurs catécholaminergiques : dopamine, adrénaline (épinephrine) et noradrénaline (norépinephrine) (Greene et al 1976).

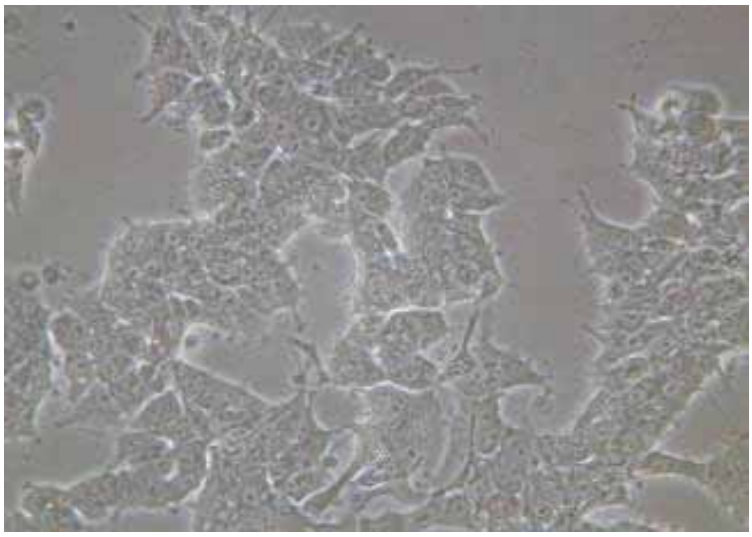


Photo III-3 : *Cellules PC12 dans le milieu de culture classique (200x).*

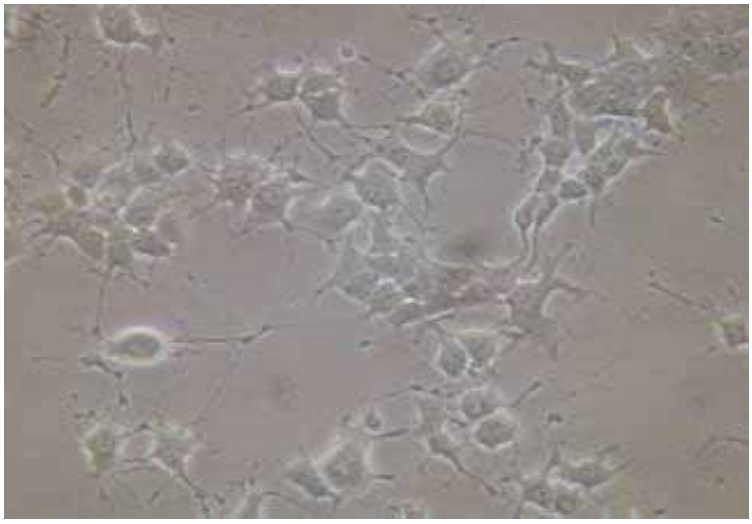


Photo III-4 : *cellules PC12 traitées par NGF (50 ng/ml) (200x).*

III – 2 INVESTIGATION DES EFFETS DE LA STIMULATION ELECTRIQUE SUR LA SECRETION CELLULAIRE

III – 2 – 1 Premiers essais de stimulation électrique *in vitro* sur les cellules endocrines GH3 et INS-1

Nous avons débuté l'étude *in vitro* des effets de la stimulation électrique en utilisant des cuves d'électroporation dans lesquelles sont réparties les cellules en suspension. Nous avons

choisi les 2 lignées cellulaires endocriniennes, GH3 productrices de prolactine et INS-1 productrices d'insuline.

Les résultats obtenus après 3 heures de stimulation à basses et hautes fréquences montrent une inhibition significative de 10 et 20 % de la sécrétion de prolactine par les cellules GH3, respectivement, alors que la diminution de sécrétion d'insuline par les cellules INS1 n'apparaît pas significative (tableau III-1). Les résultats obtenus après 24 heures de stimulation ne montrent pas de différences significatives de production de prolactine ou d'insuline.

De plus les cellules sédimentent, et sont mal adaptées à ce dispositif qui n'est pas dédié à la culture cellulaire. Pour ces raisons, nous avons abandonné ce dispositif, et nous avons décidé de prendre le temps de mettre au point un dispositif de stimulation électrique chronique *in vitro* plus adapté.

cellules	métabolites mesurés	3 heures		24 heures	
		HF	BF	HF	BF
GH3	Prolactine	Inhibition 20%, $p<0.01$	Inhibition 10%, $p<0.01$	NS	NS
INS-1	insuline	NS	NS	NS	NS

Tableau III - 1 : *Effets de la stimulation électrique sur les cellules endocrines avec le système BTX en cuve d'électroporation.*
NS: non significatif. HF: haute fréquence, 130 Hz. BF: basse fréquence, 10 Hz. Le t-test student est utilisé.

III – 2 – 2 Mise en place d'un procédé expérimental de stimulation électrique *in vitro* dédié à la neurostimulation à l'échelle cellulaire

Nous avons mis au point un dispositif permettant de stimuler électriquement les cellules cultivées sur leur support habituel : soit une plaque de 24 puits où les puits sont reliés en série par un pont de fils en titane conducteurs du courant électrique, soit une boîte de Pétri de 10 cm de diamètre dans laquelle sont collés 2 fils en titane qui conduisent l'électricité (voir figure III–1, Cf Matériels et Méthodes, figures II-1, II-2 et photos II-1, II-2).

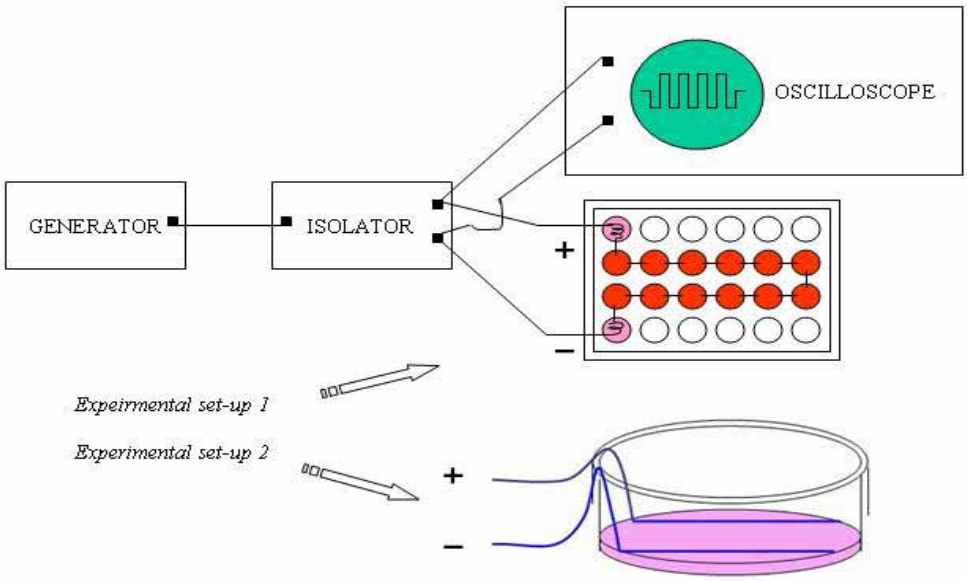


Figure III - 1 *Montage expérimental en série d'une plaque de 24 puits et d'une boite de Pétri pour la stimulation électrique des cellules in vitro.*

Les cellules en culture sont ainsi soumises à une stimulation électrique dont les paramètres sont récapitulés ci-dessous. (Cf Matériels et Méthodes, tableau II-1 et figure II-3).

Condition électrique	Intervalle entre pulses/ Fréquence	Durée d'impulsion	Courant électrique	Durée d'exposition
SHF	7.7 ms/130Hz	60 µs	500 µA	3 ou 24 heures
SBF	100 ms/10Hz	60 µs	500 µA	3 ou 24 heures
Contrôle	–	–	–	3 ou 24 heures

Tableau II - 1 *Paramètres de la stimulation électrique des cellules in vitro dans les montages expérimentaux précédemment décrits.*

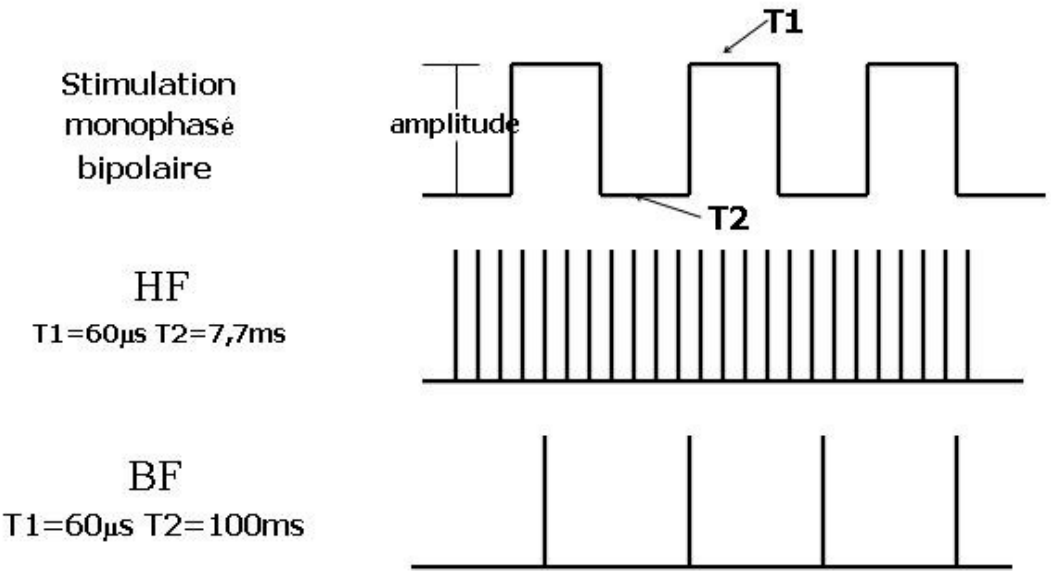


Figure II - 3 *Schéma de la stimulation électrique par onde carrée en conditions de HF et BF.*

Notre montage expérimental a l'avantage de permettre la stimulation d'une grande quantité de cellules, d'être reproductible et d'être facile d'utilisation.

III – 2 – 3 Les effets de la stimulation électrique sur les cellules endocrines GH3 et comparaison de cet effet avec un traitement par la Dopamine

III – 2 – 3 –1 Quantification et viabilité des cellules

Avant d'effectuer le dosage de prolactine secrétée par les cellules GH3, nous avons vérifié l'absence de toxicité de la stimulation électrique sur les cellules.

Nous avons quantifié les cellules traitées ou non sur des périodes allant jusqu'à 24 heures. Aucune diminution du nombre de cellules par rapport au contrôle n'est observée lors

des stimulations électriques à basse ou haute fréquence, ainsi que lors d'un traitement avec 0.01 mM de dopamine (DA) (Figure III-2, Figure III-3).

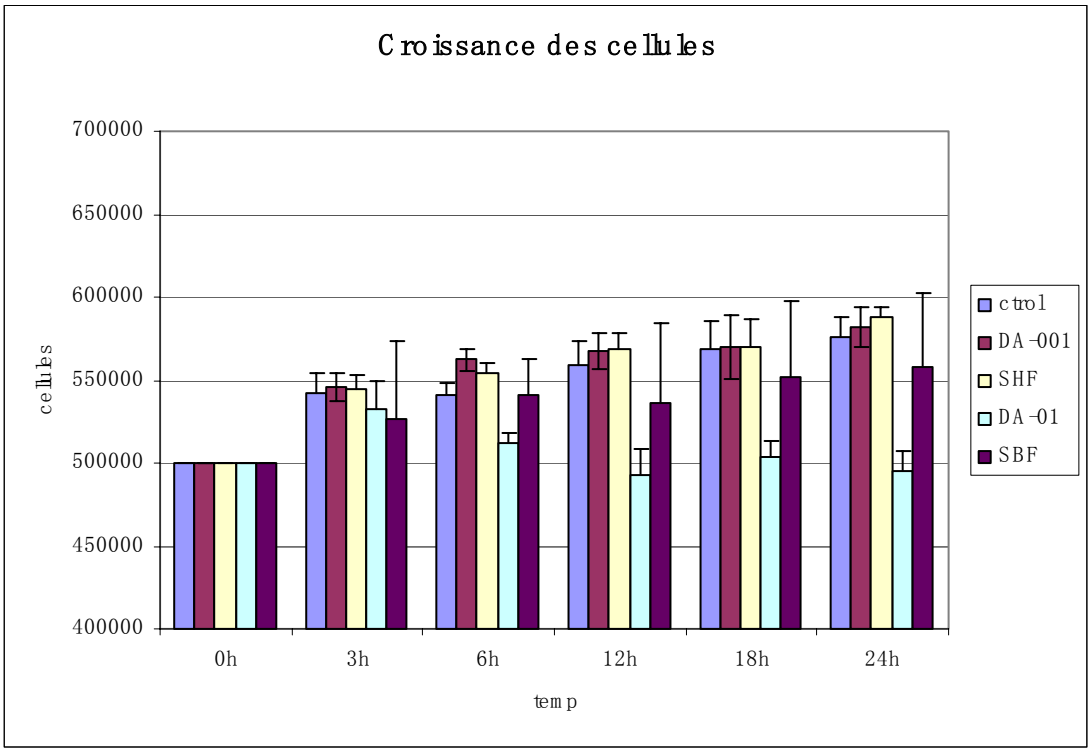


Figure III-2 *Croissance des cellules GH3 dans les différentes conditions.*

En revanche, une cytotoxicité est observée lorsque les cellules sont soumises à un traitement de DA de 0.1 mM pour des temps supérieurs à 3 heures. Cette toxicité apparaît significative pour un temps de traitement de 24 heures.

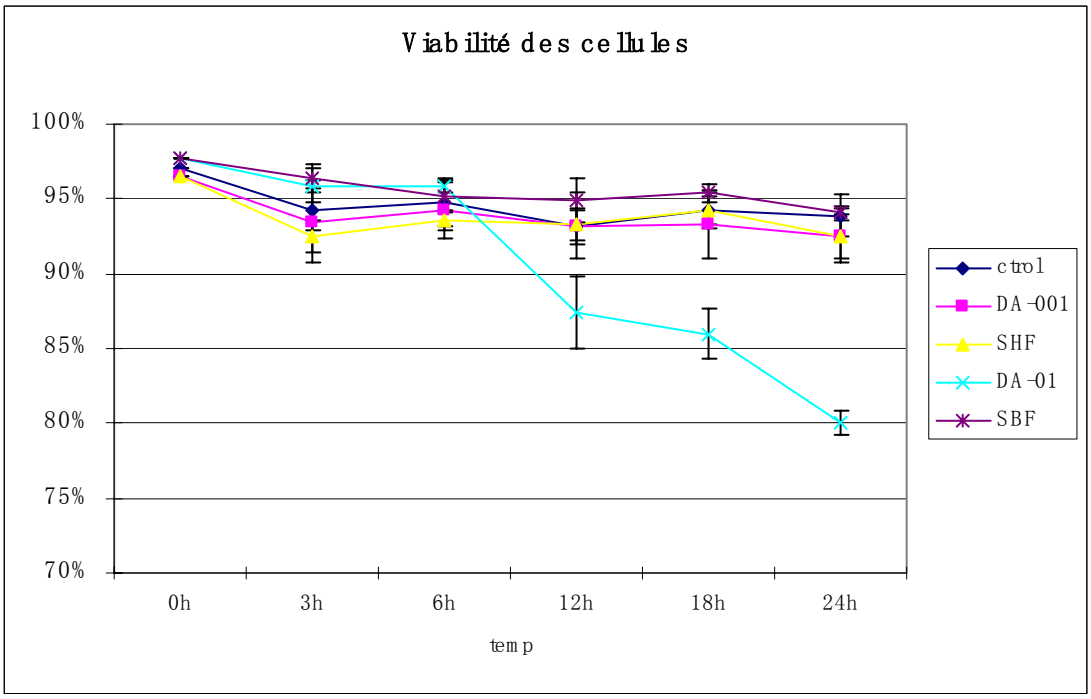


Figure III-3 *Les cellules GH3 sont quantifiées par un dosage WST1 lors des différents traitements*
ctrol-contrôle, SHF-stimulation électrique à haute fréquence, SBF-stimulation électrique à basse fréquence, DA-01- Dopamine 0.1mM, DA-001- Dopamine 0.01mM.

Nous avons confirmé cette toxicité par des comptages cellulaires avec exclusion au bleu trypan qui montrent une diminution d'environ 10 % du nombre de cellules sur une durée du traitement par la DA de 0.1 mM de 24 heures.

Nous avons aussi utilisé le test au MTT pour tester la viabilité des cellules PC12, juste après la stimulation électrique, ainsi qu'après un jour et deux jours. Les résultats nous indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre le contrôle, la SHF et la SBF (voir tableau III-2).

MTT	jour 0			jour 1			jour 2		
3 heures	Ctrol	SHF	SBF	Ctrol	SHF	SBF	Ctrol	SHF	SBF
moyenne	0,293	0,380	0,222	0,730	0,722	0,675	0,903	0,863	0,807
Ecart-type	0,119	0,237	0,036	0,184	0,288	0,122	0,171	0,171	0,156
p		**0,442**	**0,188**		**0,954**	**0,555**		**0,693**	**0,330**

MTT	jour 0			jour 1			jour 2		
24 heures	Ctrol	SHF	SBF	Ctrol	SHF	SBF	Ctrol	SHF	SBF
moyenne	0,478	0,360	0,508	0,863	0,725	0,800	0,930	0,970	0,980
Ecart-type	0,185	0,113	0,155	0,160	0,143	0,102	0,260	0,200	0,245
p		**0,210**	**0,767**		**0,145**	**0,432**		**0,377**	**0,777**

Tableau III - 2 Evaluation *de la toxicité de la stimulation électrique sur les cellules PC12. La toxicité due aux fils de titane et au courant électrique est mesurée par MTT pour les cellules PC12 adhérentes sur la boite. Jour 0: juste après la stimulation électrique; jour 1: 24 heures après la stimulation électrique; jour 2: 48 heures après la stimulation électrique. SHF: la stimulation électrique à haute fréquence; SBF: la stimulation électrique à basse fréquence. T-Test student.*

Le dosage WST1 a été utilisé pour contrôler la viabilité des cellules GH3 juste après la stimulation électrique et un jour, deux jours après la stimulation. Les résultats nous indiquent qu'il n'y a pas de différence significative pour la croissance cellulaire entre le contrôle, la SHF et la SBF (voir tableau III-3).

WST1	jour 0			jour 1			jour 2		
3 heures	Ctrol	SHF	SBF	Ctrol	SHF	SBF	Ctrol	SHF	SBF
moyenne	0,563	0,568	0,612	0,697	0,767	0,785	0,948	0,997	0,960
Ecart-type	0,179	0,204	0,145	0,177	0,106	0,185	0,143	0,126	0,073
p		0,965	0,618		0,425	0,418		0,549	0,862

WST1	jour 0			jour 1			jour 2		
24 heures	Ctrol	SHF	SBF	Ctrol	SHF	SBF	Ctrol	SHF	SBF
moyenne	0.505	0.578	0,552	0.568	0.593	0.680	0.947	1.042	1.098
Ecart-type	0.158	0.164	0.119	0,152	0,070	0,095	0,259	0,070	0,046
p		0,449	0,577		0,723	0,159		0,405	0,188

Tableau III - 3 *Evaluation de la toxicité de la stimulation électrique sur les cellules GH3*
La toxicité due aux fils de titane et au courant électrique est testée pour les cellules GH3 en suspension en suivant la prolifération cellulaire par le dosage WST1. Jour 0: juste après la stimulation électrique; jour 1: 24 heures après la stimulation électrique; jour 2: 48 heures après la stimulation électrique. SHF: la stimulation électrique à haute fréquence; SBF: la stimulation électrique à basse fréquence. T-Test student.

III – 2 – 3 –2 Effets de la stimulation électrique et de la Dopamine sur la sécrétion de Prolactine

Les dosages de prolactine effectués par RIA nous montrent que 3 heures de stimulation à haute fréquence inhibent la sécrétion de prolactine par les cellules GH3 de 14.26 % ± 0.05 ($p < 0.01$), alors que la stimulation à basse fréquence n'a aucun effet.

Nous avons comparé les effets obtenus après stimulation électrique avec ceux induits par la stimulation chimique par la dopamine, connue pour être un inhibiteur de la sécrétion de

prolactine dans ces cellules. Les cellules ont été traitées par la dopamine à des concentrations de 0.01 mM et 0.1mM.

Nous observons que 3 heures de traitement par la dopamine inhibe la sécrétion de prolactine de 9.02 % ± 0.04 (p = 0.033) pour une concentration de 0.01 mM et de 13.27 % ± 0.06 (p = 0.002) pour une concentration de 0.1 mM, respectivement. (Figure III-4 et tableau III-4)

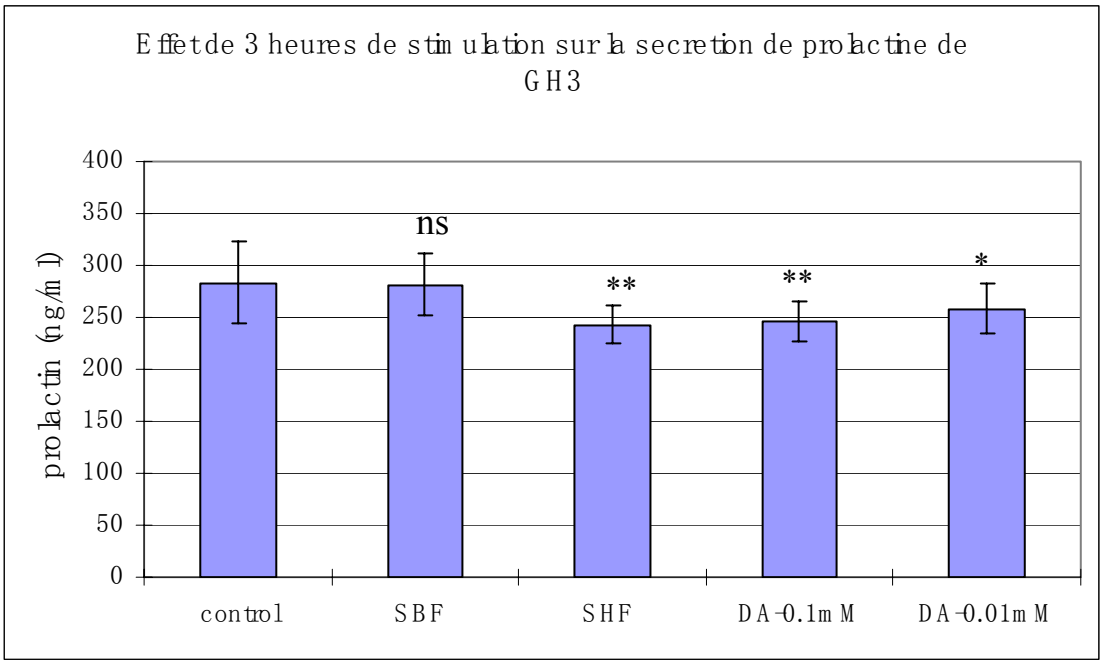


Figure III - 4 S*timulation des cellules GH3 pendant 3 heures.*

Ctrol-contrôle, SHF stimulation à haute fréquence, SBF-stimulation à basse fréquence, DA-dopamine.

	Ctrol-3h	SHF-3h	SBF-3h	DA-0.1mM	DA-0.01mM
moyenne	283.532	243.100	281.305	245.918	257.945
Ecart-type	39.251	17.997	30.206	18.802	23.794
N	11	10	10	11	11
p (ANOVA)		**0.0014**	0.8526	**0.0022**	**0.0327**
1-test/control		14.26%	0.79%	13.27%	9.02%

Tableau III - 4 R*ésultats de la stimulation des cellules GH3 pendant 3 heures.*
Ctrol-contrôle, SHF-la stimulation électrique a haute fréquence, SBF-la stimulation électrique a basse fréquence, DA-dopamine, 3h-3heures. Les tests statistiques utilisent le logiciel ANOVA. Les chiffres en gras indiquent que l'inhibition est significative. ns : non significatif)

Pour des durées de stimulation de 24 heures, la stimulation à haute fréquence inhibe la sécrétion de prolactine de 40.27 % ± 0.05 ($p < 0.001$), mais la stimulation à basse fréquence n'a pas d'effet sur la sécrétion. Un traitement de 24 heures par 0.01 mM de dopamine inhibe la sécrétion de prolactine de 37.57 % ± 0.05 ($p < 0.001$) (figure III-5 et tableau III-5).

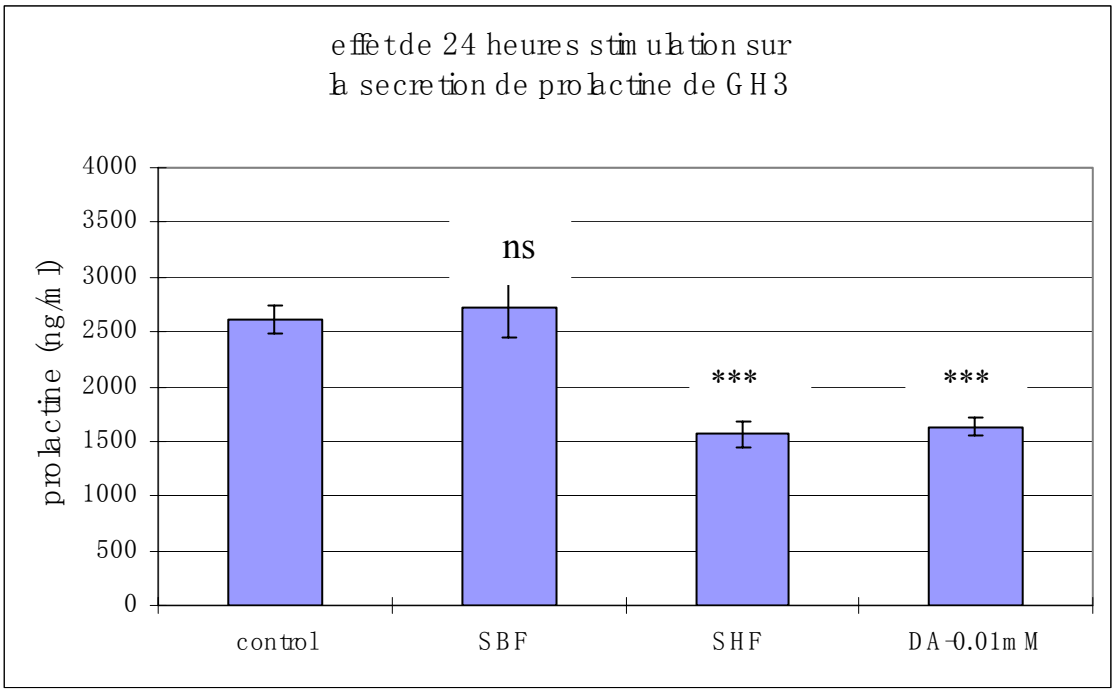


Figure III - 5 *Stimulation des cellules GH3 pendant 24 heures.*
Ctrol-contrôle, SHF-la stimulation électrique à haute fréquence, SBF-la stimulation électrique à basse fréquence, DA-dopamine, 24h-24 heures. ns : non significatif)

	Ctrol-24h	SHF-24h	SBF-24h	DA0.01mM
moyenne	2615.855	1562.515	2715.224	1633.189
Ecart-type	125.886	123.821	259.551	85.909
N	11	11	11	11
p (ANOVA)		**<0.001**	0.1596	**<0.001**
1-test/control		40.27%	-3.80%	37.57%

Tableau III - 5 *Résultats de la stimulation des cellules GH3 pendant 24 heures.*
Les tests statistiques utilisent le logiciel ANOVA. Les chiffres en gras indiquent que l'inhibition est significative.

III – 2 – 4 Les effets de la stimulation électrique sur les cellules neuronales PC12

Après les résultats positifs obtenus sur la lignée GH3 concernant la sécrétion de prolactine, nous avons exploré les effets de la stimulation électrique sur la sécrétion de catécholamines par les cellules neuronales PC12**,** en utilisant le même dispositif de stimulation électrique *in vitro* que celui utilisé pour les GH3.

Toutes les données concernant les catécholamines présentées ci-après ont été analysées par le test statistique ANOVA.

Les effets de 24 heures de stimulation à haute fréquence montrent une inhibition significative de la sécrétion de DA de 32.70 % ($p < 0.05$) et de NA de 27.03 % ($p < 0.05$). En revanche, la diminution de sécrétion de AD n'est pas significative. (Figure III-6 et tableau III-6, III-7, III-8). La stimulation des cellules à basse fréquence ne montre aucun effet sur la sécrétion des différentes catécholamines par rapport aux cellules témoins.

Pour la production de AD et NA, il y a une différence significative entre la SHF et la SBF après 24 heures de stimulation électrique (l'AD, p = 0.0173 entre SHF et SBF; et pour l'NA, p = 0.025 entre SHF et SBF).

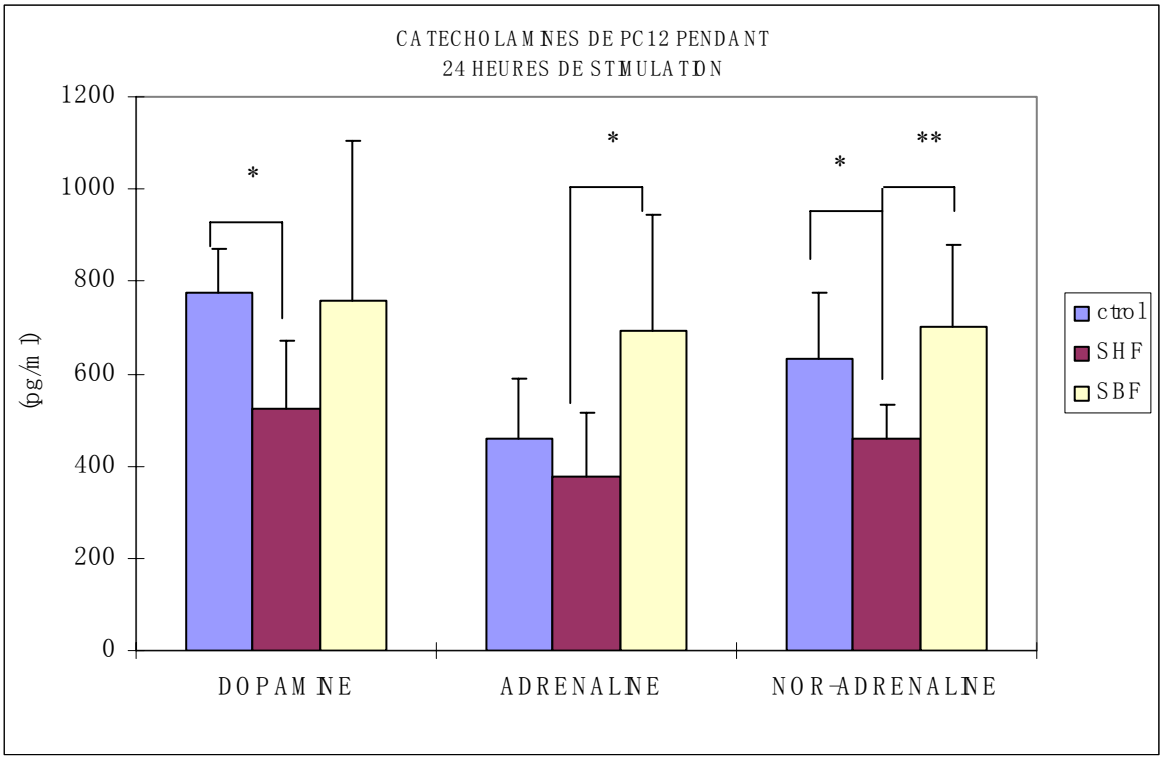


Figure III - 6 *Sécrétion des catécholamines par les cellules PC12 stimulées à haute (SHF) ou basse fréquence (SBF) pendant 24 heures.*

** p < 0.05 ; ** p < 0.01.*

	Dopamine		
	Contrôle	SHF	SBF
Moyenne	776.86	522.80	636.77
Ecart-type	94.63	147.80	247.56
N	5	5	5
p (ANOVA)		**0.035**	0.2373
1-test/control		32.70%	18.03%

Tableau III - 6 *Sécrétion de Dopamine par les cellules stimulées 24 heures.*

	Adrénaline		
	Contrôle	SHF	SBF
moyenne	459.85	376.77	693.84
Ecart-type	128.06	138.82	251.80
N	5	5	5
p (ANOVA)		0.4836	0.0645
1-test/control		18.07%	-50.88%

Tableau III - 7 *Sécrétion d'adrénaline par les cellules PC12 stimulées 24 heures.*
p = 0.4836 (contrôle vs SHF) ns; p = 0.0645 (contrôle vs SBF) ns ; p = 0.0173 (SHF vs SBF) significatif.

	Noradrénaline		
	Controle	SHF	SBF
Moyenne	631.09	460.52	701.09
Ecart-type	145.22	72.99	176.66
N	5	5	5
p (ANOVA)		0.039	0.162
1-test/control		27.03%	-11.09%

Tableau III - 8 *Sécrétion de noradrénaline par les cellules PC12 stimulées 24 heures*
*Test statistique ANOVA : p = **0.0392** (contrôle vs SHF); p = 0.1615 (contrôle vs SBF) ns ; p = **0.0025** (SHF vs SBF)*

En résumé, pour les cellules PC12, 3 heures de SHF et SBF ne donnent pas de différence significative sur la sécrétion de catécholamines par rapport au contrôle ; tandis que

pour les GH3, la sécrétion de PRL est significativement inhibée par la SHF dès 3 heures (Figure III-4 et III-5). En ce qui concerne les catécholamines, seule la sécrétion de NA et de dopamine est significativement abaissée dans la condition SHF par rapport au contrôle et/ou la SBF.

Il résulte des dosages de la prolactine effectués sur les cellules GH3 et des catécholamines sur les cellules PC12 que la stimulation à haute fréquence sur une durée de 24 heures est plus efficaces que sur une durée plus courte de 3 heures.

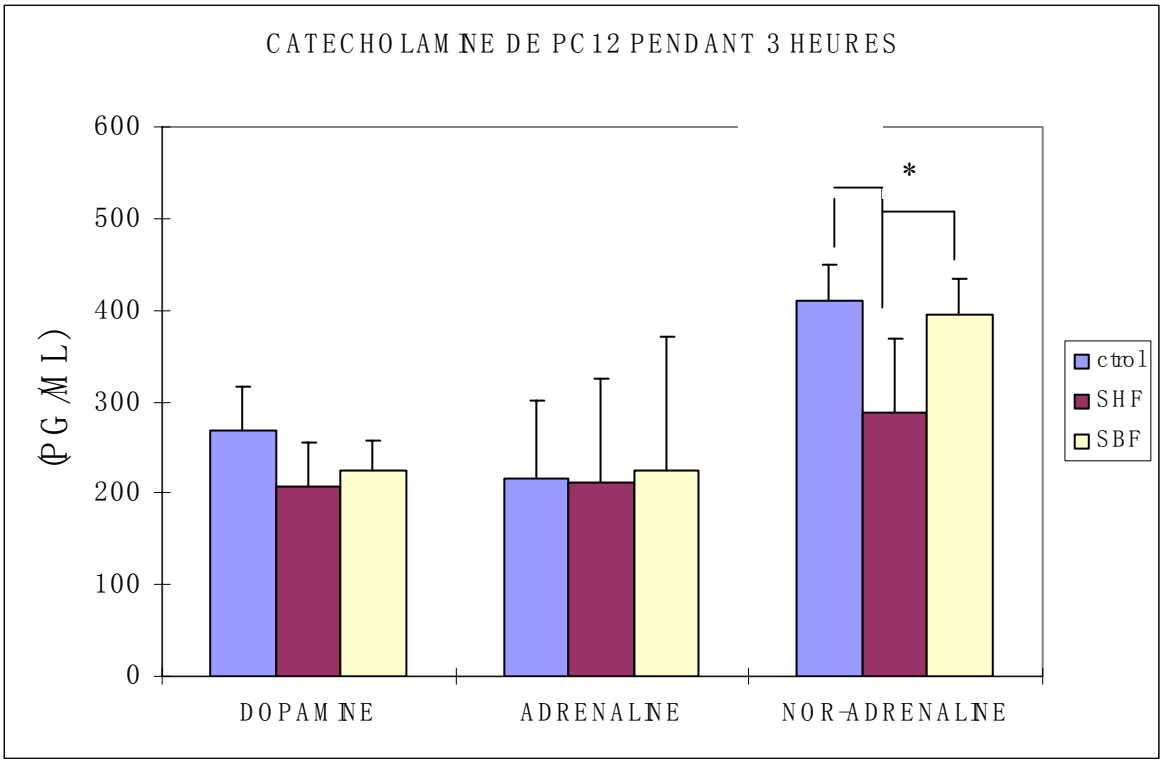


Figure III-7 *La sécrétion des catécholamines par les cellules PC12 stimulées à haute (SHF) ou basse fréquence (SBF) pendant 3 heures.*

** p < 0.05 ; ** p < 0.01.*

Tous les résultats de la stimulation électrique sur les cellules PC12 pendant 3 heures sont indiqués dans les tableaux ci-dessous (tableaux III-9, III-10, III-11)

	Dopamine		
	Control	SHF	SBF
Moyenne	257.50	206.40	225.80
Ecart-type	24.09	49.49	14.32
N	5	5	5
ANOVA		0.061	0.181
1-test/control		19.85%	12.31%

Tableau III - 9 *Sécrétion de Dopamine par les cellules stimulées 3 heures.*
Entre contrôle et SHF : p=0.061 (ns) ; entre contrôle et SBF : p=0.181(ns) ; entre SHF et SBF : p=0.496 (ns).

	Adrénaline		
	Contrôle	SHF	SBF
moyenne	216.60	211.20	225.00
Ecart-type	38.02	51.41	72.97
N	5	5	5
ANOVA		0.942	0.915
1-test/control		2.49%	-3.88%

Tableau III - 10 *Sécrétion d'adrénaline par les cellules stimulées 3 heures.*
Entre contrôle et SHF p=0.942 (ns) ; entre contrôle et SBF p=0.915 (ns) ; entre SHF et SBF p=0.861 (ns)

	Noradrénaline		
	Control	SHF	SBF
Moyenne	409.40	287.75	394.00
Ecart-type	18.20	40.80	20.33
N	5	5	5
ANOVA		**0.009**	0.691
1-test/control		**29.72%**	3.76%

Tableau III - 11 *Sécrétion de noradrénaline par les cellules stimulées 3 heures.*
Entre contrôle et SHF p=0.009 (significatif) ; entre contrôle et SBF p=0.691(ns) ; entre SHF et SBF p=0.023 (significatif).

III – 3 ANALYSE DU TRANSCRIPTOME DES CELLULES SHF PAR DNA MICROARRAY

Pour investiguer des mécanismes potentiels impliqués dans les effets de la stimulation à haute fréquence, notre travail a porté sur l'analyse du transcriptome avec la technique de DNA microarray utilisant des oligonucléotides longs déposés sur filtre nylon avec détection radioactive, en référence au travail du groupe de Bertand Jordan et C Nguyen à Marseille. Des membranes comportant 96 gènes ou 4854 gènes ont été utilisées.

Les membranes à 96 gènes nous ont conduits à identifier 17 gènes présentant une différence significative entre les cellules SHF et SBF (voir figure III-8). Cette membrane test comportait des oligonucléotides synthétisés par la société MWG que nous n'avons pas retenu pour passer à la phase plus pangénomique. Pour des raisons de contrôles qualité, nous avons préféré retenir les oligonucléotides de la société Sigma comprenant un set de 4854 oligonucléotides longs. Les analyses de type « vecteur » ont bien validé la qualité de la membrane.

Sur les 4854 gènes sondes, 39 gènes présentaient des niveaux d'expression au moins 2 fois plus élevés dans le contrôle que dans la condition SHF. Inversement, 15 gènes étaient 2 fois moins exprimés dans les cellules contrôles par rapport aux SHF (voir tableau III-12). Nous avons trouvé 20 gènes détectés uniquement dans la condition contrôle, et 13 gènes uniquement dans la condition de SHF (voir tableau III-13). Pour ces gènes la présence d'un zéro pour les niveau d'expression empêche la réalisation d'un ratio.

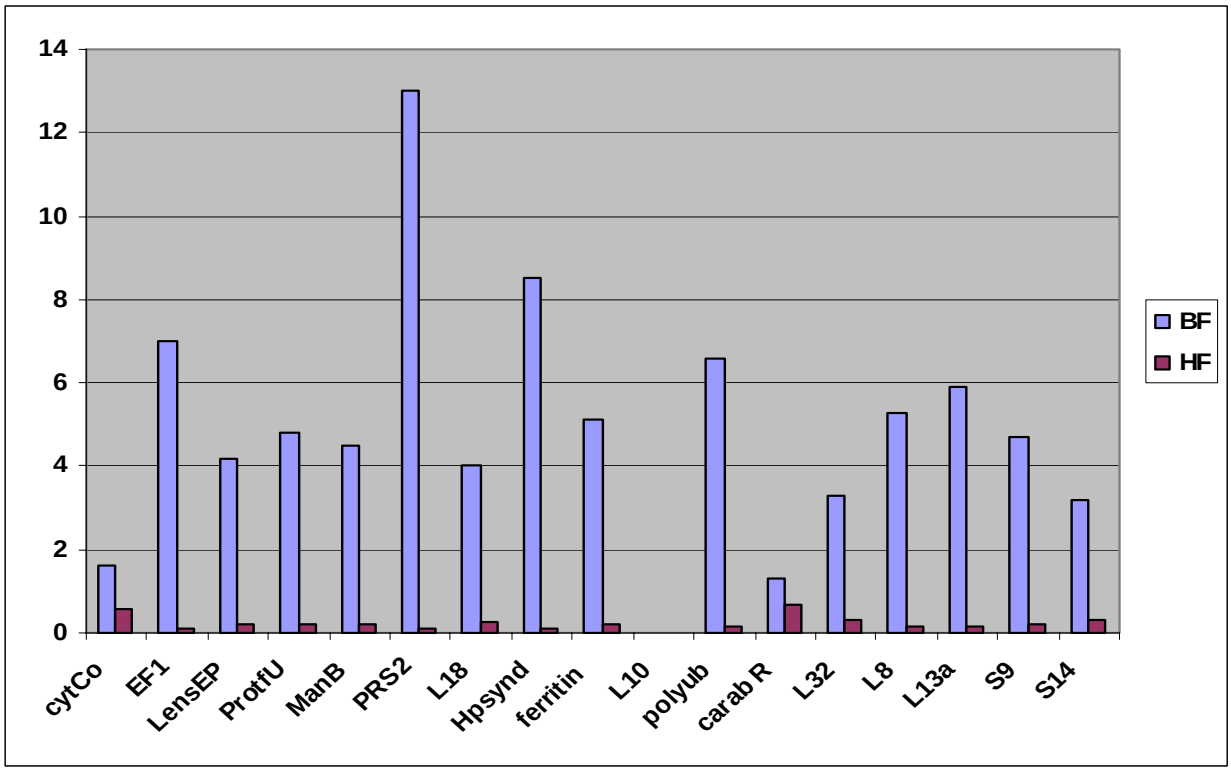


Figure III - 8 *Mesure de l'expression des gènes par DNA microarray sur la membrane de 96 gènes*

Profil comparatif des échantillons traitées basse fréquence (BF) et haute fréquence (HF). L'axe des abscisses (X) indique les gènes. L'axe des ordonnées (Y) indique le niveau d'expression en unité arbitraire. Ces résultats sont obtenus sur la membrane de 96 gènes.

Ces tableaux (tableau III-12 et III-13) nous montrent : en vert les gènes exprimés 2 fois plus dans la condition contrôle que la condition SHF (39/54). En rouge les gènes exprimés 2 fois moins dans la condition contrôle (15/54).

En vert barré les gènes exprimés uniquement dans la condition contrôle (20/33). En rouge barré les gènes exprimés uniquement dans la condition SHF (13/33).

Plusieurs gènes détectés modulés à l'aide de la première membrane, le sont aussi dans la membrane à 4854 gènes (EEF1, cytochrome C, en particulier).

	nom		ctrl/stim	ctrl-stim
Rn.54537	Rattus norvegicus Nucleoplasmin-related protein (Nuclear protein B23 (Npm1), mRNA	transcription regulation [0006355]	4.80	6.74
Rn.555	Rattus norvegicus leukemia-associated gene (Lap18), mRNA	intracellular signaling cascade [0007242]	4.78	5.26
	Rattus sp. DNA binding protein (URE-B1) mRNA, complete cds	proteolysis and peptidolysis [0006508]	4.31	5.33
Rn.2891	Rattus norvegicus mRNA for 26S proteasome p112 subunit, partial	biological_process unknown [0000004]	4.01	5.02
Rn.11854	Rattus norvegicus mRNA for dC-stretch binding protein (CSBP), complete cds	RNA processing [0006396]	3.89	4.85
Rn.25733	Rattus norvegicus Integrin, beta 1 (Itgb1), mRNA	cell adhesion [0007155]	3.67	4.54
Rn.29778	Rattus norvegicus Microvascular endothelial differentiation gene 1 (Mdg1), mRNA	protein folding [0006457]	3.65	2.10
Rn.859	Rattus norvegicus Ras homolog enriched in brain (Rheb), mRNA	signal transduction [0007165]	3.34	3.58
	Rattus sp. mRNA for astrocytic phosphoprotein (PEA-15 gene)	intracellular signaling cascade [0007242]	3.30	2.82
Rn.12516	Rattus norvegicus substrate binding subunit of type II 5'-deiodinase D2p29 mRNA, complete cds	cell adhesion [0007155]	3.06	2.11
Rn.10928	Rattus norvegicus growth accentuating protein 43 (Gap43), mRNA	cell growth and/or maintenance [0008151]	3.05	3.89
	Rat mRNA for trypsin V b-form	proteolysis and peptidolysis [0006508]	2.94	2.24
Rn.37476	Rattus norvegicus stromal cell derived factor receptor 1 (Sdfr1), mRNA	cell surface receptor linked signal transduction [0007166]	2.88	2.25
	Rattus norvegicus mRNA for RhoA, partial cds	cell growth and/or maintenance [0008151]	2.84	3.03
Rn.10989	Rat X-chromosome linked phosphoglycerate kinase mRNA, complete cds	glycolysis [0006096]	2.78	5.46
Rn.43930	Rattus norvegicus Nopp140 associated protein (NAP65) mRNA, complete cds	transcription [0006350]	2.71	2.55
Rn.3672	Rat 70 kd heat-shock-like protein mRNA, complete cds	spermatogenesis [0007283]	2.69	19.50
Rn.35870	Rattus norvegicus heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (Hnrpa1), mRNA	mRNA processing [0006397]	2.56	4.72
RN.2989	{clone E536, estrogen induced gene} [rats, Sprague-Dawley, hypothalamus, mRNA Partial, 198 nt]	biological_process unknown [0000004]	2.50	13.64
Rn.7735	Rattus norvegicus Nucleolin (Ncl), mRNA	biological_process unknown [0000004]	2.50	3.63
Rn.10182	Rattus norvegicus Chymase 1, mast cell (Cma1), mRNA	proteolysis and peptidolysis [0006508]	2.47	2.90
	R.norvegicus mRNA for PKC-zeta-interacting protein	biological_process unknown [0000004]	2.44	4.41
Rn.11148	R.norvegicus mRNA from Leydig cell hypercalcemic tumour H-500	TGFbeta receptor signaling pathway [0007179]	2.33	3.96
RN.3319	Rattus norvegicus guanine nucleotide binding protein gamma 10 subunit mRNA, partial cds	signal transduction [0007165]	2.31	10.05
	Rattus norvegicus clone UV36Sp6 ultraviolet B radiation-activated UV36 mRNA, partial sequence	biological_process unknown [0000004]	2.30	2.84
Rn.3594	Rattus norvegicus Lysophospholipase (Pla1a), mRNA	ubiquitin-dependent protein degradation [0006511]	2.29	2.98
Rn.54869	Rattus norvegicus mRNA for hnRNP protein, partial	RNA processing [0006396]	2.28	4.09
Rn.33965	Rattus norvegicus Caldesmon 1 (Cald1), mRNA	muscle development [0007517]	2.26	3.28
	Rattus norvegicus F344 clone pCRJT4 partial mRNA sequence	biological_process unknown [0000004]	2.23	9.21
Rn.9195	Rattus norvegicus fumarylacetoacetate hydrolase (Fah), mRNA	tyrosine catabolism [0006572]	2.21	2.68
Rn.4300	R.norvegicus mRNA for a fusion protein of ubiquitin and ribosomal protein L40	polyubiquitylation [0000209]	2.20	3.09
Rn.965	Rat elongation factor-1 alpha (ef-1) mRNA, complete cds	protein synthesis elongation [0006414]	2.12	13.97
Rn.48724	Rattus norvegicus p34 mRNA, complete cds	biological_process unknown [0000004]	2.10	2.67
Rn.40123	Rattus norvegicus eukaryotic initiation factor 5 (eIF-5) (Eif5), mRNA	translational regulation, initiation [0006446]	2.08	3.48
Rn.1904	Rattus norvegicus Adenylyl cyclase 4 (Adcy4), mRNA	ion transport [0006811]	2.06	2.52
Rn.1294	Rattus norvegicus Cathepsin L (Ctsl), mRNA	proteolysis and peptidolysis [0006508]	2.04	1.92

Rn.2274	Rattus norvegicus Ubiquitin conjugating enzyme E2I (homologous to yeast UBC9) (Ube2i), mRNA	ubiquitin-dependent protein degradation [0006511]	2.04	2.26
Rn.10364	Rat pre-mature mRNA for calpain, complete cds	proteolysis and peptidolysis [0006508]	2.02	2.58
Rn.864	Rattus norvegicus mRNA for ribonucleoprotein F, complete cds	RNA processing [0006396]	2.01	2.85
Rn.36966	Rat hemoglobin beta-chain mRNA, 3' end	transport [0006810]	0.15	-8.25
	Rattus norvegicus developmentally-regulated cardiac factor (DRCF-5) mRNA, 3' end	biological_process unknown [0000004]	0.24	-3.55
Rn.55109	Rattus norvegicus 5HT3 receptor mRNA, complete cds	transport [0006810]	0.30	-3.67
RN.1914	Rattus norvegicus DD6A4-3 mRNA, partial sequence	biological_process unknown [0000004]	0.30	-7.45
Rn.786	Rattus norvegicus orphan receptor mRNA, complete cds	transcription regulation [0006355]	0.30	-3.32
Rn.14547	Rattus norvegicus ZOG mRNA, complete cds	developmental processes [0007275]	0.34	-5.54
RN.6292	Rattus norvegicus DD6A4-2(5) mRNA, partial sequence	biological_process unknown [0000004]	0.35	-5.21
Rn.37758	Rattus norvegicus putative protein phosphatase 1 nuclear targeting subunit (PNUTS) mRNA, complete cds	protein-nucleus import [0006606]	0.42	-12.81
Rn.53793	Rattus norvegicus tandem pore domain potassium channel THIK-1 (Kcnk13) mRNA, complete cds	potassium transport [0006813]	0.42	-3.40
Rn.6479	Rattus norvegicus interleukin-6-dependent binding protein (IL-6DBP) mRNA, complete cds	transcription regulation [0006355]	0.44	-4.56
Rn.10369	Rattus norvegicus GABA-alpha receptor gamma-3 subunit mRNA, complete cds	ion transport [0006811]	0.45	-96.95
Rn.9841	Rattus norvegicus Proline-rich protein, salivary (Prpb), mRNA	biological_process unknown [0000004]	0.47	-31.68
Rn.22471	Rattus norvegicus mRNA for Sulfotransferase K2	steroid metabolism [0008202]	0.47	-40.78
Rn.33965	Rattus norvegicus submaxillary gland alpha-2u globulin mRNA, complete cds	transport [0006810]	0.49	-1.68
Rn.48841	Rat calmodulin mRNA, complete cds, clone prCM79	developmental processes [0007275]	0.50	-2.78

Tableau III -12 *Gènes exprimés dans les conditions contrôle et SHF sur la membrane de 4859 gènes. En vert : les gènes exprimés 2 fois plus dans la condition contrôle que dans la condition SHF. En rouge : les gènes exprimés 2 fois moins dans la condition contrôle que dans la condition SHF.*

	Nom		ctrl/stim	ctrl-stim
Rn.55007	Rat mitochondrial ATP synthase beta subunit mRNA, complete cds	energy pathways [0006091]	65.61	4.65
	GABAA receptor alpha 4 subunit [rats, mRNA, 1843 nt]	ion transport [0006811]	30.57	3.08
Rn.26586	Rattus norvegicus unknown mRNA	biological_process unknown [0000004]	16.24	4.14
Rn.31808	Rattus norvegicus antisense basic fibroblast growth factor GFG mRNA, complete cds	protein synthesis elongation [0006414]	12.96	9.62
RN.36966	II beta-globin=II beta-globin {5' region} [rats, mRNA Partial, 1428 nt]	transport [0006810]	12.78	6.66
Rn.2423	Rattus norvegicus activating transcription factor ATF-4 mRNA, complete cds	transcription regulation [0006355]	12.33	3.92
Rn.11065	Rattus norvegicus regulator of G-protein signaling 4 (Rgs4), mRNA	regulation of G-protein coupled receptor protein signaling pathway [0008277]	7.08	1.23
Rn.1617	Rattus norvegicus proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 2 (Psma2), mRNA	ubiquitin-dependent protein degradation [0006511]	6.08	2.84
Rn.30066	Rattus norvegicus calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit (Cacna1d), mRNA	ion transport [0006811]	5.84	3.22
Rn.12262	Rattus norvegicus mRNA for phocein protein	proteolysis and peptidolysis [0006508]	5.69	4.15
	Rattus norvegicus B2 bradykinin receptor mRNA, complete cds	circulation [0008015]	5.33	1.46
	Rattus norvegicus clone UV123T7 ultraviolet B radiation-activated UV123 mRNA, partial sequence	biological_process unknown [0000004]	4.38	3.30
	Rattus sp. calcium-regulated heat stable protein CRHSP-24 mRNA, complete cds	intracellular signaling cascade [0007242]	4.17	1.37
Rn.3562	Rat unr mRNA for unr protein with unknown function	transcription regulation [0006355]	3.96	2.59
Rn.3236	Rattus norvegicus intrinsic factor-B12 receptor precursor (CUBILIN) mRNA, complete cds	physiological processes [0007582]	3.86	1.71
Rn.31766	Rattus norvegicus lin-7-Bb mRNA, complete cds	protein complex assembly [0006461]	3.75	2.81
Rn.25754	Rattus norvegicus matrix metalloproteinase inhibitor (TIMP-1)	developmental processes [0007275]	3.75	1.95

	mRNA, complete cds			
	Rattus sp. S100 alpha mRNA, partial cds	signal transduction [0007165]	**3.51**	1.56
Rn.54911	Rattus norvegicus Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapd), mRNA	glycolysis [0006096]	**3.03**	1.65
Rn.5996	Rat elongation factor SIII p15 subunit mRNA, complete cds	transcription regulation, from Pol II promoter [0006357]	**2.81**	1.67
Rn.11276	Rattus norvegicus Calcium channel subunit alpha 2 delta (dihydropyridine - sensitive L-type) (Cacna2), mRNA	ion transport [0006811]	**0.00**	-2.88
	Rat small cytoplasmic RNA (alpha-1-RNA), complete cds	biological_process unknown [0000004]	**0.01**	-6.10
Rn.10317	R.norvegicus mRNA for cytosolic resiniferatoxin-binding protein	biological_process unknown [0000004]	**0.02**	-3.13
Rn.10020	Rattus norvegicus Aquaporin 4 (Aqp4), mRNA	water transport [0006833]	**0.03**	-9.23
	nicotinic receptor alpha 7 subunit [rats, brain, mRNA, 3030 nt]	transport [0006810]	**0.04**	-14.36
Rn.3790	Rattus norvegicus FAT mRNA, complete cds	transport [0006810]	**0.09**	-4.46
RN.7464	Narp=neuronal activity-regulated pentraxin [rats, hippocampus, mRNA, 2562 nt]	transport [0006810]	**0.15**	-2.11
Rn.8432	Rattus norvegicus corneal wound healing related protein mRNA, complete cds	viral replication [0008166]	**0.16**	-3.04
Rn.54911	Rattus norvegicus Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapd), mRNA	glycolysis [0006096]	**0.17**	-2.43
Rn.42882	Rattus norvegicus neurexophilin 4 (Nph4) mRNA, complete cds	transcription regulation [0006355]	**0.19**	-1.77
Rn.11180	Rattus norvegicus adenosine receptor mRNA, complete cds	sensory perception [0007600]	**0.23**	-1.87
Rn.3421	Rat mRNA for adenylate kinase 2, complete cds	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism [0006139]	**0.30**	-1.59
Rn.11399	Rattus norvegicus steroidogenic acute regulatory protein (StAR) mRNA, complete cds	C21-steroid hormone biosynthesis [0006700]	**0.43**	-1.16

Tableau III -13 *Gènes exprimés dans les conditions contrôle et SHF sur la membrane de 4859 gènes. En vert barré : les gènes n'étant exprimés que dans la condition contrôle. En rouge barré : les gènes n'étant exprimés que dans la condition SHF.*

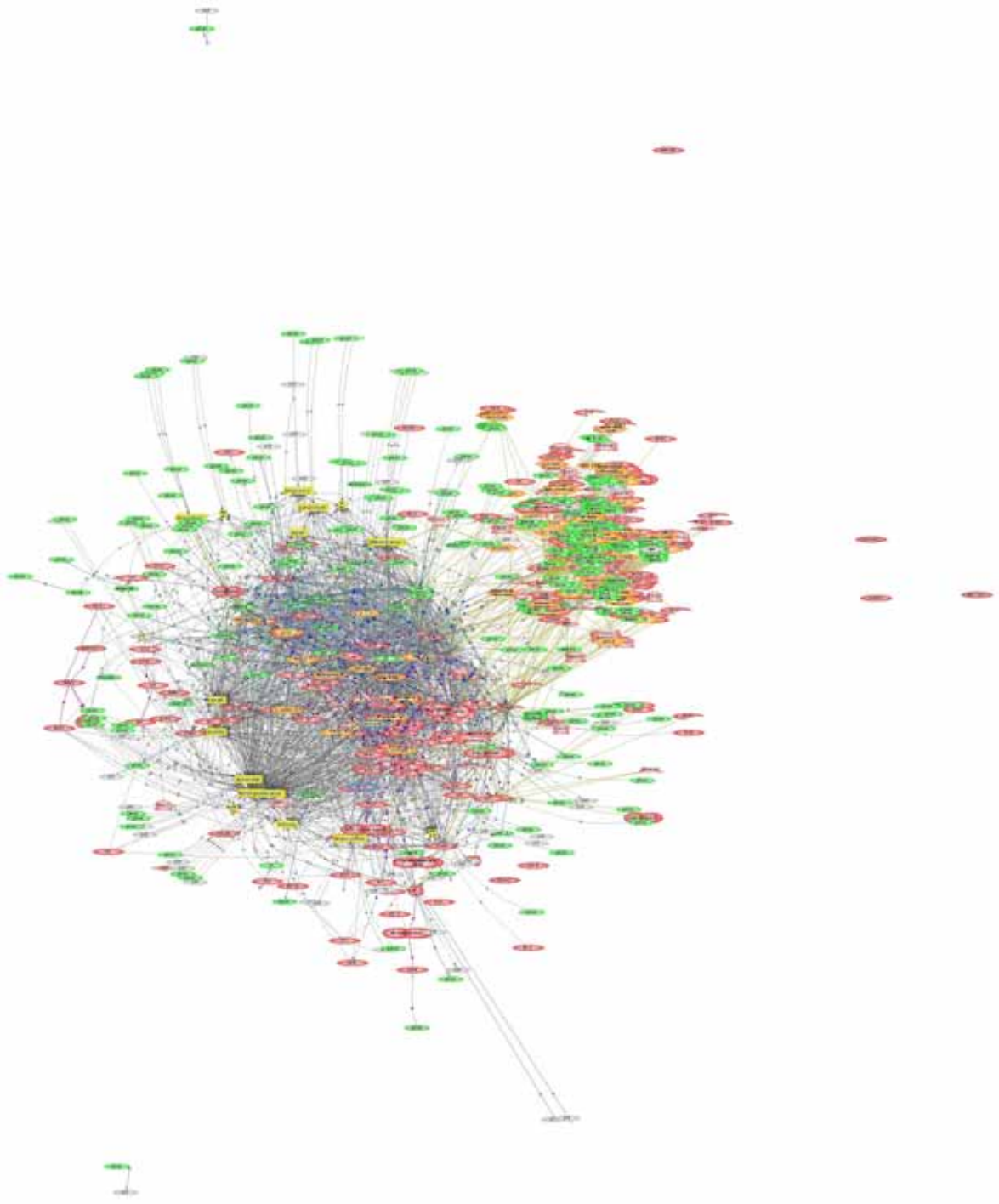


Figure III - 9 : *Analyse en réseau à l'aide du logiciel « Pathway assist » de tous les gènes significativement modulés par la stimulation à haute fréquence.*

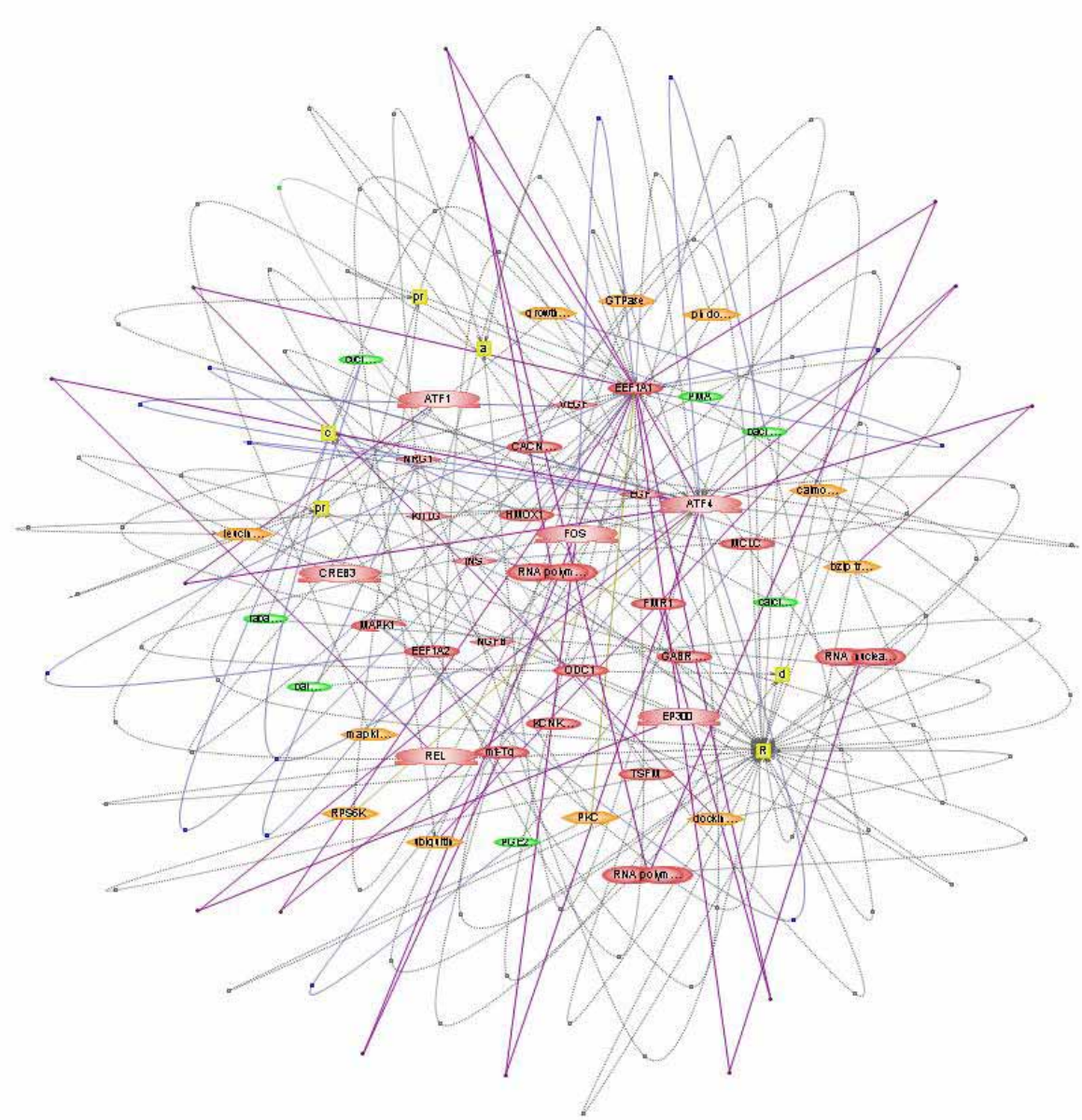


Figure III - 10: *Les réseaux obtenus pour les items « activité neuronale et synthèse protéique et calcium ».*

L'utilisation du logiciel « Pathway assist » donne des résultats trop complexes quand aucun filtrage des données n'est effectué (figure III-9). Pour simplifier et focaliser sur les questions biologiques principales nous avons focalisée l'interrogation de la base de données sur les mots clé : activité neuronale, synthèse protéique et calcium (figure III-10).

III – 4 LES EFFETS DE LA SHF : CONFIRMATION DE L'IMPACT SUR INHIBITION DE LA SYNTHESE PROTEIQUE

Afin de confirmer l'impact sur la synthèse protéique suggéré par les réseaux transcriptomique, nous avons étudié la synthèse protéique globale des cellules en utilisant à la fois des techniques classiques comme l'incorporation de méthionine marquée et le SELDI-TOF.

III – 4 – 1 Mise en évidence par la technique d'incorporation de méthionine

La technique d'incorporation de la méthionine marquée au ^{35}S est utilisée pour analyser la synthèse protéique des cellules traitées par SHF. Deux expériences indépendantes réalisées sur chacune des lignées cellulaires (GH3 et PC12), montrent une inhibition significative de l'incorporation de méthionine dans les cellules traitées, et cela aussi bien après 3 heures que 24 heures de stimulation. Les protéines sont détectées après électrophorèse (SDS-PAGE) de l'extrait cellulaire et après analyse quantitative à l'aide d'un détecteur à haute sensibilité (Phospho-Imager).

Par comparaison avec les bandes standards de masse moléculaire (Full range Rainbow^{TM} Amersham, UK), les protéines détectées présentent des masses comprises entres 20 kDa et 75 kDa.

Les quantités de radioactivité incorporées, mesurées pour la même surface de gel, ont été comparées entre les cellules témoins et stimulées. Les effets du traitement SHF par rapport au groupe contrôle, pour les cellules GH3 pendant 3 heures, GH3 pendant 24 heures, PC12 pendant 3 heures et PC12 pendant 24 heures, sont présentés par les figures III-12, III-14, III-16 et III-18 respectivement ; ainsi que par les profils III-11, III-13, III-15 et III-17.

Les figures III-11, III-13, III-15, et III-17 montrent les profils protéiques obtenus après électrophorèse SDS-PAGE et les figures III-12, III-14, III-16 et III-18 montrent les comparaisons des quantités de radioactivité par unité de surface, entre le groupe contrôle et le groupe SHF.

Le t-Test de student a été utilisé pour les analyses statistiques des résultats.

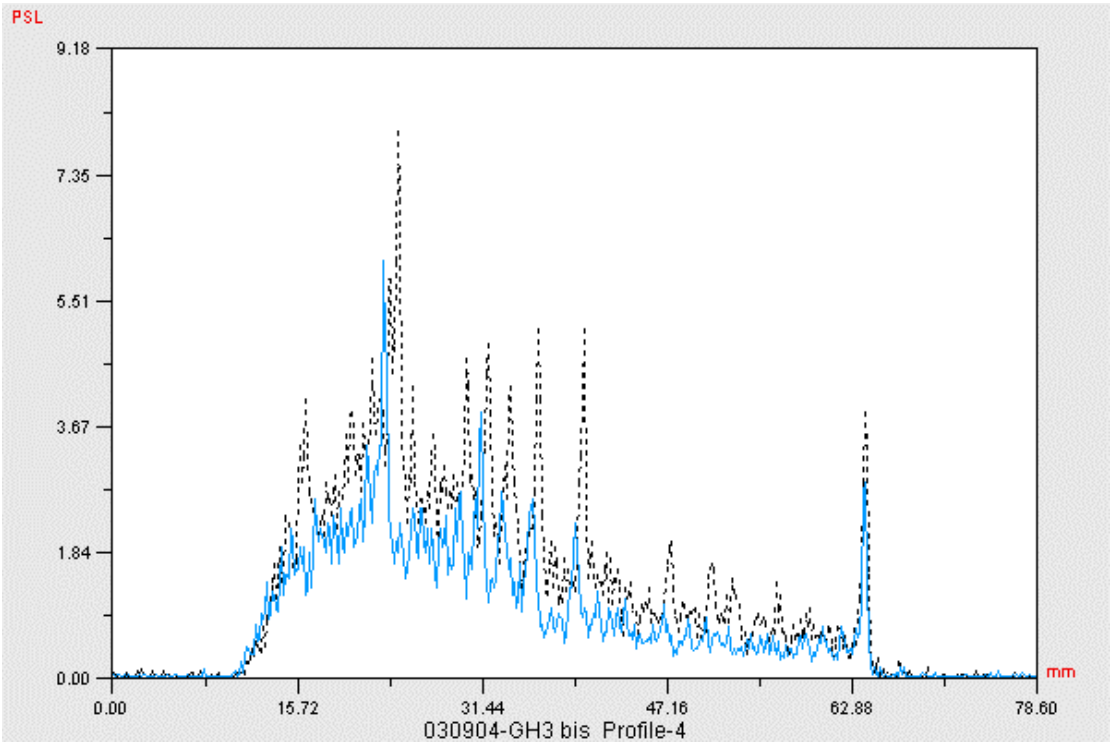


Figure III -11 *Profils de migration protéique obtenue pour les GH3 après 3 heures d'expérience. En noir - contrôle ; en bleu - SHF 3 heures.*

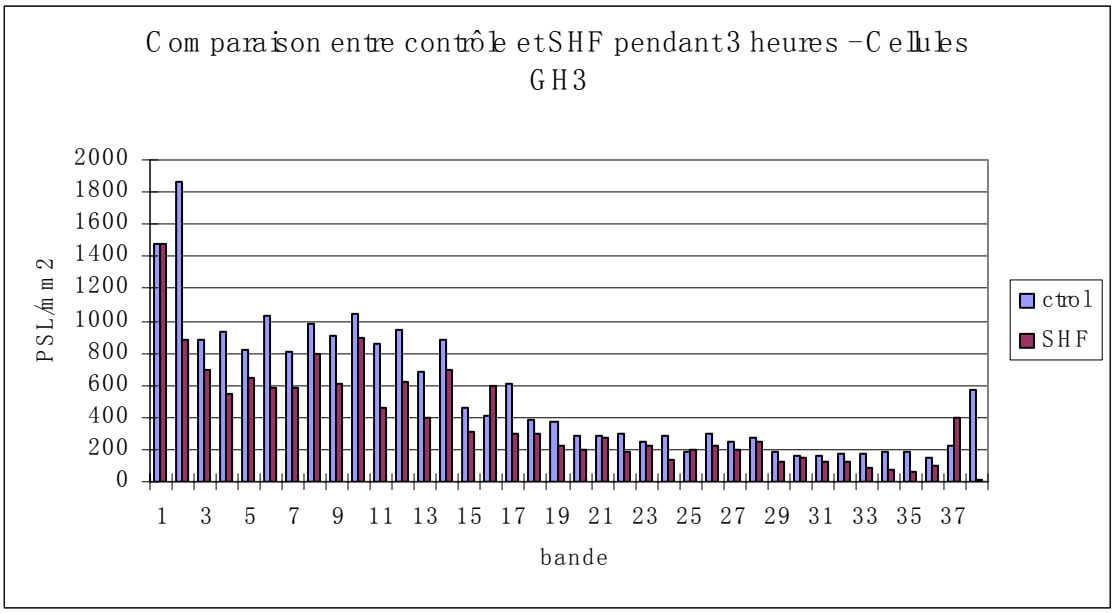


Figure III -12 *Comparaison de la quantité de radioactivité en PSL (unités arbitraires) entre les groupes contrôles et SHF.*

Pour les 4 expériences réalisées : p=0.044 ; <0.001 ; 0.055 ; <0.001. Les inhibitions respectives sont 25.85% ; 22.16% ; 26.85% ; 39.69%. (moyenne : 28.64%, écartype : 7.64%)

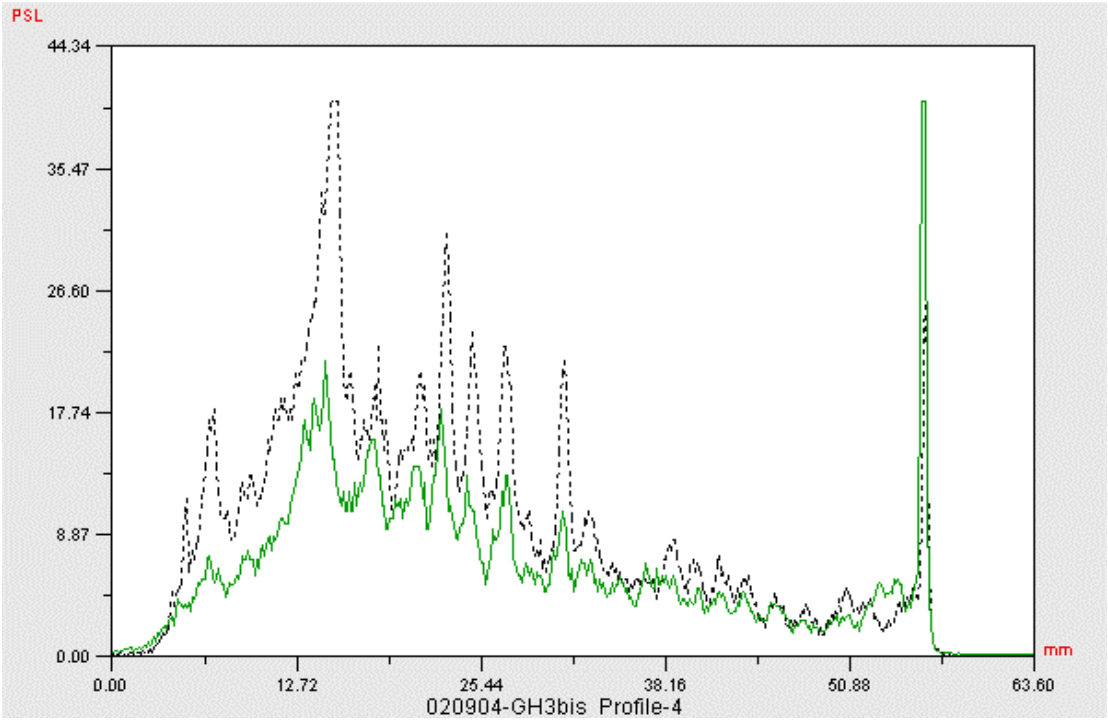


Figure III - 13 *Profils de migration protéique obtenue pour les GH3 après 24 heures d'expérience. En noir - contrôle ; en vert - SHF 24 heures.*

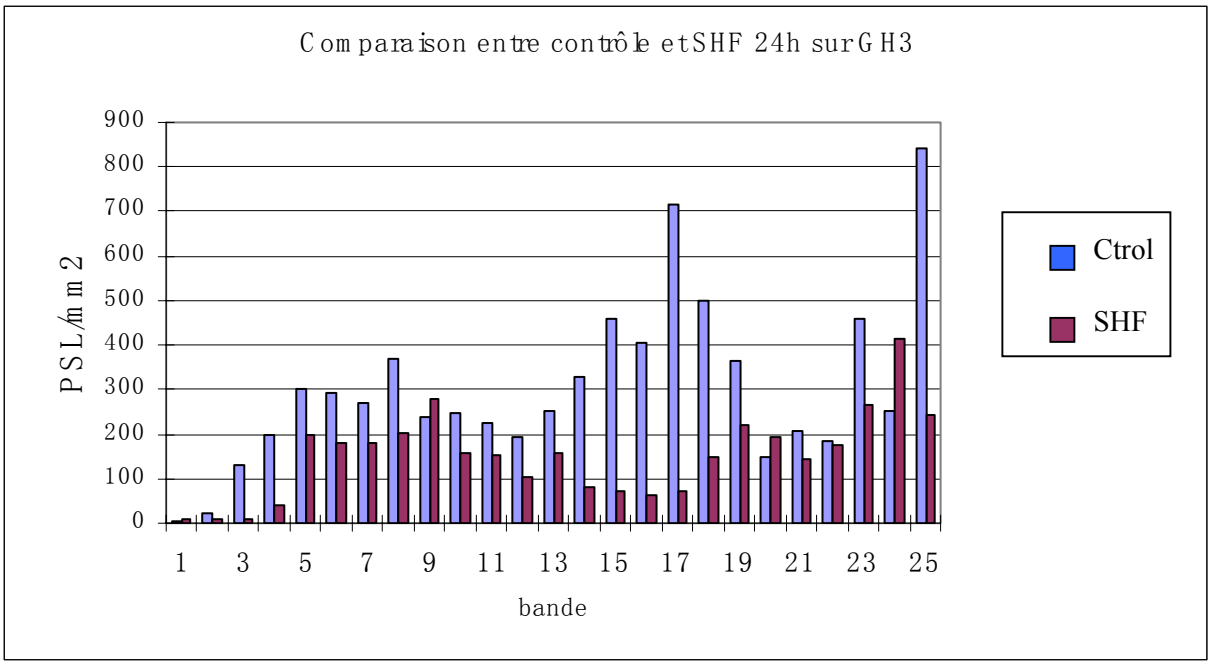


Figure III - 14 *Comparaison de la quantité de radioactivité entre le groupe contrôle et SHF. Pour les 4 expériences réalisées : p <0.001 ; <0.001 ; =0.001 ; =0.001. Les inhibitions respectives sont 58.35% ; 52.58% ; 40.94% ; 34.27%. (moyenne : 46.53%, écart-type : 10.92%).*

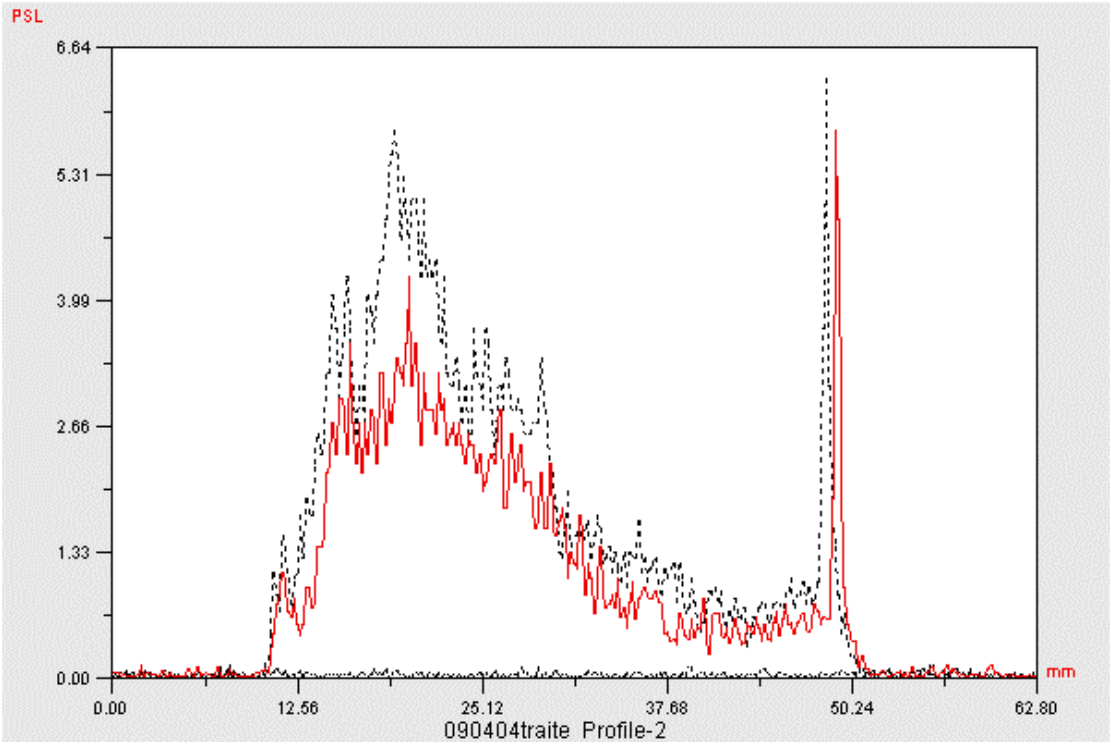


Figure III - 15 *Profils de migration protéique obtenue après 3 heures de la SHF sur les PC12. En noir - contrôle ; en rouge - SHF 3 heures.*

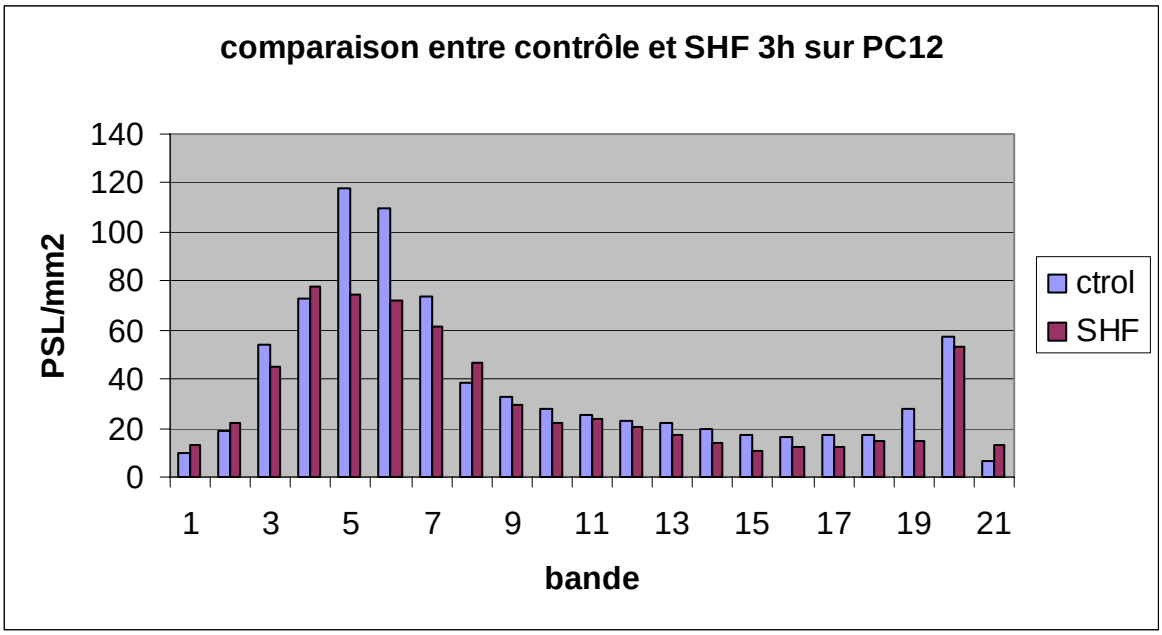


Figure III - 16 *Comparaison entre les groupes contrôle et SHF sur PC12 3heures. Sur les 2 expériences : p<0.001 ; p=0.01. Leurs inhibitions sont 16.73% ; 12.59%.*

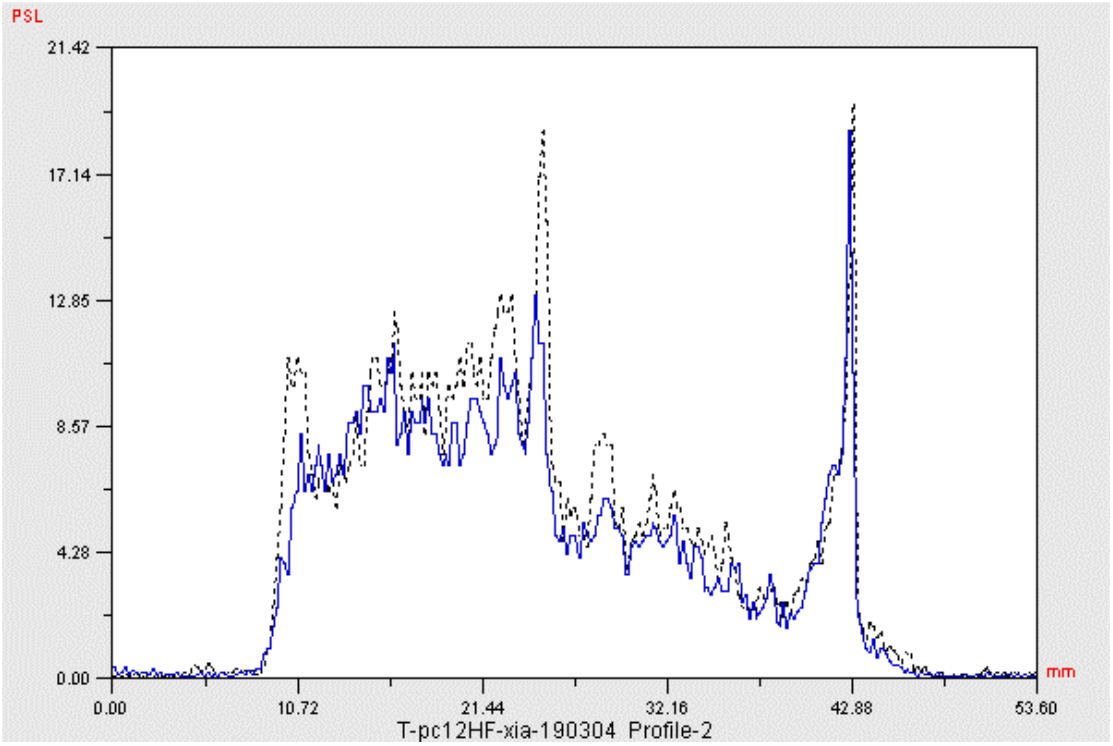


Figure III - 17 *Profils de migration protéique obtenue après 24 heures de SHF sur PC12. En noir - contrôle ; en bleu - SHF 24 heures.*

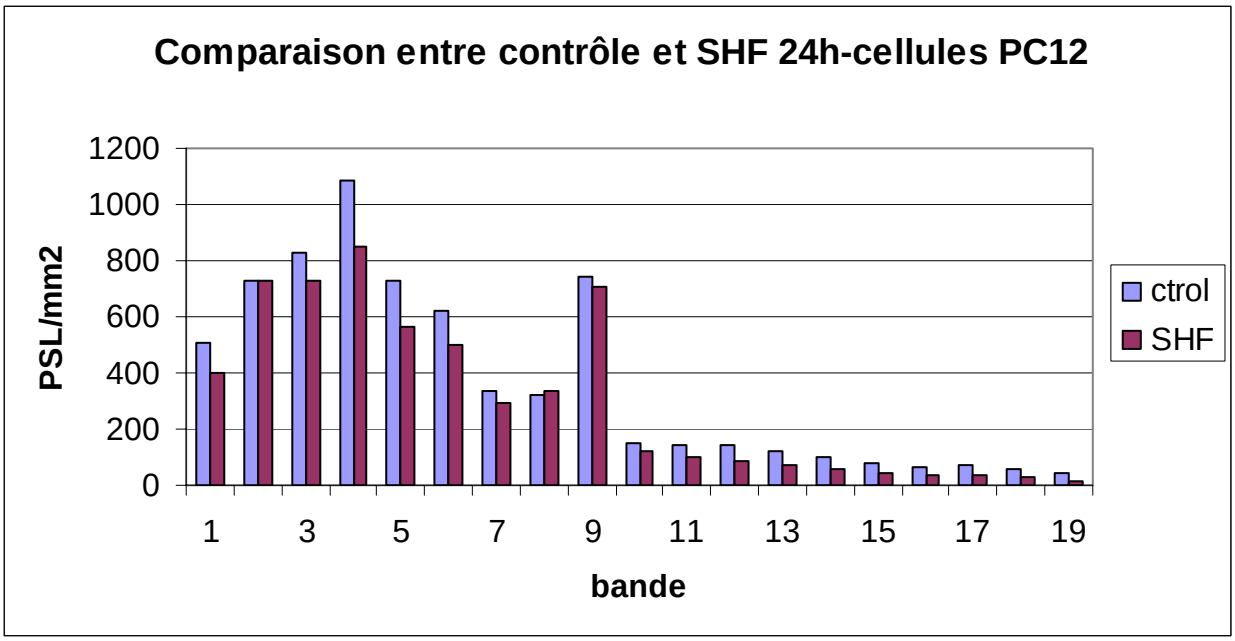


Figure III - 18 *Comparaison entre les groupes contrôle et SHF sur PC12 pendant 24heures. Sur les 2 expériences : p<0.001 ; p=0.003. Leurs inhibitions sont 17.16% ; 25.62%.*

Les résultats d'incorporation de la méthionine ^{35}S, après électrophorèse de l'extrait cellulaire, nous montrent que la SHF a un effet d'inhibition globale sur la synthèse protéique des cellules. Ces pourcentages d'inhibition d'environ 12% à 58% sont en accord avec ceux observés au niveau de la sécrétion extracellulaire de PRL et de catécholamines entre 3 et 24 heures de SHF.

III – 4 – 2 Analyse protéomique par la technique SELDI-TOF-MS

Il est apparu important de valider l'impact de la stimulation à HF sur les cellules par une technique plus moderne apportant un deuxième élément de confirmation et une focalisation de l'analyse protéomique sur les petites masses, ce qui est intéressant pour les neuropeptides par exemple non détectés en gel d'acrylamide. Pour ce faire, l'analyse de la synthèse protéique des extraits cellulaires, a été également réalisée par la technologie SELDI-TOF, technique de « Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization ».

Les barrettes de séparation utilisées comportent des surfaces chromatographiques de natures diverses permettant d'étudier différents sub-protéomes. Nous avons essayé les surfaces H50 (hydrophobe), SAX2 (échangeuse d'anions) et WCX2 (échangeuse de cations). Les dépôts ont été réalisés manuellement par la technique « en goutte » et également en utilisant « un bioprocesseur » permettant des dépôts. Différents essais préliminaires nous ont permis de déterminer les conditions pour réaliser nos expériences. La surface H50 et le dépôt en goutte donnant les résultats discriminants les meilleurs ont été retenus (figure III-19).

III – 4 – 2 – 1 Expression protéique des cellules GH3 et des cellules PC12

Deux types d'approche sont utilisés pour l'analyse des données biologiques globales. La première, plus classique, consiste à comparer de façon multiparamétrique les données quantitatives de différentes protéines ou des peptides détectés afin de déterminer lesquels augmentent ou au contraire diminuent. La deuxième approche complémentaire consiste à effectuer une analyse non supervisée par clustering en utilisant en particulier le clustering de Eisen (Eisen's Cluster and Treeview software). Dans cette approche, les échantillons sont classés en fonction de la moyenne ou de la médiane des données quantitatives de chaque pic protéique. Les échantillons présentant des similarités dans leur profil d'expression protéique sont regroupés entre eux. On obtient ainsi une signature spécifique d'un type d'échantillon ou d'une condition expérimentale.

La distribution des échantillons effectuée par le clustering SELDI-TOF représentée par la figure III-20 montre que la majorité des protéines et des peptides sont quantitativement diminués par la stimulation électrique à haute fréquence pendant 3 heures.

Nous pouvons remarquer que dans les extraits protéiques des cellules GH3 traitées par SHF, 68% des pics détectés, soit 32 sur 47, sont présents à des quantités inférieures à ceux détectés dans les cellules contrôles. Pour les cellules PC12, le pourcentage de pics d'intensité plus faible avec la SHF est de 85%, soit 28 sur 33.

Toutefois, il est à noter que 32 % des pics détectés dans les cellules GH3 traitées par la SHF et 15 % des pics détectés dans les PC12, sont présents en quantité supérieure par rapport au contrôle (voir figure III-20).

L'analyse clustering non supervisée montre qu'il existe bien une signature protéomique spécifique de la stimulation à haute fréquence avec un regroupement systématique des échantillons SHF dans un groupe complètement distinct des autres groupes (figure III-21). Cela confirme le résultat sur les données supervisées aussi bien pour les cellules GH3 que pour les PC12.

D'après les résultats que nous avons eus, l'impact de la stimulation à haute fréquence est plus important sur les cellules PC12 que sur les cellules endocrines GH3.

Cartes de comparaison des profils

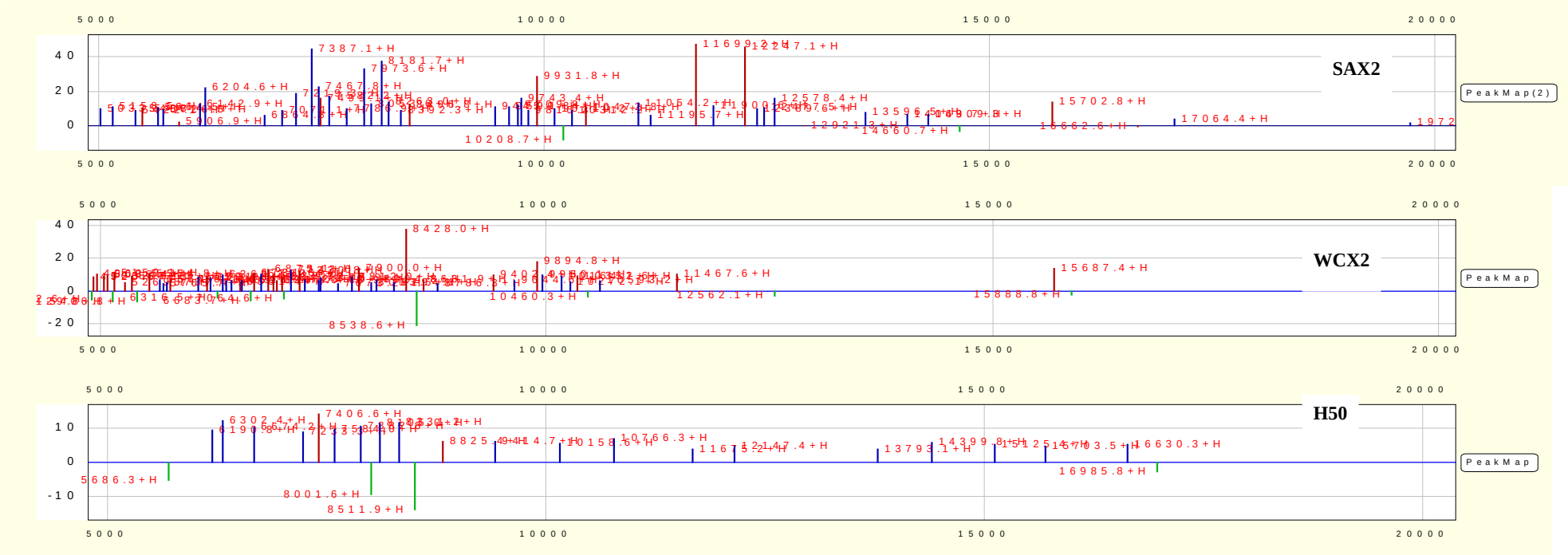


Figure III - 19 *L'intensité du contrôle moins l'intensité de la SHF est portée en fonction de la masse du pic*

Trois surfaces SAX2, WCX2 et H50 avec la technique « en goutte » ont été étudiées.

Clustering des échantillons selon la méthode SELDI-TOF

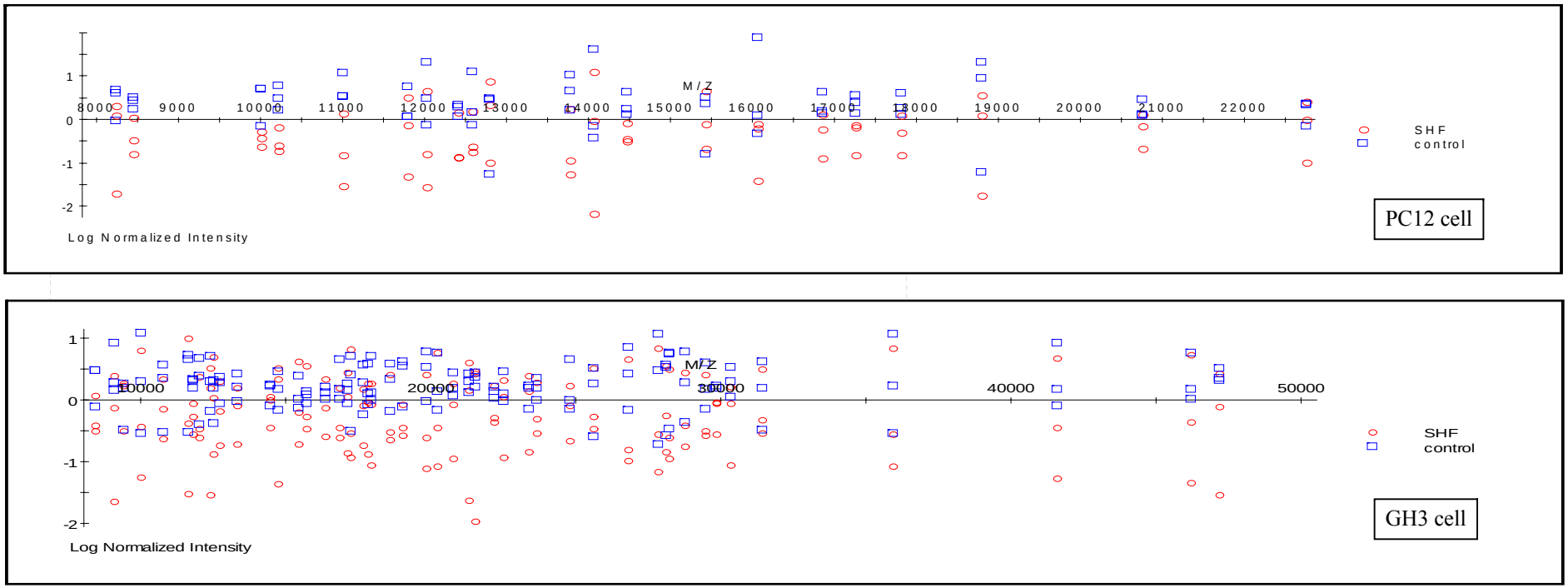


Figure III - 20 *Distribution des échantillons.*

Comparaison entre le groupe contrôle et le groupe SHF sur les cellules GH3 et PC12 avec la barrette H50. Point rouge : SHF, carré bleu : contrôle.

Clustering des échantillons selon Eisen

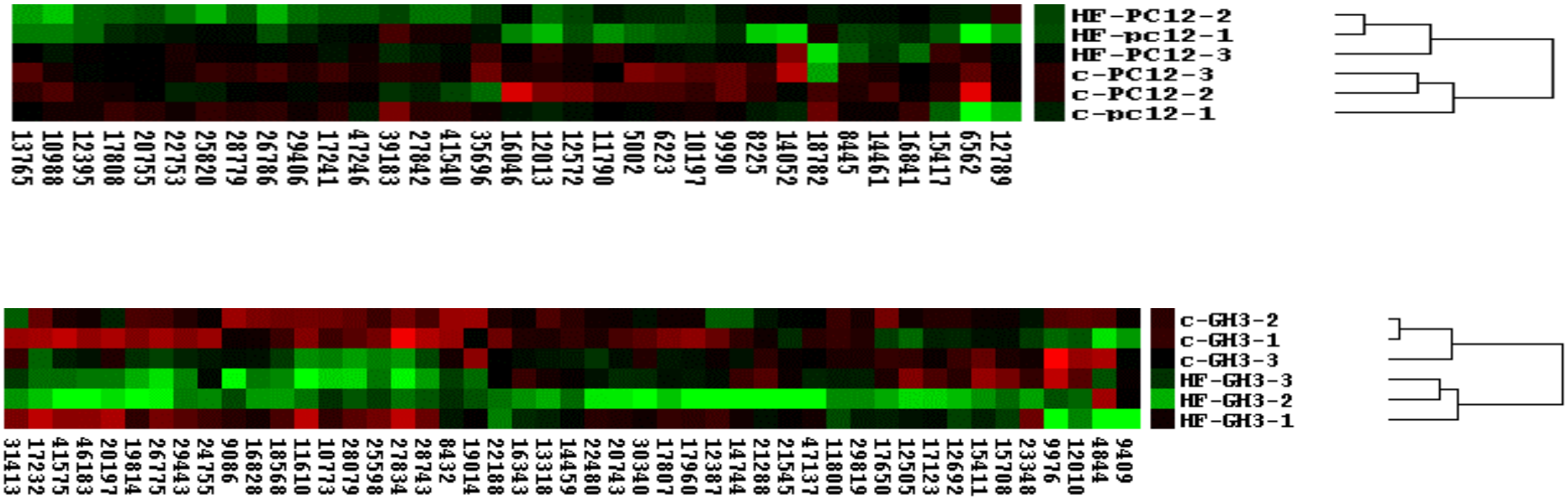


Figure III - 21 *Clustering de Eisen des données SELDI-TOF en fonction de la moyenne des intensités*

Comparaison entre le groupe contrôle et SHF sur les cellules GH3 et PC12

III – 4 – 2 – 2 Effets d'un facteur bloquant des canaux ioniques et effets d'un inhibiteur de la PKC

Nous savons que les courants électriques ont une action importante sur la membrane cellulaire, et que les canaux ioniques situés au niveau de la membrane jouent un rôle primordial.

Pour comparer les effets de la SHF sur les cellules et les effets de certains produits connus pour bloquer les canaux ioniques sur ces cellules, nous avons choisi trois modulateurs des canaux ioniques. Il s'agit de TMA bloquant le canal ionique du potassium, de $LaCl_3$, bloquant le canal ionique du calcium et de la Nifedipine bloquant le canal ionique du L-type calcium.

Un facteur inhibiteur de la protéine kinase C (PKC) a également été testé, il s'agit de H-7 [1-(5-Isoquinolinylsulfonyl)-2-methylpiperazine dihydrochloride].

Les résultats des différentes conditions de traitement des cellules PC12 pendant 3 heures sont présentés ci-dessous par la figue III-22.

6 conditions sont étudiés : Contrôle, SHF, TMA, $LaCl_3$, Nifedipine et H7. Deux conditions témoins supplémentaires sont déterminées par la façon de dissoudre les médicaments, $LaCl_3$ est dissous dans l'Hepes à 50mM et la Nifedipine dans du DMSO pur. Les cellules ont donc subi un traitement par ces solvants La figure III-22 indique les pics détectés de façon automatique par le logiciel SELDI; les détails sont analysés et présentés dans les figures III-23, III-24.

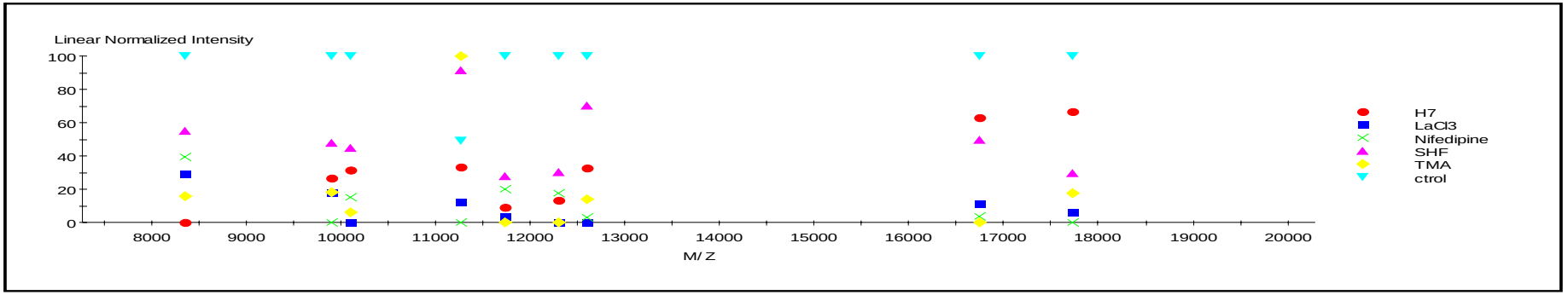


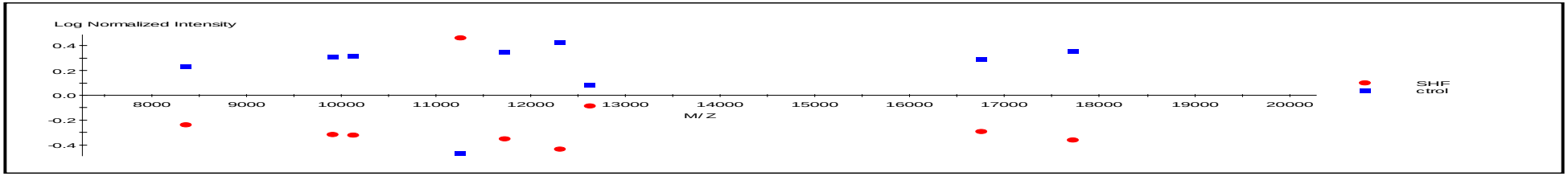
Figure III - 22 *Clustering des échantillons en fonction des 6 conditions*

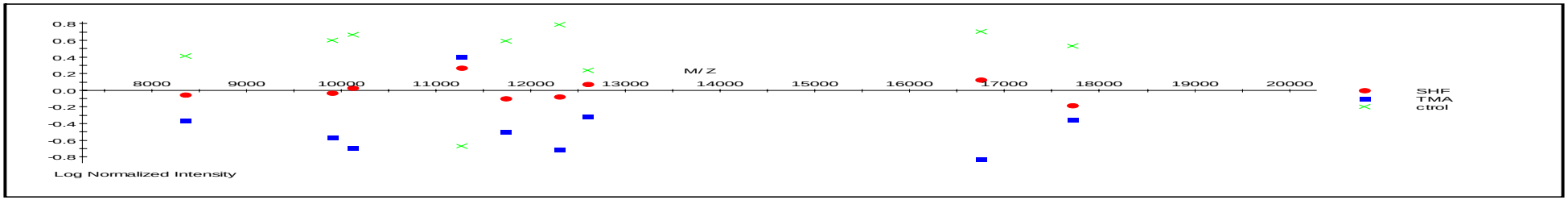
Distribution des échantillons :Différentes façons de normaliser les intensités selon le logiciel SELDI:

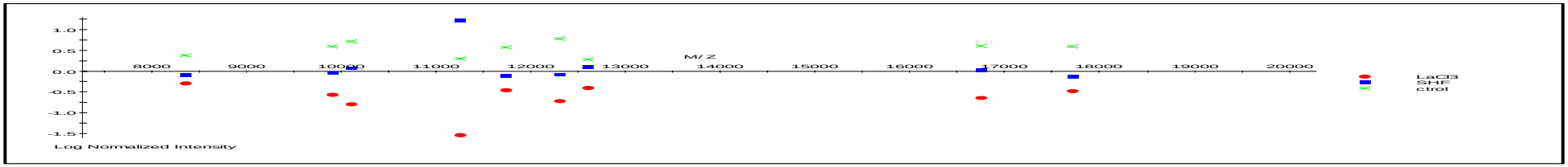
En haut (1) «normalisation log », les intensités des pics sont comparées à la moyenne et sont réparties de part et d'autre l'axe « 0 » correspond à la moyenne. En bas (2) « normalisation linéaire », les intensités des pics sont présentées en pourcentage par rapport à l'intensité maximale de 100 %.

Répartition des échantillons par le cluster Wisar. En haute : Les intensités des pics sont présentées en pourcentage. En bas : les intensités des pics sont comparées à la moyenne des échantillons (considérée à 0)

Comparaison entre les échantillon contrôles, SHF et les facteurs bloquants des canaux ioniques







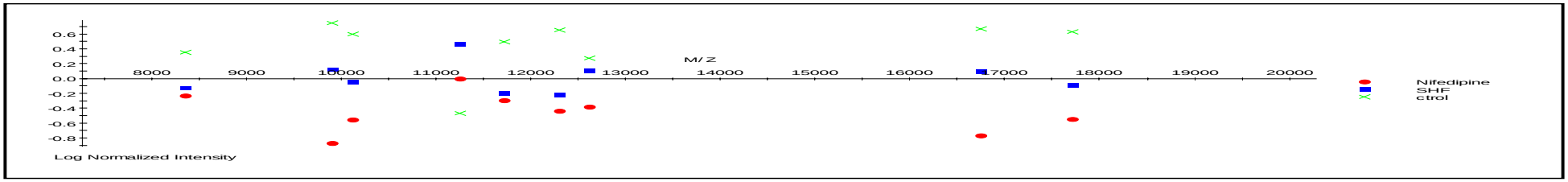


Figure III – 23 *Comparaison entre les échantillons contrôle, SHF et des facteurs bloquants les canaux ioniques.*

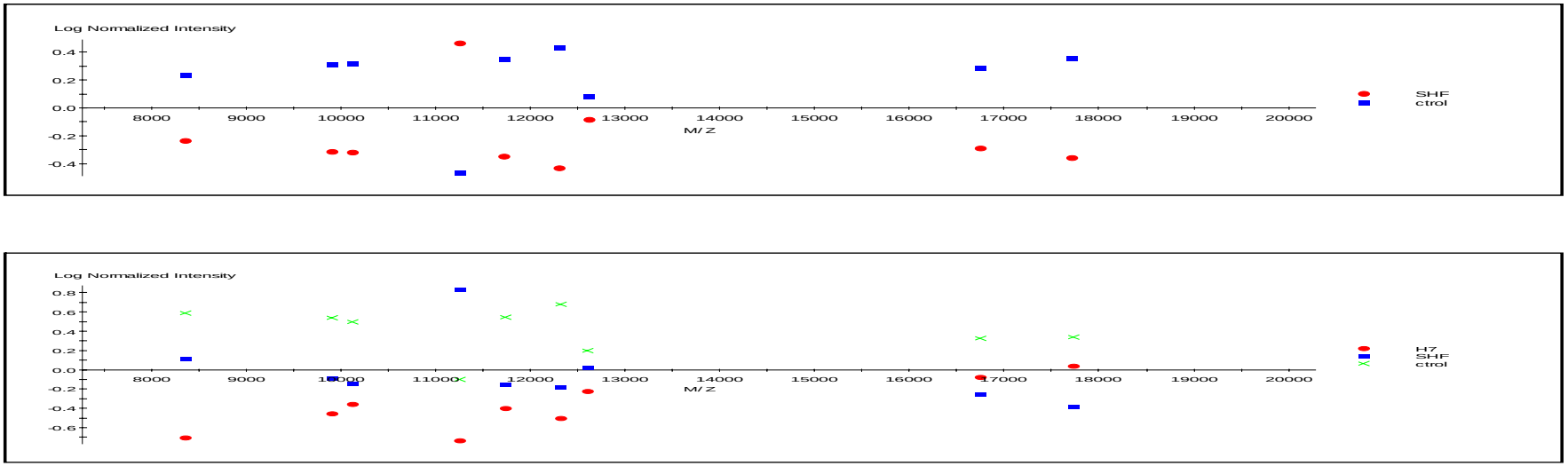


Figure III - 24 *Comparaison entre contrôle, SHF et H7*

Nous avons comparé les extraits protéiques des cellules PC12 contrôle, SHF et traitées par 3 facteurs bloquant des canaux ioniques. Cette image nous montre que la majorité des pics détectés dans les cellules contrôles sont présents en plus grande quantité par rapport aux cellules traitées SHF et par ces inhibiteurs. Par contre autour de 11200 (M/Z), des protéines apparaissent surexprimées dans les cellules traitées SHF et par les différents produits. Cela suggère le rôle d'un facteur activant la synthèse de certaines protéines pendant la SHF.

Nous avons comparé le contrôle, SHF et H7 (inhibiteur de PKC) et nous avons constaté que les pics dans la condition contrôle sont d'intensité supérieure aux autres conditions, excepté le pic autour de 11300 (M/Z) qui est plus intense dans la condition SHF. Par ailleurs, le mode de normalisation « log » nous indique que deux pics autour de 16 000 et 18 000 (M/Z) présentent des intensités plus élevées pour H7 par rapport à SHF, alors que à l'inverse, pour tous les autres pics, la condition H7 présentait des intensités plus faibles par rapport à la condition SHF. Cela suggèrerait l'existence de mécanismes différents pour les facteurs bloquants des canaux ioniques et le facteur inhibiteur de PKC.

III – 4 – 2 – 3 Confirmation des effets inhibiteurs de la synthèse protéique *in vivo* dans le cerveau de souris.

Nous avons réalisé une stimulation corticale à haute et basse fréquence, au niveau du cortex moteur pendant 3 heures. Le cerveau a été disséqué au niveau de la zone de stimulation. Nous avons vérifié l'absence de lésion par l'analyse histologique. Puis nous avons étudié in situ par imagerie tissulaire protéomique de type SELDI-TOF les niveaux régionaux d'expression protéique sur une zone de 2 mm. Au contact de l'électrode sur une zone de 1 mm environ nous observons une diminution très significative de l'expression protéique qui décroît dès 2 mm. Ces résultats sont retrouvés sur les deux surfaces testés, H50 et CM10 (figure III-25).

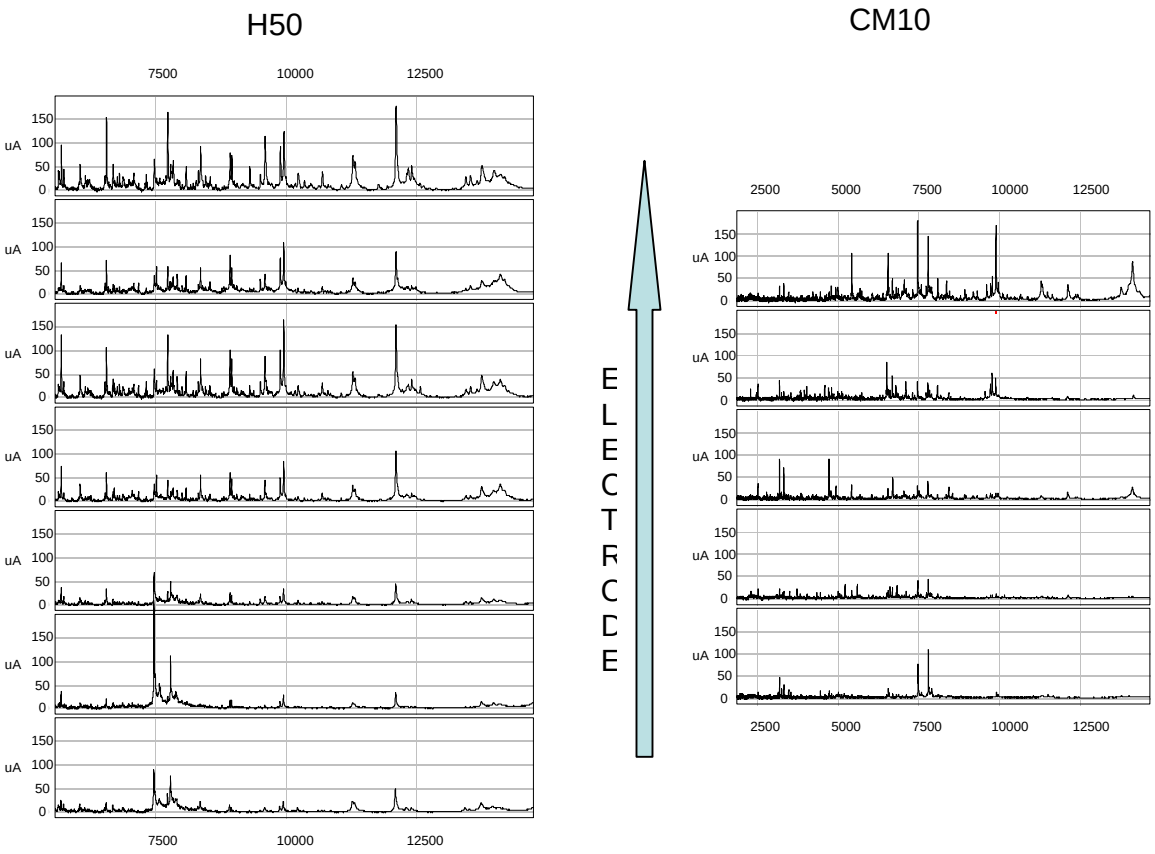


Figure III - 25 : *Analyse protéomique SELDI-TOF in situ sur coupe autour de l'électrode de stimulation corticale.*

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les mécanismes de la stimulation électrique à haute fréquence *in vivo* restant peu élucidés et vivement discutés, il nous a paru important de mener une étude fondamentale *in vitro* visant à déterminer à un échelon cellulaire et moléculaire les mécanismes mis en jeu par la stimulation électrique. Une étude de la sécrétion des cellules, de leur modulation transcriptomique et protéomique a été menée.

IV – 1 VALIDATION DE LA TECHNOLOGIE UTILISEE ET CHOIX DES SYSTEMES CELLULAIRES

Les cellules choisies pour notre modèle devaient d'une part présenter une réponse spontanée à l'électrostimulation et d'autre part être sensibles à un neurotransmetteur ou à un neurotoxique, utilisé comme témoin de réponse métabolique. Des cellules endocrines INS-1 de pancréas de rat ont été testées pour leur sécrétion d'insuline dans les milieux de culture pendant l'électrostimulation. Mais aucune différence significative n'a pu être retrouvée entre les cellules stimulées et contrôles. Il est possible que cette lignée cellulaire soit peu excitable. Cette lignée n'a donc pas été sélectionnée pour nos expériences. La lignée de rat GH3 provenant d'une tumeur de la glande pituitaire (prolactinome) qui présente une sécrétion de prolactine importante pouvant être inhibée efficacement par la dopamine a été retenue pour notre étude. La lignée de rat PC12, de type neuronal, issue d'une tumeur de la glande surrénale (phéochromocytome), et sécrétant les catécholamines qui sont des neurotransmetteurs a également été choisie.

Le préalable à ces études était de disposer d'un système simple, fiable et reproductible de stimulation électrique *in vitro*. L'histoire de la neurophysiologie et son évolution étant liée aux appareillages qu'elle a développés, on se devait d'élaborer un système performant pour la stimulation électrique des cellules. Au tout début, nous avions utilisé un dispositif dédié a

l'électroporation [BTX (Balanced Technology eXtended, WPI, USA)]. La stimulation électrique des cellules était pratiquée dans cette boite d'électroporation, avec dans ce cas, deux électrodes plates placées face à face. Mais ce dispositif générait des résultats non reproductibles pour les longues durées de stimulation. En effet, à la fin des 24 heures d'expérimentation, dans cette cuve d'électroporation, la densité des cellules était très hétérogène, de plus en plus forte de haut en bas. La majorité des cellules se trouvait donc à la partie basale de la cuve, expliquant probablement l'inadéquation du dispositif.

Par la suite, nous avons apporté des modifications au système précédemment décrit par Brevet (Brevet A, 1976, Science). Notre dispositif est constitué d'une plaque de culture cellulaire de 24 puits en série, ce système nous a permis d'adapter les paramètres de la stimulation électrique réalisée en milieu clinique pour soigner la maladie de PD à des études *in vitro* (figure II-1 et photo II-1).

L'autre système que nous avons mis en œuvre, constitué d'une grande boite de Pétri de 10 cm de diamètre (figure II-2 et photo II-2) a présenté l'avantage de produire une grande quantité de cellules, facilitant les analyses ultérieures. Dans toutes nos expériences, nous avons donc utilisé ces deux systèmes de stimulation électrique continue comportant un stimulateur et un isolateur. Toutes les expérimentations ont été contrôlées à l'aide d'un oscilloscope.

Dans nos systèmes, le fait d'utiliser deux électrodes bipolaires dans les milieux de culture permet d'assurer un champ électrique stable et homogène (photo II-3) pendant toute la durée de stimulation, contrairement aux électrodes mono-polaires utilisées *in vivo* entraînant des irrégularités dans le courant du fait des distances différentes entre l'électrode et le noyau (McIntyre et al 2004).

A partir de nos travaux une collaboration industrielle a été menée avec le LETI (Laboratoire d'Electronique de Technologie de l'Information) au Centre d'études nucléaires

de Grenoble CEA (Commissariat à l'Energie Atomique) à Grenoble afin de mettre en place un dispositif produit de façon industrielle. Les résultats de cette collaboration ne sont pas exposés ici, mais devraient à terme permettre de disposer d'un dispositif industriel de stimulation électrique *in vitro*.

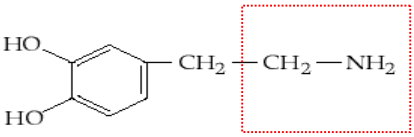
Cette phase, technologique était indispensable pour disposer de résultats surs, indépendants d'une éventuelle cytotoxicité du dispositif.

IV – 2 LES EFFETS DE LA STIMULATION ELECTRIQUE *IN VITRO* SUR LA SECRETION DE PROLACTINE DE GH3 ET DES CATECHOLAMINES DE PC12

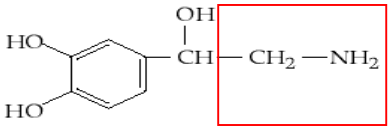
Après la mise au point du système de stimulation électrique des cellules *in vitro*, nous avons étudié dans un premier temps la sécrétion de neurotransmetteurs et la sécrétion hormonale des cellules.

La prolactine est une protéine d'environ 25.7 kDa composée de 226 acides aminés. Sa quantité accumulée dans une cellule résulte d'un équilibre entre sa synthèse et sa dégradation. La sécrétion protéique est d'abord localisée dans le réticulum endoplasmique, puis dans l'appareil de golgi avant d'atteindre les granules de sécrétion.

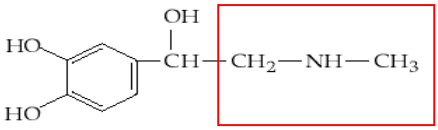
Les catécholamines (voir figure IV-1) regroupant la Dopamine (DA), l'Adrénaline (AD) et la Noradrénaline (NA), sécrétées par les PC12, sont des molécules à fonction de neurotransmetteurs.



Dopamine



Noradrénaline



Adrénaline

Figure IV - 1 *Formule des catécholamines : dopamine (DA), adrénaline (AD) et noradrénaline (NA).*

Les catécholamines sont synthétisées à partir de la tyrosine. La tyrosine est hydroxylée en 3-4 dihydroxy phénylalanine (DOPA) par la tyrosine hydroxylase. La DOPA est décarboxylée par la L-dopa décarboxylase et fournit de la dopamine. L'hydroxylation du Carbone de la chaîne latérale de la dopamine par la dopamine hydroxylase conduit à la noradrénaline. Dans la médullosurrénale, l'enzyme phenyléthanolamine N-méthyl transférase (PNMT), qui ne se trouve pas dans les neurones sympathiques, catalyse la N-méthylation de la noradrénaline en adrénaline. Dans le cas de la synthèse des Catécholamines, les différents enzymes qui ont une fonction importante (figure IV-2) sont aussi des protéines (voir carré rouge dans la figure IV-2).

Le mécanisme de la SHF pourrait dépendre de ces protéines et donc influencer la sécrétion des catécholamines des PC12.

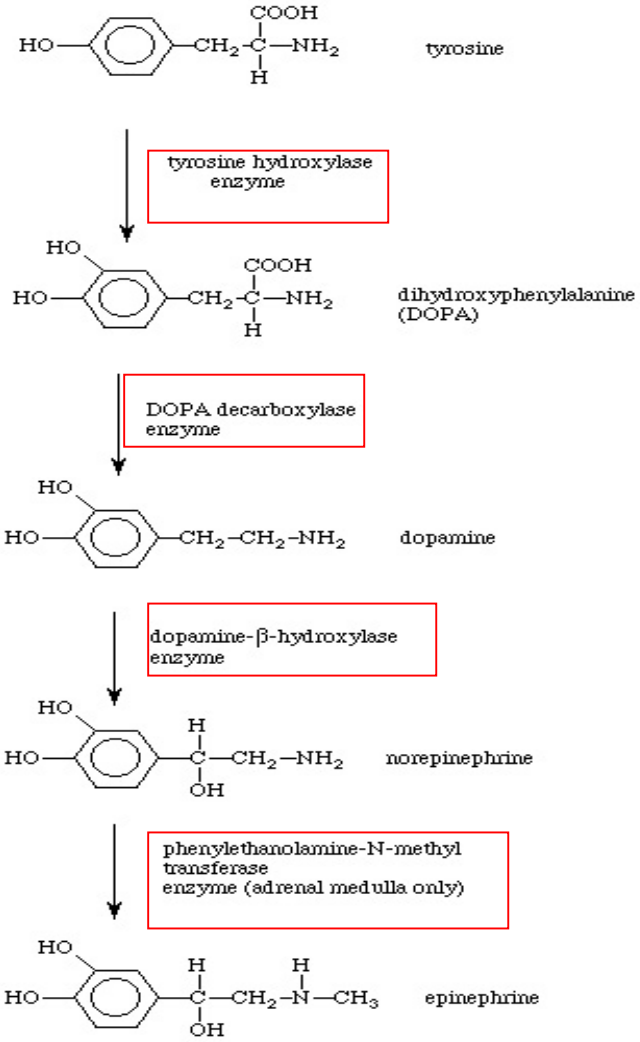


Figure IV - 2 *La synthèse de catécholamine*

Selon les observations cliniques et les résultats des expériences sur les animaux, nous pouvons formuler l'hypothèse que la SHF inhiberait la synthèse protéique et la production d'hormones ou de neurotransmetteurs dans le milieu extracellulaire. Dans nos expériences avec les cellules PC12, nous avons observé que la SHF n'a pas d'effet inhibiteur identique sur la production de toutes les catécholamines. En effet sur une durée de 24 heures, la SHF inhibe la production de DA et de NA, mais n'a pas d'effet significatif sur la production de AD. Nous notons par ailleurs une similarité entre les molécules DA et NA au niveau de leurs structures chimiques qui comportent toutes deux le même groupe $–CH_2\text{-}NH_2$ (figure IV-1), tandis que AD possède un groupe différent $–CH_2\text{-}NH\text{-}CH_3$. De plus, la dopamine et la noradrénaline sont

des neurotransmetteurs synthétisés au niveau du cerveau, par contre l'adrénaline est un neurotransmetteur synthétisé dans la glande médullosurrénale. Les effets de la SHF pendant 3 heures sur la production des cellules PC12 n'ont pas été visibles contrairement aux cellules GH3 pour lesquelles ils ont été mesurés. Deux facteurs pourraient expliquer cette différence. D'une part, la demi-vie de la Prolactine chez GH3 serait de 30 minutes, et celle des Catécholamines chez PC12 d'environ 18 heures (résultats non publiés). D'autre part, le temps de doublement des GH3 de 48 heures est notablement plus court que celui des PC12 qui est de 92 heures d'après le fournisseur de cellules ATCC (American Type Culture Collection).

IV – 3 LES MECANISMES POSSIBLES DE LA STI MULATION ELECTRIQUE DES CELLULES

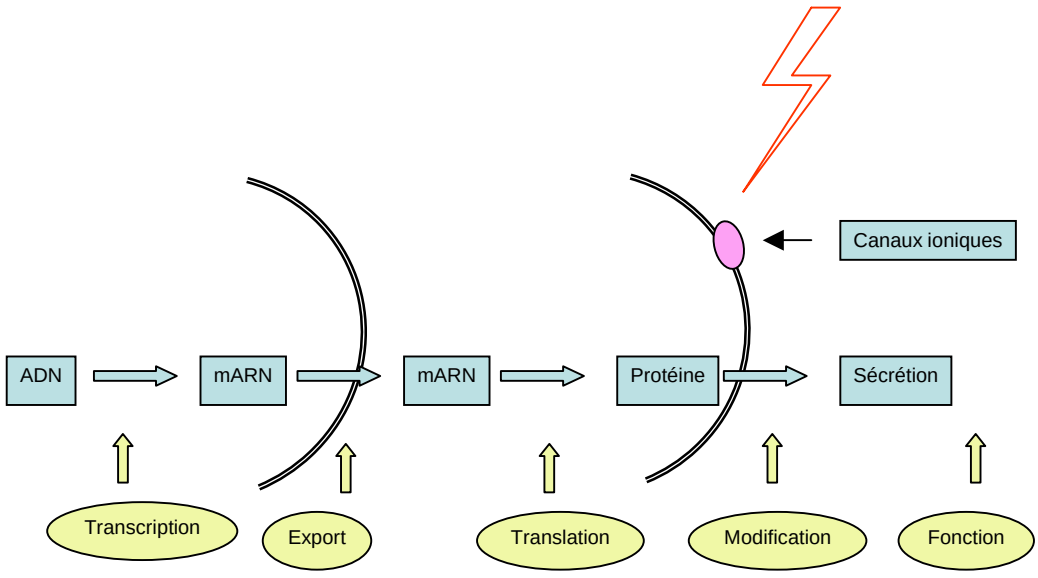


Figure IV - 3 *Schéma des mécanismes possibles de la SHF au niveau cellulaire*

Dans le schéma ci-dessus (voir figure IV-3), nous essayons d'envisager les différents points d'impact possibles de l'effet inhibiteur sur la production de prolactine ou de

catecholamines de la stimulation électrique à haute fréquence. Les résultats obtenus dans la première partie du travail nous ont permis de montrer que la SHF inhibe la production d'hormone des cellules GH3 ainsi que celle des neurotransmetteurs catécholaminergiques des cellules PC12. La question est de savoir à quel point du processus de synthèse et de sécretion protéique agit la SHF ?

Nos expériences ont dosé la prolactine et les catécholamines dans le milieu de culture, l'impact de la stimulation électrique expliquant l'effet inhibiteur constaté peut donc se situer a n'importe quel niveau de la chaîne biologique conduisant à la présence de ces facteurs dans le milieu de culture. Le premier niveau est la transcription, suivi de la traduction des protéines et de leur sécrétion dans le milieu. Des enzymes interviennent aussi dans le métabolisme comme la TH pour la dopamine, qui peuvent subir elles-mêmes ce type de régulation. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la production d'hormones et de neurotransmetteur commencent à être mieux connus. Pour la prolactine, les éléments clés de régulation, impliquent les voies de la PKC et de la PKA en lien direct avec les voies de régulation du calcium (figure IV-4).

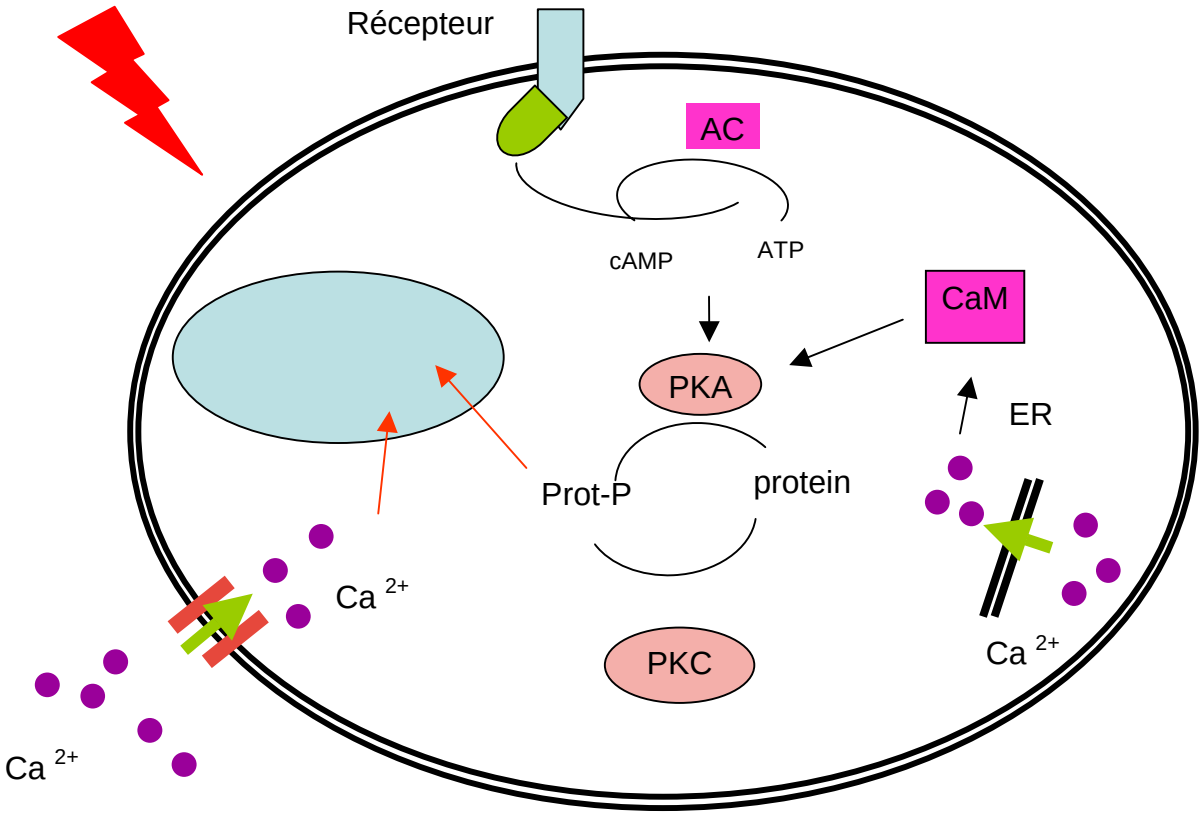


Figure IV - 4 *Biosynthèse et sécrétion de la protéine, rôle de nombreux facteurs.*
(1) Les facteurs bloquant les canaux ioniques pourraient via le récepteur, la protéine G et la PKA influencer les synthèses protéiques. (2) LaCl3 et Nifedipine bloquent les canaux ioniques du Calcium qui ont un rôle activateur dans la transcription des ARN messagers dans le noyau. LaCl3 et Nifedipine inhibent donc la synthèse protéique de PRL. (3) PKC est un facteur activateur de la synthèse des protéines, H7 est un inhibiteur de PKC.

Ce schéma peut aussi s'appliquer aux catécholamines, de façon un peu réductionniste. Dans la chaîne biologique partant de l'ADN et conduisant à la sécrétion des protéines (figure IV-3) de multiples facteurs cellulaires interviennent. La stimulation électrique étant un événement externe imposé à la cellule, la membrane cellulaire et les régulations biochimiques immédiatement sous jacentes, sont une cible obligatoire. Les membranes cellulaires jouent un rôle prépondérant dans l'effet de la neurostimulation, comme l'on montré les travaux réalisés en électrophysiologie. Notre discussion et nos hypothèses sur les effets de la SHF porteront donc essentiellement autour de ces points (figure IV-4).

IV – 3 – 1 Effets de la stimulation électrique sur la transcription

Nous avons recherché les modifications d'expression induites par la stimulation à haute fréquence sur les cellules en culture.

Une étude transcriptomique a été menée utilisant la technique des DNA microarray sur nylon à l'aide d'oligonucléotides longs et d'une détection radioactive. Pour élargir les hypothèses physiopathologiques, nous avons effectué cette étude transcriptomique visant à explorer de façon globale les modifications d'expression génique induite par la SHF. Cette technique est une adaptation de la technique utilisant des produits PCR décrite par le groupe de BR Jordan de Marseille. Elle a l'avantage d'être plus sensible que les techniques fluorescentes et de permettre une normalisation des résultats en fonction de la quantité d'oligonucléotides déposés qui est indispensable. La négligence de ce type de normalisation par les techniques plus conventionnelles explique probablement les non reproductibilités

récemment rapportées dans le domaine transcriptomique. Les résultats présentés ici ont constitués la première validation d'une membrane « oligonucléotide rat » produite par le laboratoire.

Des modifications significatives d'expression génique ont été observées sur les 5000 gènes ciblés sur les membranes, 200 sont détectés dans les cultures et 87 de ces 200 (soit 41% des gènes) sont modifiés au niveau de l'expression génique. Nous n'avons retenu que les gènes dont l'expression génique est modifiée de plus de 2 fois. On observe une diminution de l'expression pour 39/54 gènes exprimés (SHF / contrôle < 2) et une inhibition pratiquement complète pour 20/33 gènes exprimés (SHF / contrôle = 0). Par contre, on note une augmentation de l'expression pour 15/54 des gènes exprimés (SHF / contrôle>2) mais dans 13/33, l'expression est induite par la SHF alors que les gènes ne sont pratiquement pas détectés dans la situation contrôle (sans SHF). Soit au total une diminution pour les deux tiers et une augmentation pour 1/3 des gènes repérés. Ainsi, au plan génomique c'est l'inhibition qui l'emporte avec cependant un tableau d'ensemble plus complexe puisque certains gènes présentent une augmentation de leur niveau d'expression.

Les voies impliquées regroupant ces modifications d'expression génique peuvent être regroupées dans des groupes fonctionnels qui renvoient à des cibles physiopathologiques potentiellement importantes dans le contexte de la neurostimulation cérébrale (voir figure IV-5):

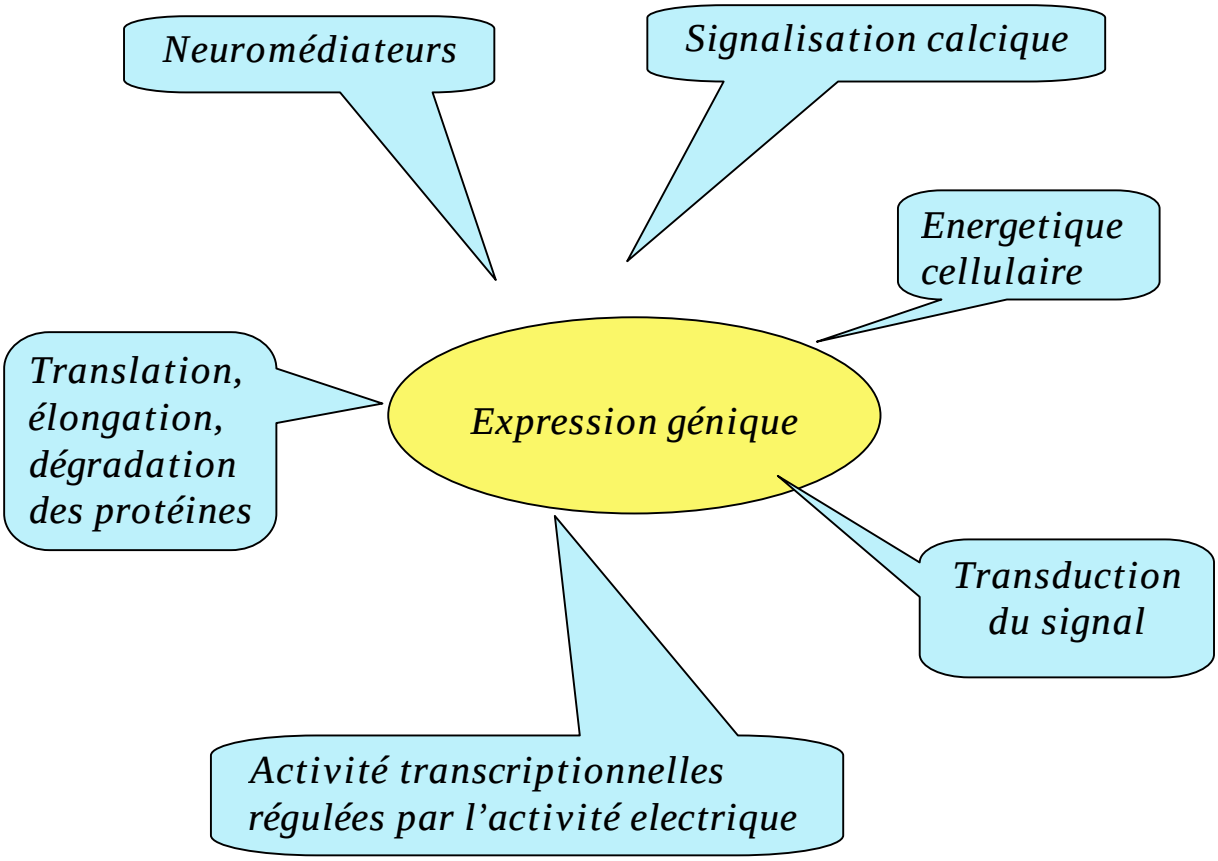


Figure IV - 5 *Facteurs dont l'expression génique est modifiée par la SHF*

- La signalisation calcique
- La synthèse/élongation/dégradation des protéines
- Les neuromédiateurs
- L'énergétique cellulaire
- La transduction du signal
- Des facteurs transcriptionnels dont certains sont connus pour être régules par l'activité électrique

Enfin un certain nombre de gènes ne peuvent être classés de façon rigoureuse.

La discussion des données transcriptomiques peut se mener à deux niveaux, le premier toujours assez discutable consiste à prendre en compte les gènes de façon individuelle, le deuxième qui manque encore d'outils bien validé vise à intégrer l'ensemble des données dans un réseau global explicatif.

A partir de ces données transcriptomiques orientant vers une régulation négative de la synthèse protéique, nous avons voulu confirmer cette hypothèse par l'étude du protéome. La diminution très importante de l'ATPsynthase va bien dans le sens d'une inactivation du métabolisme énergétique de la cellule, qui cadre bien avec l'inhibition fonctionnelle de la structure. Il en est de même pour la diminution de la cytochrome oxydase confirmée sur nos deux membranes et retrouvée dans l'étude de P Salin (2002). L'inhibition de l'énergétique mitochondriale pourrait être un point d'impact majeure de la neurostimulation, à confirmer et à explorer de façon plus approfondie. L'augmentation de la calmoduline va dans le sens d'un tamponnage augmenté du calcium qui participerait à neutraliser les phénomènes excitotoxiques locaux.

Dans les cellules en situation physiologique normale, les canaux ioniques sont responsables des signaux électriques rapides, nécessaires à la transmission de l'information.

Les canaux calciques jouent un rôle important dans la sécrétion des cellules. Ils comprennent plusieurs types (L, T, N, P/Q, R), chacun impliquant des protéines spécifiques. Les échanges de calcium intracellulaire participent à la modulation des fonctions cellulaires (Fisher et al 2001). Les études sur tranches ont montré (Beurrier et al 2001, Garcia et al 2003) le rôle important des canaux calciques dans la mise en jeu de certains effets de la SHF, en accord avec les données de la littérature. Nous montrons au niveau transcriptomique des modifications des canaux potassique et calciques voltages dépendants qui vont dans le sens d'une diminution de la dépolarisation membranaire. Cependant ces données ne sauraient remplacer l'étude électrophysiologie et doivent être discutées avec prudence. Dans cette perspective, un complément électrophysiologie et surtout une analyse de l'imagerie calcique et de sa modulation par des inhibiteurs de ces différents canaux et en cours. Il en est de même

pour l'augmentation de la sous unité gamma 3 du récepteur GABA, qui semble aller dans le sens d'une activation des voies inhibitrices discutées précedemment, mais la encore des expérience immunohistochimiques et électrophysiologiques complémentaires sont nécessaires.

Le fait le plus frappant de nos données transcriptomiques était la diminution d'expression de gènes impliqués dans la synthèse protéique à commencer par les facteurs d'élongation. L'implication de cette voie était aussi fortement confortée par l'analyse en réseau que nous avons tenté de mener à l'aide du logiciel Pathway assist. L'analyse globale de nos données reste très difficile à interpréter du fait de la complexité des réseaux obtenus. Nous avons donc décidé de filtrer les informations en focalisant sur les items « activité neuronale, calcium et synthèse protéique ». Un réseau évident lie ces différents éléments à travers l'association de nos données d'expression et des données afférentes de la littérature. Il était d'abord très important de contrôler la réalité à l'échelon protéomique des données transcriptomique orientant vers un effet complexe d'inhibition de la synthèse protéique.

IV – 3 – 2 Inhibition globale de la synthèse protéique des cellules stimulées

Dans notre étude, nous nous sommes focalisés sur l'analyse des protéines, constituants majoritaires des tissus, dont la synthèse est capitale pour le développement de la cellule et qui président à l'essentiel des régulations cellulaires.

Dans les premières expériences, nous avons étudié la sécrétion dans les milieux extracellulaires, de Prolactine des cellules endocrine GH3 et de Catécholamines des cellules neuronales PC12. L'inhibition de la sécrétion des cellules par la stimulation électrique à haute fréquence est un effet que nous avons observé dans notre modèle. Après cela, par les techniques de transcriptome et de protéome, nous avons réalisé des expériences afin de documenter plus largement les changements intervenant dans la cellule sous l'effet de la

stimulation électrique, particulièrement à haute fréquence. Il était important de confirmer les données transcriptomique suggérant une neutralisation des voies de synthèse protéique par une étude à ce niveau.

Nous avons utilisé deux techniques : l'incorporation de méthionine et la SELDI-TOF-MS. Le SELDI est basé sur des techniques de séparation de chromatographie et de spectrométrie de masse. Cette technique a des avantages tels que le besoin de peu de matériel la rapidité, une bonne sensibilité et reproductibilité. Elle permet de plus l'étude des protéines de faibles poids moléculaires qui ne sont pas détectées en gel d'électrophorèse.

Nous avons travaillé dans 4 conditions différentes, du niveau cellulaire vers le niveau moléculaire.

1) Comparaison des effets de la SHF sur les cellules endocrines GH3 et les cellules neuronales PC12. Les expériences SELDI comme d'incorporation de méthionine montrent un effet significatif d'inhibition de la synthèse protéique, avec comme pour les dosages de prolactine ou de catécholamines un effet plus net à 24 heures qu'à 3 heures. Les résultats indiquent aussi que la lignée PC12 est plus sensible électriquement que la lignée GH3. Il est possible que la cellule neuronale soit plus active que la cellule endocrine, ou qu'elle soit plus excitable.

2) Comparaison de la SHF avec les médicaments qui bloquent les canaux ioniques dans les cellules PC12. Nous avons utilisé le TMA qui bloque le canal potassium, le $LiCl_3$ qui bloque le canal calcium, et la Nifedipine qui bloque le canal calcium de type L. Ils ont les mêmes effets d'inhibition sur les synthèses des protéines pendant la SHF, mais ils ne présentent pas le même niveau d'inhibition. D'après nos expériences, ces niveaux d'inhibition sont dans l'ordre décroissant TMA > $LiCl_3$ > Nifedipine, avec des différences qualitatives qui montrent que l'on ne peut résumer l'effet de la SHF à ce niveau à une simple inhibition de certains canaux ioniques, et qu'il existe probablement des effets plus complexes.

3) Comparaison de la SHF avec les effets de H7 (un inhibiteur de protéine kinases C) sur les cellules PC12. La PKC est activée les ions Ca2+. H7 est un inhibiteur de PKC, donc il inhibe le cAMP, et seconds messagers intracellulaires activés en cascade. Les résultats montrent que H7 a un effet d'inhibition de synthèse des peptides chez PC12, mais il est moins fort que celui observé avec les inhibiteurs de canaux ioniques.

Au total, les expériences d'inhibition de la voie PKC, comme des canaux ioniques, montrent que ces différents acteurs peuvent participer à réguler la synthèse protéique dans le sens observé dans nos expériences. Cependant avec des différences qui montrent que la SHF est probablement plus complexe et multi-impacts. Dans nos expérimentations SELDI, nous avons ainsi trouvé certains pics protéiques minoritaires qui sont augmentés, et qu'il serait intéressant d'identifier.

Au total, l'étude conjointe du transcriptome et du protéome oriente vers un nouveau mécanisme initié par la stimulation à haute fréquence impliquant une régulation négative de la synthèse protéique, en particulier au niveau de l'élongation des protéines. Ce niveau de la synthèse protéique est crucial ; il est le point de régulation de la synthèse protéique en réponse aux stimuli externes. L'adjonction d'un facteur de croissance par exemple va augmenter très vite ce niveau de régulation, et la même chose a été décrite en réponse au facteur neurotrophique ou au glutamate. Ce niveau est étroitement réglé par la signalisation calcique, permettant de comprendre son implication en réponse à la SHF. Cette voie a aussi été impliquée dans le système nerveux. Le groupe de Glowinski (Marin and Glowinski 1997) a ainsi montré que la stimulation par le glutamate entraînait une augmentation de l'élongation dont l'inhibition avait un effet neuroprotecteur. Ce mécanisme a été proposé pour expliquer

l'absence de lésion cérébrale chez l'ours en hibernation, rendant compte d'une hibernation protectrice des structures cérébrales, qui est une bonne image au plan physiologique de ce que l'on sait des effets de la SHF. Ce mécanisme de modulation négative de l'élongation serait peut-être un mécanisme protecteur face à l'effet excitateur du glutamate par exemple.

Enfin, nos dernières expériences ont pu confirmer ce mécanisme in vivo en montrant l'inhibition de la synthèse des petites protéines en périphérie de la zone de stimulation corticale chez la souris.

Il est intéressant de noter que au travers de l'analyse bio-informatique en réseau, on peut commencer à ébaucher une théorie explicative reliant la neurostimulation à haute fréquence et la neutralisation de la synthèse protéique : un lien direct existe entre les modifications de flux calcique et le niveau de facteur d'élongation comme EEF1, lui-même régulé par les calmodulines et les kinases dépendantes du calcium et la PKC, avec un impact transcriptionnel à plus long terme via la modulation de facteurs comme ATF4. On relie ainsi les éléments de dépolarisation membranaires, les seconds messagers, un effet direct sur la synthèse protéique et une reprogrammation à long terme via la modulation de l'activité transcriptionnelle.

IV - 4 LES MECANISMES POSSIBLE EN SYNTHESE

D'après les observations cliniques et les expérimentations animales *in vivo* et *in vitro*, plusieurs mécanismes possibles peuvent être proposés en synthèse.

Premièrement, la SHF inhibe les cellules neuronales afférentes dans les noyaux proches du site de la stimulation (VIM du noyau thalamique, globes pales externes (GPe) et internes (GPi), le putamen ou le STN) chez les patients ou chez les animaux *in vivo*. (Boraud et al 1996, Beurrier et al 2001, Wu et al 2001). La SHF régule les neurones efférents via

l'activation de terminaux axonaux afférents provenant de neurones d'amont et qui font synapse avec les neurones de la structure stimulée. (Dostrovsky et al 2000).

Deuxièmement, la SHF induit des activités de courant qui bloquent des canaux ioniques voltages dépendants des neurones proches de l'électrode stimulée pendant la période de dépolarisation de la membrane. Certaines expérimentations rapportent des observations similaires sur des tranches d'hippocampe de rat (Bikson et al 2001).

Troisièmement, chez l'homme dans le Gpi et chez le rat dans le NST, les recherches montrent que la SHF produit un changement dans l'efficacité de la transmission synaptique. Elle provoque soit une inhibition synaptique au niveau de la région stimulée en connexion avec les neurones proches de l'électrode de stimulation (Dostrovsky et al 2000, Shen et al 2003), soit elle provoque la dépression synaptique par déficience du transport de neurotransmetteurs déplétés au niveau de la prochaine synapse (Urbano et al 2002), ce qui est proche de l'hypothèse qui sous tend le présent travail.

Quatrièmement, la SHF opèrerait une modulation d'activité de réseau pathologique (Montgomery et al 2000). L'ensemble de ces données décrites dans la littérature sur les effets de la SHF permettent de conforter cette hypothèse générale de la modulation du réseau pathologique et laissent présumer que l'action de la SHF pourrait résulter de la combinaison de plusieurs mécanismes (Benabid et al 2002, Vitek 2002).

La SHF mime les effets de la destruction dans des situations thérapeutiques sur des systèmes nerveux malades, comme sur le cerveau fonctionnant normalement d'animaux de laboratoire sains.

La manière la plus simple de résoudre ce paradoxe est de faire l'hypothèse que la SHF induit un brouillage (jamming) de la transmission du message neuronal, qui empêcherait le système de transmettre des signaux ou messages neuronaux anormaux, responsables des

manifestations pathologiques. Cependant, en situation physiologique, le message n'est pas anormal. Le brouillage empêcherait donc la transmission-traitement de tout type de message traversant la structure stimulée, créant ainsi une situation équivalente à l'ablation de cette structure. Cette explication est facile à proposer, elle s'applique à toutes les situations, mais est difficile à démontrer. De surcroît, l'inhibition n'est observée que quand la stimulation porte sur des structures nucléaires ou des ensembles de corps cellulaires et non pas dans des faisceaux de fibres (comme le faisceau pyramidal, le lemniscus médian, le nerf moteur oculaire commun, etc.) où la stimulation, à basse comme à haute fréquence, induit les mêmes effets (contractions musculaires, paresthésies, déviations oculaires), en accord avec ce que l'on peut attendre de l'excitation de ces fibres.

Comment cela peut-il être ?

Ce ne peut pas être dû à une excitation, sur le mode habituel, qui induirait une cascade d'évènements se terminant par une inhibition finale au niveau du site, Où survient normalement l'évènement supprimé par la stimulation. Parce qu'une lésion ne saurait pas induire cette cascade et il est peu probable qu'une telle cascade providentielle puisse survenir dans chaque situation où cet effet de la SHF est observé.

Ce phénomène doit donc trouver son origine à proximité immédiate de l'électrode de stimulation.

Que se passe-t-il à ce niveau ?

Actuellement, nous avons des données montrant :

- L'évidence d'une inhibition fonctionnelle, dans des situations pathologiques (Parkinson, épilepsie, dystonie, TOC, cluster headache, ...) (Benabid et al 2002) ou expérimentale (modification du régime alimentaire chez le rat par stimulation du noyau Ventro-Médian Hypothalamique, réduction des symptômes parkinsoniens chez le singe ayant reçu une injection intracarotidienne de MPTP (Benazzouz et al, 1992).

L’existence d’une inhibition de l’activité neuronale est observée à l’arrêt de la stimulation, dans le noyau stimulé comme dans ses structures cibles, en accord avec la structure du réseau neuronal concerné. Cette inhibition est observée chez l’animal normal (Benazzouz et al 1993 ; Braud et al 1996 ; Beurrier et al, 1997 ; 1999 ; Benabid et al 2001) comme sur des tranches de cerveau en perfusion (Beurrier et al 2001, Maganinos-Ascone et al 2002). Bien que ces données soient compatibles, ou en faveur, de l’hypothèse inhibitrice, elles ne peuvent en être la démonstration car observées après la stimulation durant laquelle l’artefact occulte ce qui se passe.

- La suppression de l’activité neuronale membranaire :

L’enregistrement per-opératoire des activités neuronales dans le noyau stimulé montre qu’entre les artefacts, il existe un silence neuronal, dépendant de la fréquence, dans le Pallidum (Dostrovsky et al 1993, Penna et al 1998), et dans le STN. (Pahapill et al 1999 ; Welter et al 2004). La SHF inhibe la majorité des cellules du NST, mais aussi excite certaines cellules ou leurs prolongements. Ces données sont comparables à celles obtenues dans des circonstances similaires avec des microinjections de lidocaine ou de l’agoniste GABA muscimol.

L’extinction de l’activité neuronale membranaire sur des tranches de cerveau

La SHF du NST sur des tranches de cerveau perfusées montre la suppression de l’activité neuronale spontanée et l’apparition de longs silences entrecoupés de « burst » à la fréquence de la stimulation (Garcia et al, 2003). Ce travail a l’intérêt de montrer que l’effet n’est pas une inhibition synaptique par le CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxealine-2,3-dione, qui blocage sélectivement les récepteur AMPA) mais est d’origine membranaire au niveau des canaux sodiques voltage-dépendants (inhibition de l’effet de la SHF par la TTX). Ce travail est compatible avec l’hypothèse de l’inhibition de la genèse de potentiel d’action sur la

membrane du corps cellulaire mais suggère que des potentiels d'action sont initiés au niveau de l'axone efférent. Il pose le problème de l'effet de ces potentiels d'action au niveau de la jonction STN-GPi.

L'induction d'activités neuronales de type excitateur dans le noyau cible du noyau stimulé chez le singe traité par MPTP, la SHF de NST améliore les symptômes parkinsoniens et induit des activités neuronales extracellulaires des neurones pallidaux (GPe et Gpi) en même temps (Hashimoto et al, 2003). Cette activité est différente de l'activité neuronale spontanée et présente une combinaison de périodes inhibitrices entrecoupées aussi de « burst », l'ensemble du pattern étant dépendant de la fréquence. Ce travail est compatible avec l'hypothèse que la SHF inhibe les activités neuronales du STN et qu'elle induit néanmoins un effet excitateur au niveau de la structure suivante. Le fait que ce travail a été fait avec une électrode DBS identique à celle utilisée chez le malade ne permet pas d'éliminer que ces activités excitatrices soient initiées au voisinage même de NST par une diffusion du courant de stimulation à la structure suivante.

Il existe une évidence expérimentale indirecte par le fait que les effets prédictibles dans le cadre de l'hypothèse inhibitrice sont effectivement obtenus :

Ainsi, dans l'hypothèse où la production de Glutamate par le NST participe au processus neurodégénératif de la MP, nous avons montré (Wallace et al, 2004) que la SHF continue du NST chez le singe MPTP, protège les cellules dopaminergiques dans un rapport 1,2/1 par rapport au côté non traité, ce qui est identique à la protection obtenue par la subthalamotomie et confirme les résultats obtenus chez le rat 6-OHDA avec une lésion du NST (Piallat et al, 1996) (Shi et al 2004). Similitude ne signifie pas preuve, néanmoins ces

résultats constituent une circonstance supplémentaire où l'hypothèse concorde avec les résultats et consolident de ce fait le faisceau d'arguments en sa faveur.

Observation par microdialyse que la SHF de NST augmente les taux de Glutamate dans la SNr chez le rat normal et le rat 6-OHDA. (Bruet et al 2001; Windels et al 2000, 2003).

Le dosage par microdialyse du Glutamate et du GABA lors de la SHF du SNr montre une élévation de ces deux neurotransmetteurs qui serait plutôt en faveur de l'hypothèse d'un effet excitateur de cette SHF. La faible résolution spatiale, due à la taille de la sonde par rapport à celle de la SNr ne permet pas de retenir une valeur localisatrice certaine de ces données. De surcroît, la cinétique des effets observés (élévation de la production de ces neurotransmetteurs bien au-delà de la durée de la stimulation) ne correspond pas du tout à celle des effets cliniques de la SHF chez l'homme. Du fait des limites intrinsèques de la microdialyse, les résultats de cette méthode ne pourront être pris en considération que quand des contrôles de qualité suffisants auront été exécutés.

L'expérimentation qui fait l'objet de cette thèse a donc été conçue en vue d'apporter des éléments qui permettent de comprendre ce qui se passe au niveau synaptique et post-synaptique, en aval des fibres stimulées dans l'environnement de NST autour du site de stimulation (voir figure IV-6).

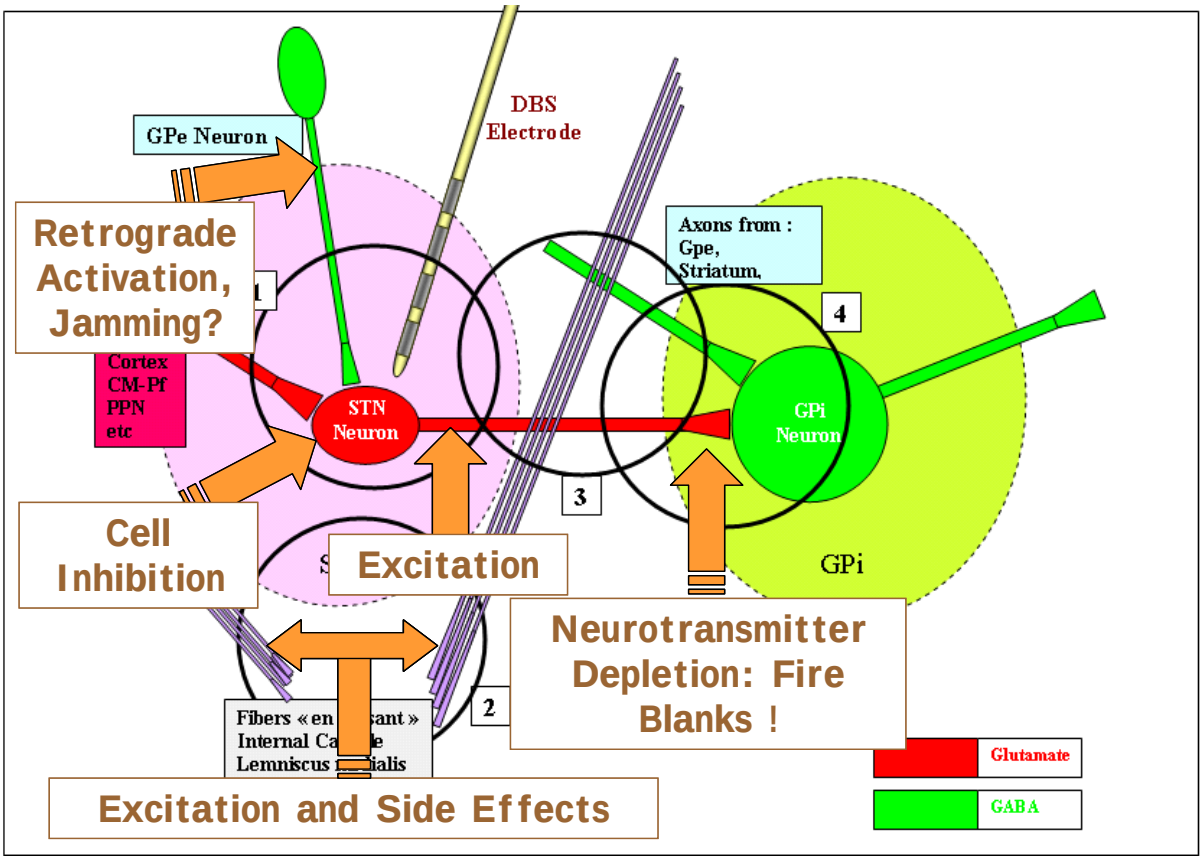


Figure IV - 6 : *Intégration des différents mécanismes de la SHF*

Les données moléculaires rapportées ici, comme les effets observés à long terme par le groupe de Kerkerian-Le Goff montrent que l'impact de la SHF dépasse largement ce débat inhibition/activation pour renvoyer à une véritable reprogrammation de l'expression génique et protéique. Des mécanismes nouveaux ont pu être mis en évidence comme celui de l'inhibition de la synthèse protéique dont nous avons pu montrer la relevance par des expériences réalisées aussi in vivo. L'analyse transcriptomique ouvre cependant aussi à d'autres mécanismes tout aussi intéressants, qu'il faudra confirmer à la fois aux niveaux protéomique, fonctionnels *in vitro* comme *in vivo.*

BIBLIOGRAPHIE

Agid, Y. (1991). "Parkinson's disease: pathophysiology." Lancet **337**(8753): 1321-4

Agid, Y. and J. Blin (1987). "Nerve cell death in degenerative diseases of the central nervous system: clinical aspects." Ciba Found Symp **126**: 3-29.

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

Anderson, M. E., N. Postupna and M. Ruffo (2003). "Effects of high-frequency stimulation in the internal globus pallidus on the activity of thalamic neurons in the awake monkey." J Neurophysiol **89**(2): 1150-60.

Anderson, T., B. Hu, Q. Pittman and Z. H. Kiss (2004). "Mechanisms of deep brain stimulation: an intracellular study in rat thalamus." J Physiol **559**(Pt 1): 301-13.

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. Dec **15**;46(4):224-34.

Bacci JJ, Absi el H, Manrique C, Baunez C, Salin P, Kerkerian-Le Goff L. “Differential effects of prolonged high frequency stimulation and of excitotoxic lesion of the subthalamic nucleus on dopamine denervation-induced cellular defects in the rat striatum and globus pallidus.” Eur J Neurosci. 2004 Dec;**20**(12):3331-41.

Bacci JJ, Kachidian P, Kerkerian-Le Goff L, Salin P. “Intralaminar thalamic nuclei lesions: widespread impact on dopamine denervation-mediated cellular defects in the rat basal ganglia.” J Neuropathol Exp Neurol. 2004 Jan;**63**(1):20-31.

Balkowiec, A. and D. M. Katz (2000). "Activity-dependent release of endogenous brain-derived neurotrophic factor from primary sensory neurons detected by ELISA in situ." J Neurosci **20**(19): 7417-23.

Balkowiec, A. and D. M. Katz (2002). "Cellular mechanisms regulating activity-dependent release of native brain-derived neurotrophic factor from hippocampal neurons." J Neurosci **22**(23): 10399-407.

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

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

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

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." Mov Disord **17 Suppl 3**: S123-9.

Benabid, A. L., A. Koudsie, A. Benazzouz, L. Vercueil, V. Fraix, S. Chabardes, J. F. Lebas and P. Pollak (2001). "Deep brain stimulation of the corpus luysi (subthalamic nucleus) and other targets in Parkinson's disease. Extension to new indications such as dystonia and epilepsy." J Neurol **248 Suppl 3**: III37-47.

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

Benabid, A. L., L. Minotti, A. Koudsie, A. de Saint Martin and E. Hirsch (2002). "Antiepileptic effect of high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus (corpus luysi) in a case of medically intractable epilepsy caused by focal dysplasia: a 30-month follow-up: technical case report." Neurosurgery **50**(6): 1385-91; discussion 1391-2.

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

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

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." Appl Neurophysiol **50**(1-6): 344-6.

Benazzouz, A., T. Boraud, P. Dubedat, A. Boireau, J. M. Stutzmann and C. Gross (1995). "Riluzole prevents MPTP-induced parkinsonism in the rhesus monkey: a pilot study." Eur J Pharmacol **284**(3): 299-307.

Benazzouz, A., T. Boraud, J. Feger, P. Burbaud, B. Bioulac and C. Gross (1996). "Alleviation of experimental hemiparkinsonism by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus in primates: a comparison with L-Dopa treatment." Mov Disord **11**(6): 627-32.

Benazzouz, A., C. Gross, J. Dupont and B. Bioulac (1992). "MPTP induced hemiparkinsonism in monkeys: behavioral, mechanographic, electromyographic and immunohistochemical studies." Exp Brain Res **90**(1): 116-20.

Benazzouz, A., C. Gross, J. Feger, T. Boraud and B. Bioulac (1993). "Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys." Eur J Neurosci **5**(4): 382-9.

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." Neurosci Lett **189**(2): 77-80.

Bertucci F, Finetti P, Rougemont J, Charafe-Jauffret E, Nasser V, Loriod B, Camerlo J, Tagett R, Tarpin C, Houvenaeghel G, Nguyen C, Maraninchi D, Jacquemier J, Houlgatte R, irnbaum D, Viens P. "Gene expression profiling for molecular characterization of inflammatory breast cancer and prediction of response to chemotherapy." Cancer Res. 2004 Dec 1;**64**(23):8558-65.

Bertucci F, Salas S, Eysteries S, Nasser V, Finetti P, Ginestier C, Charafe-Jauffret C, Loriod B, Bachelart L, Montfort J, Viictorero G, Viret F, Ollendorff V, Fert V, Giovaninni M, Delpero JR, Nguyen C, Viens P, Monges G, Birnbaum D, Houlgatte R. "Gene xpression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters." Oncogene. 2004 Feb 19;**23**(7):1377-91.

Beurrier, C., E. Bezard, B. Bioulac and C. Gross (1997). "Subthalamic stimulation elicits hemiballismus in normal monkey." Neuroreport **8**(7): 1625-9.

Beurrier, C., B. Bioulac, J. Audin and C. Hammond (2001). "High-frequency stimulation produces a transient blockade of voltage-gated currents in subthalamic neurons." J Neurophysiol **85**(4): 1351-6.

Beurrier, C., P. Congar, B. Bioulac and C. Hammond (1999). "Subthalamic nucleus neurons switch from single-spike activity to burst-firing mode." J Neurosci **19**(2): 599-609.

Bikson, M., J. Lian, P. J. Hahn, W. C. Stacey, C. Sciortino and D. M. Durand (2001). "Suppression of epileptiform activity by high frequency sinusoidal fields in rat hippocampal slices." J Physiol **531**(Pt 1): 181-91.

Bohm, S., S. Huck, H. Drobny and E. A. Singer (1991). "Electrically evoked noradrenaline release from cultured chick sympathetic neurons: modulation via presynaptic alpha-adrenoceptors and lack of autoinhibition." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **344**(1): 130-2.

Boraud, T., E. Bezard, B. Bioulac and 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." Neurosci Lett **215**(1): 17-20.

Boraud, T., E. Bezard, B. Bioulac and C. E. Gross (2000). "Ratio of inhibited-to-activated pallidal neurons decreases dramatically during passive limb movement in the MPTP-treated monkey." J Neurophysiol **83**(3): 1760-3.

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

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

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

Bruet, N., F. Windels, A. Bertrand, C. Feuerstein, A. Poupard and M. Savasta (2001). "High frequency stimulation of the subthalamic nucleus increases the extracellular contents of striatal dopamine in normal and partially dopaminergic denervated rats." J Neuropathol Exp Neurol **60**(1): 15-24.

Brundin, P., S. Dunnett, A. Bjorklund and G. Nikkhah (2001). "Transplanted dopaminergic neurons: more or less?" Nat Med **7**(5): 512-3.

Burbaud P, Gross C, Benazzouz A, Coussemacq 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.”Exp Brain Res.;**105**(1):48-58.

Cooper, I. S. (1965). "Surgical Treatment of Parkinsonism." Annu Rev Med **16**: 309-30.

Cooper, I. S., I. Amin, A. Upton, M. Riklan, S. Watkins and L. McLellan (1977). "Safety and efficacy of chronic stimulation." Neurosurgery **1**(2): 203-5.

Cooper, I. S. and G. J. Bravo (1958). "Implications of a five-year study of 700 basal ganglia operations." Neurology **8**(9): 701-7.

Dannies, P. S. and A. R. Tashjian, Jr. (1973). "Effects of thyrotropin-releasing hormone and hydrocortisone on synthesis and degradation of prolactin in a rat pituitary cell strain." J Biol Chem **248**(17): 6174-9.

De Camilli, P., D. Macconi and A. Spada (1979). "Dopamine inhibits adenylate cyclase in human prolactin-secreting pituitary adenomas." Nature **278**(5701): 252-4.

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

Dostrovsky, J. O. and A. M. Lozano (2002). "Mechanisms of deep brain stimulation." Mov Disord **17 Suppl 3**: S63-8.

Dostrovsky, J. O., G. D. Sher, K. D. Davis, A. G. Parrent, W. D. Hutchison and R. R. Tasker (1993). "Microinjection of lidocaine into human thalamus: a useful tool in stereotactic surgery." Stereotact Funct Neurosurg **60**(4): 168-74.

Dufy, B., S. Jaken and J. L. Barker (1987). "Intracellular Ca2+-dependent protein kinase C activation mimics delayed effects of thyrotropin-releasing hormone on clonal pituitary cell

excitability." Endocrinology **121**(2): 793-802.

Ehringer, H. and O. Hornykiewicz (1960). "[Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]." Klin Wochenschr **38**: 1236-9.

Eisen, M. B., P. T. Spellman, P. O. Brown and D. Botstein (1998). "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(25): 14863-8.

Elias, K. A., R. I. Weiner and S. H. Mellon (1990). "Effect of extracellular matrix on prolactin secretion and mRNA accumulation in GH3 cells." DNA Cell Biol **9**(5): 369-75.

Enjalbert, A. and J. Bockaert (1983). "Pharmacological characterization of the D2 dopamine receptor negatively coupled with adenylate cyclase in rat anterior pituitary." Mol Pharmacol **23**(3): 576-84.

Espina, V., K. A. Dettloff, S. Cowherd, E. F. Petricoin, 3rd and L. A. Liotta (2004). "Use of proteomic analysis to monitor responses to biological therapies." Expert Opin Biol Ther **4**(1): 83-93.

Evans, G. J. and J. M. Pocock (1999). "Modulation of neurotransmitter release by dihydropyridine-sensitive calcium channels involves tyrosine phosphorylation." Eur J Neurosci **11**(1): 279-92.

Fekete, M. I., J. P. Herman, B. Kanyicska and G. B. Makara (1980). "Electrical stimulation of the median eminence in rats, changes in catecholamine content and in plasma prolactin and growth hormone concentrations." Life Sci **27**(11): 929-33.

Filali, M., W. D. Hutchison, V. N. Palter, A. M. Lozano and J. O. Dostrovsky (2004). "Stimulation-induced inhibition of neuronal firing in human subthalamic nucleus." Exp Brain Res.

Fukada, E. (1982). "Electrical phenomena in biorheology." Biorheology **19**(1/2): 15-27.

Fung, E., D. Diamond, A. H. Simonsesn and S. R. Weinberger (2003). "The use of SELDI ProteinChip array technology in renal disease research." Methods Mol Med **86**: 295-312.

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

Chick WL, Perna JJ, Lauris V, Low D, Galletti PM, Panol G, Whittemore AD, Like AA, Colton CK, Lysaght MJ. “Artificial pancreas using living beta cells:. effects on glucose homeostasis in diabetic rats.” Science. 1977 Aug 19;**197**(4305):780-2.

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

Gray, A., I. McNamara, T. Aziz, R. Gregory, P. Bain, J. Wilson and R. Scott (2002). "Quality of life outcomes following surgical treatment of Parkinson's disease." Mov Disord **17**(1): 68-75.

Greene, L. A. and A. S. Tischler (1976). "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(7): 2424-8.

Gross, R. E. and A. M. Lozano (2000). "Advances in neurostimulation for movement disorders." Neurol Res **22**(3): 247-58.

Guridi J, Herrero MT, Luquin R, Guillen J, Obeso JA (1994) “Subthalamotomy improves MPTP-induced parkinsonism in monkeys.” Stereotact Funct Neurosurg. **62**(1-4):98-102.

Hagell, P. and P. Brundin (2001). "Cell survival and clinical outcome following intrastriatal transplantation in Parkinson disease." J Neuropathol Exp Neurol **60**(8): 741-52.

Hamada O, Garcia-Rill E, Skinner RD. “Respiration in vitro: I. Spontaneous activity.” Somatosens Mot Res. 1992;**9**(4):313-26.

Hamada O, Garcia-Rill E, Skinner RD. “Respiration in vitro: II. Electrical stimulation.” Somatosens Mot Res. 1992;**9**(4):327-37.

Hamani, C., J. A. Saint-Cyr, J. Fraser, M. Kaplitt and A. M. Lozano (2004). "The subthalamic nucleus in the context of movement disorders." Brain **127**(Pt 1): 4-20.

Hammond, C., B. Rouzaire-Dubois, J. Feger, A. Jackson and A. R. Crossman (1983). "Anatomical and electrophysiological studies on the reciprocal projections between the subthalamic nucleus and nucleus tegmenti pedunculopontinus in the rat." Neuroscience **9**(1): 41-52.

High-frequency stimulation of the entopeduncular nucleus improves dystonia in dtsz hamsters.” Neuroreport. 2004 Jun **28**;15(9):1391-3.

Harnack D, Winter C, Meissner W, Reum T, Kupsch A, Morgenstern R. “The effects of electrode material, charge density and stimulation duration on the safety of high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus in rats.” J Neurosci Methods. 2004 Sep **30;**138(1-2):207-16.

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

Hashimoto, T., C. M. Elder and J. L. Vitek (2002). "A template subtraction method for stimulus artifact removal in high-frequency deep brain stimulation." J Neurosci Methods **113**(2): 181-6.

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.

Jr, G. W., L. H. Cazares, S. M. Leung, S. Nasim, B. L. Adam, T. T. Yip, P. F. Schellhammer, L. Gong and A. Vlahou (1999). "Proteinchip(R) surface enhanced laser desorption/ionization (SELDI) mass spectrometry: a novel protein biochip technology for detection of prostate cancer biomarkers in complex protein mixtures." Prostate Cancer Prostatic Dis **2**(5/6): 264-276.

Kimura, K., Y. Yanagida, T. Haruyama, E. Kobatake and M. Aizawa (1998). "Electrically induced neurite outgrowth of PC12 cells on the electrode surface." Med Biol Eng Comput **36**(4): 493-8.

Kiss, Z. H., D. M. Mooney, L. Renaud and B. Hu (2002). "Neuronal response to local electrical stimulation in rat thalamus: physiological implications for mechanisms of deep brain stimulation." Neuroscience **113**(1): 137-43.

Klapstein GJ, Fisher RS, Zanjani H, Cepeda C, Jokel ES, Chesselet MF, Levine MS. “Electrophysiological and morphological changes in striatal spiny neurons in R6/2 Huntington's disease transgenic mice.” J Neurophysiol. 2001 Dec;**86**(6):2667-77.

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

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

Krack, P., P. Pollak, P. Limousin, D. Hoffmann, J. Xie, A. Benazzouz and A. L. Benabid (1998). "Subthalamic nucleus or internal pallidal stimulation in young onset Parkinson's disease." Brain **121 (Pt 3)**: 451-7.

Leone, M., A. May, A. Franzini, G. Broggi, D. Dodick, A. Rapoport, P. Goadsby, J. Schoenen, V. Bonavita and G. Bussone (2004). "Deep brain stimulation for intractable chronic cluster headache: proposals for patient selection." Cephalalgia **24**(11): 934-7.

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

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

Lozano, A. M., J. Dostrovsky, R. Chen and P. Ashby (2002). "Deep brain stimulation for Parkinson's disease: disrupting the disruption." Lancet Neurol **1**(4): 225-31.

Lozano, A. M. and C. Hamani (2004). "The future of deep brain stimulation." J Clin Neurophysiol **21**(1): 68-9.

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

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.

Malgaroli, A., L. Vallar, F. R. Elahi, T. Pozzan, A. Spada and J. Meldolesi (1987). "Dopamine inhibits cytosolic Ca2+ increases in rat lactotroph cells. Evidence of a dual mechanism of action." J Biol Chem **262**(29): 13920-7.

Mallet, L., V. Mesnage, J. L. Houeto, A. Pelissolo, J. Yelnik, C. Behar, M. Gargiulo, M. L. Welter, A. M. Bonnet, B. Pillon, P. Cornu, D. Dormont, B. Pidoux, J. F. Allilaire and Y. Agid (2002). "Compulsions, Parkinson's disease, and stimulation." Lancet **360**(9342): 1302-4.

Marin, P., K. L. Nastiuk, N. Daniel, J. A. Girault, A. J. Czernik, J. Glowinski, A. C. Nairn and J. Premont (1997). "Glutamate-dependent phosphorylation of elongation factor-2 and inhibition of protein synthesis in neurons." J Neurosci **17**(10): 3445-54.

McIntyre, C. C. and W. M. Grill (2001). "Finite element analysis of the current-density and electric field generated by metal microelectrodes." Ann Biomed Eng **29**(3): 227-35.

McIntyre, C. C., S. Mori, D. L. Sherman, N. V. Thakor and J. L. Vitek (2004). "Electric field and stimulating influence generated by deep brain stimulation of the subthalamic nucleus." Clin Neurophysiol **115**(3): 589-95.

McIntyre, C. C., M. Savasta, L. Kerkerian-Le Goff and J. L. Vitek (2004). "Uncovering the mechanism(s) of action of deep brain stimulation: activation, inhibition, or both." Clin Neurophysiol **115**(6): 1239-48.

Mitchell, I. J., A. J. Cross, M. A. Sambrook and A. R. Crossman (1986). "N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in the monkey: neurochemical pathology and regional brain metabolism." J Neural Transm Suppl **20**: 41-6.

Montgomery, E. B., Jr. and K. B. Baker (2000). "Mechanisms of deep brain stimulation and future technical developments." Neurol Res **22**(3): 259-66.

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

Nuttin, B., P. Cosyns, H. Demeulemeester, J. Gybels and B. Meyerson (1999). "Electrical stimulation in anterior limbs of internal capsules in patients with obsessive-compulsive disorder." Lancet **354**(9189): 1526.

Ozawa, S. and S. I. Miyazaki (1979). "Electrical excitability in the rat clonal pituitary cell and its relation to hormone secretion." Jpn J Physiol **29**(4): 411-26.

Pahapill, P. A., R. Levy, J. O. Dostrovsky, K. D. Davis, A. R. Rezai, R. R. Tasker and A. M. Lozano (1999). "Tremor arrest with thalamic microinjections of muscimol in patients with essential tremor." Ann Neurol **46**(2): 249-52.

Penna, A. M., S. Y. Lee, L. Scheidegger da Silva, R. W. Oliveira, C. de Freitas Gomes and E. M. Nakamura Palacios (1998). "Behavioral and cognitive effects produced by electrical stimulation in the medial prefrontal cortex: an experimental model for high cortical activation." Neuropsychobiology **38**(4): 241-50.

Piallat, B., A. Benazzouz and A. L. Benabid (1996). "Subthalamic nucleus lesion in rats prevents dopaminergic nigral neuron degeneration after striatal 6-OHDA injection: behavioural and immunohistochemical studies." Eur J Neurosci **8**(7): 1408-14.

Pollak, P. (1997). "[Mechanisms and treatments of Parkinson disease]." Rev Prat **47**(10): 1068-76.

Pollak, P., A. L. Benabid, C. Gross, D. M. Gao, A. Laurent, A. Benazzouz, D. Hoffmann, M. Gentil and J. Perret (1993). "[Effects of the stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson disease]." Rev Neurol (Paris) **149**(3): 175-6.

Re DB, Nafia I, Nieoullon A, Le Goff LK, Had-Aissouni L.”[Cerebral oxidative stress: are astrocytes vulnerable to low intracellular glutamate concentrations? Consequences for neuronal viability.]” Ann Fr Anesth Reanim. 2005 May;**24**(5):502-509. French. Reddy, G. and E. A. Dalmasso (2003). "SELDI ProteinChip(R) Array Technology: Protein-Based Predictive Medicine and Drug Discovery Applications." J Biomed Biotechnol **2003**(4): 237-241.

Riechert, T., H. Kapp, J. U. Krainick, C. L. Schmidt and U. Thoden (1973). "[Operative therapy of chronic pain by electric stimulation of the dorsal column]." Dtsch Med Wochenschr **98**(22): 1130-1.

Rossini, A., M. Zaniboni, F. Cacciani, D. Stilli and E. Musso (2001). "[Simultaneous measurements of electrical coupling and action potential transfer in pairs of ventricular cardiomyocytes]." Acta Biomed Ateneo Parmense **72**(5-6): 83-9.

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." J Neurosci **22**(12): 5137-48.

Saphier, D. (1993). "Electrophysiology and neuropharmacology of noradrenergic projections to rat PVN magnocellular neurons." Am J Physiol **264**(5 Pt 2): R891-902.

Schweitzer, E. S., M. J. Sanderson and C. G. Wasterlain (1995). "Inhibition of regulated catecholamine secretion from PC12 cells by the Ca2+/calmodulin kinase II inhibitor KN-62." J Cell Sci **108 (Pt 7)**: 2619-28.

Shen, K. Z., Z. T. Zhu, A. Munhall and S. W. Johnson (2003). "Synaptic plasticity in rat subthalamic nucleus induced by high-frequency stimulation." Synapse **50**(4): 314-9.

Shi, L. H., D. J. Woodward, F. Luo, K. Anstrom, T. Schallert and J. Y. Chang (2004). "High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus reverses limb-use asymmetry in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions." Brain Res **1013**(1): 98-106.

Siegfried, J. and 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.

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

Trendelenburg, A. U., E. G. Gaiser, S. L. Cox, A. Meyer and K. Starke (1999). "Mouse postganglionic sympathetic neurons: primary culturing and noradrenaline release." J Neurochem **73**(4): 1431-8.

Traumann KJ, Hosl W, Grom E, Wittemann G. “[Insulin plus sulphonyl-urea compounds in the treatment of diabetes mellitus of the maturity-onset type (author's transl)]” Dtsch Med Wochenschr. 1982 Feb 5;107(5):180-4. German.

Urbano, F. J., M. D. Rosato-Siri and O. D. Uchitel (2002). "Calcium channels involved in neurotransmitter release at adult, neonatal and P/Q-type deficient neuromuscular junctions (Review)." Mol Membr Biol **19**(4): 293-300.

Vitek, J. L. (2002). "Mechanisms of deep brain stimulation: excitation or inhibition." Mov Disord **17 Suppl 3**: S69-72.

Wallace, B. A., K. Ashkan and A. L. Benabid (2004). "Deep brain stimulation for the treatment of chronic, intractable pain." Neurosurg Clin N Am **15**(3): 343-57

Weinberger, S. R., T. S. Morris and M. Pawlak (2000). "Recent trends in protein biochip technology." Pharmacogenomics **1**(4): 395-416.

Wellmann, A., V. Wollscheid, H. Lu, Z. L. Ma, P. Albers, K. Schutze, V. Rohde, P. Behrens, S. Dreschers, Y. Ko and N. Wernert (2002). "Analysis of microdissected prostate tissue with ProteinChip arrays--a way to new insights into carcinogenesis and to diagnostic tools." Int J Mol Med **9**(4): 341-7.

Welter, M. L., J. L. Houeto, A. M. Bonnet, P. B. Bejjani, V. Mesnage, D. Dormont, S. Navarro, P.

Cornu, Y. Agid and B. Pidoux (2004). "Effects of high-frequency stimulation on subthalamic neuronal activity in parkinsonian patients." Arch Neurol **61**(1): 89-96.

Windels, F., N. Bruet, A. Poupard, C. Feuerstein, A. Bertrand and M. Savasta (2003). "Influence of the frequency parameter on extracellular glutamate and gamma-aminobutyric acid in substantia nigra and globus pallidus during electrical stimulation of subthalamic nucleus in rats." J Neurosci Res **72**(2): 259-67.

Windels, F., N. Bruet, A. Poupard, N. Urbain, G. Chouvet, C. Feuerstein and M. Savasta (2000). "Effects of high frequency stimulation of subthalamic nucleus on extracellular glutamate and GABA in substantia nigra and globus pallidus in the normal rat." Eur J Neurosci **12**(11): 4141-6.

Wu, Y. R., R. Levy, P. Ashby, R. R. Tasker and J. O. Dostrovsky (2001). "Does stimulation of the GPi control dyskinesia by activating inhibitory axons?" Mov Disord **16**(2): 208-16.

Yip, T. T. and L. Lomas (2002). "SELDI ProteinChip array in oncoproteomic research." Technol Cancer Res Treat **1**(4): 273-80.

PUBLICATION

Alteration of Hormone and Neurotransmitter Production in Cells by High and Low Frequency Electrical Stimulation

For Review Only

Journal:	*Movement Disorders*
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Xia, Rong; Shanghai Second Medical University, Anatomy Department Berger, François; Inserm U318, Université Joseph Fourier, Preclinical Neurosciences Piallat, Brigitte; Inserm U318, Université Joseph Fourier, Preclinical Neurosciences Benabid, Alim-Louis; Inserm U318, Université Joseph Fourier, Preclinical Neurosciences
Keywords:	Parkinson disease, high-frequency electrical stimulation, cell culture, prolactin, catecholamine, inhibition

powered by ScholarOne Manuscript Central™

Alteration of Hormone and Neurotransmitter Production in Cells by High and Low Frequency Electrical Stimulation

Rong Xia, PhD [+], François Berger, MD, PhD, Brigitte Piallat, PhD, Alim-Louis Benabid, MD, PhD*

INSERM U318, Université Joseph Fourier, CHU Albert Michallon, Pavillon B, BP 217, F-38043 Grenoble Cedex 9, France

[+]**Present address:**

Anatomy Department, Shanghai Second Medical University,

280 Chong Qing Nan Lu Road, 200025, Shanghai, China

***Correspondence to:**

Professor Alim-Louis Benabid, INSERM U318, Pavillon B, CHU Albert Michallon, BP 217, F-38043 Grenoble Cedex 9, France.

Tel: +33 4 76 76 56 25; Fax: +33 4 76 76 56 19 ; Email:

Alim-Louis.Benabid@ujf-grenoble.fr

Word count: 4850, excluding tables and figures

Running head: LFS/HFS: HORMONE/NEUROTRANSMITTER PRODUCTION

For Peer Review

ABSTRACT

This study investigated the cellular effects of high- and low-frequency electrical stimulation on prolactin secretion in the GH3 cell line (prolactinoma) and on catecholaminergic secretion by PC12 cells (pheochromocytoma). The aim was to elucidate events, unrelated to the network organization of cells or neurons, that contribute to the mechanisms of action of high-frequency electrical stimulation (HFS).

Cells were cultured in dishes with integrated electrodes that delivered stimulation at the same parameters used in the treatment of Parkinson's disease. After 3 and 24 hours of stimulation, prolactin production by GH3 cells was measured by radioimmunoassay; dopamine, norepinephrine and epinephrine production by PC12 cells was measured by enzyme immunoassays.

After 3 and 24 hours, HFS inhibited prolactin secretion by 14% and 40%, respectively. Similarly, dopamine production was reduced by 33%, norepinephrine by 27%, and epinephrine by 18% (not significant) after 24 hours of HFS. Low-frequency stimulation (LFS) did not induce any significant changes.

In this model, which is not complicated by network interactions or presynaptic actions, HFS inhibits cellular mechanisms responsible for the production and release of molecules participating in intercellular communication. Such inhibition could contribute to the lesion-like effect of therapeutic HFS in the basal ganglia in various movement disorders.

Key words: Parkinson's disease; high-frequency electrical stimulation; cell culture; prolactin; catecholamine; inhibition

For Peer Review

INTRODUCTION

Electrical stimulation has been used for decades in neurosurgery to treat functional disorders, using electrodes placed on the skin (TENS [transcutaneous electrical nerve stimulation]), nerves, spinal cord, or even within the deep brain structures, for which the term deep brain stimulation (DBS) was first coined. The main indication for such therapy has been pain, and the rationale for this approach was based upon the Gate Control Theory.[1] This theory claimed that chronic pain secondary to limb amputations, nerve injuries, or spinal cord lesions was due to an imbalance between the nociceptive high-threshold inputs (carried by nonmyelinated small nerve C fibers) and the low-threshold touch and proprioceptive inputs (carried by myelinated larger diameter Aδ and Aβ fibers). This imbalance was responsible for a dysfunction in a control system supported by metenkephalinergic interneurons at the level of the layer V in the dorsal horn of the spinal cord. The imbalance, as well as the resulting dysfunction, could be compensated for by electrical stimulation at low frequency, which would preferentially excite large myelinated fibers (which have a lower threshold than the small C fibers). The resulting beneficial therapeutic effect was considered to result from the excitatory effects of low-frequency electrical stimulation (LFS).

During the past two decades, another application for electrical stimulation has been developed and validated. Chronic DBS at high frequency (> 100 Hz), but not at low frequency, of the basal ganglia (including the ventrointermedial thalamic nucleus [Vim], the internal pallidum [GPi], and the subthalamic nucleus [STN]), has been shown to be an effective therapeutic option for advanced Parkinson's disease (PD).[2–4] High-frequency stimulation (HFS) (usually around 130 Hz) of these three targets (Vim, GPi, and STN [which are hyperactive and have an irregular and bursting temporal pattern of firing])

For Peer Review

consistently produces effects that are similar to those induced by electrolytic lesion (electrocoagulation) or by chemical destruction in laboratory animals. Indeed, electrocoagulation was the surgical tool used in stereotactic surgery for movement disorders in the pre-levodopa era. This paradoxical lesion-like effect of electrical stimulation, otherwise considered as excitatory for neural elements, led to the hypothesis that HFS could be inhibitory. This is in contrast to LFS, which is commonly regarded as excitatory. We have assumed that HFS results in a functional inhibition of stimulated neuronal structures.

Although a large number of studies have been performed, and many are ongoing, since the introduction of HFS,[5] the mechanism of action of HFS remains obscure. Several hypotheses have been proposed, which may be covalid. The hypothesis that HFS may inhibit neuronal firing was derived from clinical observations and electrophysiological studies describing decreased neuronal activity in the substantia nigra pars reticulata (SNr) and entopeduncular nucleus (equivalent to the GPi in primates) following STN stimulation in rats.[6,7] From the beginning of the use of HFS of Vim for the treatment of PD tremor in humans, we have proposed that HFS induces neuronal or network jamming, suppressing thalamo-cortical oscillations.[8] This jamming could lead to a zero variance of the neuronal message.[9] Other mechanisms may involve presynaptic excitation of inhibitory gamma-aminobutyric acid (GABA)ergic terminals, exhaustion of synaptic transmission, or a multiple-step cascade of excitations leading ultimately to a result equivalent to that which could be produced by lesion of the system.

Most experimental data have been gathered from neuronal recordings from both living animals (in vivo) and brain slices (in vitro). However, these experiments are difficult to interpret, due to electrical artifacts. Although this difficulty is now being

For Peer Review

circumvented by increasingly efficient artifact suppression methods, it continues to be a significant obstacle.[10–12]

There appears to be, at least, a consensus that fibers, including axons, are excited at LFS as well as HFS. Therefore, even if it is accepted that HFS inhibits somata and the generation of action potentials during stimulation, the possibility that axons exiting from these cell bodies could be excited during their course within the stimulated area has to be considered. Spikes thereby elicited would transmit their message (namely excitation in the case of excitatory synapses such as the glutamatergic subthalamo-pallidal synapses within the GPi) when they reach the next synapse, during STN stimulation.

To investigate this hypothesis, we have designed experiments using the electrical stimulation of cells in culture, in which the final functional activity of cells can be monitored through their chemical output (hormones if the cells are glandular, neurotransmitters if the cells are neuron-like). The reductionist aspect of this approach was aimed at overcoming the electrical artifacts and the lack of spatial resolution that complicate electrophysiological methods[10–12] and the use of microdialysis in vivo,[13,14] respectively.

We first investigated prolactin secretion in GH3, a prolactinoma cell line, and compared the effects of HFS to those of chemical stimulation by the prolactin inhibitory factor dopamine. Second, we investigated the effect of HFS on catecholaminergic secretion in PC12, a neuron-like pheochromocytoma cell line.

The present study was part of a larger research program designed to understand the events taking place during HFS at the cellular level, and to provide a way in which the global and probably multiple mechanisms reported in vivo can be understood.

For Peer Review

METHODS

Cells

The two types of cells used in this experiment were purchased from ATCC (American Type Culture Collection, VA, USA). The GH3 cell clone (passage number 7–20) was derived from a rat pituitary tumor (prolactinoma). The PC12 cell line was derived from a rat pheochromocytoma.[15,16] Both cell lines were maintained, for culture and stimulation, in a humidified atmosphere of 5% CO_2 and 95% O_2 in an incubator at 37°C. Culture media were Ham's F10 medium (Cambrex Bio Science, NJ, USA) for GH3 cells, and Rosewell Memorial Park Institute (RPMI) 1640 84% (BioWhittaker, NJ, USA) for PC12 cells. Both were supplemented with 15% horse serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 2.5% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (BioWhittaker).

Electrical Stimulation of Cells in Culture

The experimental set-up was modified from systems already used and reported in the literature.[17–19] Briefly, for all experiments (control, dopamine stimulation, electrical stimulation), cells were plated in wells (16-mm diameter, 24-well plastic culture trays; NUNC PolyLab, France) at a density of 5.0×10^5 cells per well. Two adjacent culture wells were connected to each other through a titanium wire (World Precision Instruments [WPI], Sarasota, FL, USA) that conducted an electrical current (titanium bridge). A series of 12 contiguous wells was connected to a stimulator (A310 Accupulser and A360 Stimulus Isolator; WPI) through titanium electrodes. The electrical stimulation parameters were controlled using an oscilloscope (Tektronix, Inc., Beaverton, OR, USA).

For Peer Review

The electrical stimulation replicated the protocol used in human clinical situations: continuous monophasic stimulation at 130 Hz (HFS) and 10 Hz (LFS), 60 µsec pulse width, and a current intensity of 500 µA. Pilot experiments showed that electrical stimulation of GH3 endocrine cells could be performed within the 0.1–1 mA range without damage to the cells. To study the effect of frequency, experiments were performed at 0 Hz (control), 10 Hz (LFS), and 130 Hz (HFS). Cells were stimulated for 3 and 24 hours under each of the three experimental conditions.

Before each experiment, cells were harvested from the source culture vial using trypsin-EDTA (GIBCO, Cergy Pontoise, France), resuspended in fresh culture medium, and plated in 24-well trays equipped with titanium wires. Chemical stimulation of GH3 cells with the prolactin inhibitory factor dopamine (3-hydroxytyramine hydrochloride; Sigma-Aldrich) was used as an internal control for prolactin inhibition. Prior to the dopamine stimulation experiments, dopamine 0.1 mM or 0.01 mM was added to the medium. Control cells received neither electrical nor dopamine stimulation but were plated at the same density in 24-well trays.

Cell viability was determined by the dye-exclusion method using 0.4% trypan blue, and was also confirmed after 3 and 24 hours using 2 mM WST-1 [2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt] (Sigma-Aldrich) for GH3 cells, and 0.5 mg/ml MTT (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, thiazolyl blue) (Sigma-Aldrich), for PC12 cells.

Biochemical Assays for Prolactin, Dopamine, Epinephrine, and Norepinephrine

For Peer Review

At the end of each experiment, the supernatants of the incubation media were collected and immediately frozen at –80°C until assayed. Prolactin production by GH3 cells was assessed using a double antibody radioimmunoassay (Beckman Coulter, Belgium), using rat antibody to prolactin (Beckman Coulter). Materials were kindly supplied by the Department of Nuclear Medicine of the Grenoble University Hospital (Grenoble, France).

Catecholamine (dopamine, epinephrine, norepinephrine) production by PC12 cells was measured using a double antibody enzyme immunoassay (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Materials were kindly supplied by the Neurophysiology Laboratory of Grenoble University Hospital.

Data Analysis

Statistical analysis of the data from the various experiments was performed using ANOVA and Student's *t* test (comparison of the means).

RESULTS

Cell Viability

Cell viability, as determined by the dye-exclusion method, was greater than 95% at the beginning and end of each assay. No significant differences were observed between the controls and treated groups using either WST-1 or MTT ($P > 0.05$, Student's *t* test). The only exception was when GH3 cells were exposed to 0.1 mM dopamine for 24 hours, which resulted in the death of 57% of cells (results not reported).

Effects of Chemical Stimulation on Prolactin Production by GH3 Cells

For Peer Review

Incubation of GH3 cells with dopamine 0.01 mM or 0.1 mM for 3 hours reduced prolactin secretion by 9% ($P = 0.033$) and 13% ($P < 0.01$), respectively, compared with controls (Table 1). Incubation of cells with dopamine 0.01 mM for 24 hours reduced prolactin secretion by 38% ($P < 0.001$) compared with controls (Table 2; Fig. 1).

Effects of Electrical Stimulation on Prolactin Secretion by GH3 Cells

HFS of GH3 cells for 3 hours (Table 1) or 24 hours (Table 2; Figure 1) reduced prolactin secretion by 14% ($P < 0.01$) and 40% ($P < 0.001$), respectively.

Prolactin secretion by GH3 cells following LFS for 3 or 24 hours did not differ significantly from that in control cells (Tables 1 and 2).

When the electrical (HFS) and chemical (dopamine) experiments were repeated under identical conditions (i.e. at the same time in the same incubator), similar results were obtained.

Effects of Electrical Stimulation on Catecholamine Secretion by PC12 Cells

HFS of PC12 cells for 24 hours reduced the secretion of dopamine (Table 3) and norepinephrine (Table 4) by 33% ($P = 0.035$) and 27% ($P = 0.039$), respectively. Epinephrine production was also decreased (by 18%), but this did not reach statistical significance (Table 5; Fig. 2). HFS of PC12 cells for 3 hours (5 repeated experiments; data not shown) did not reduce catecholamine (dopamine, norepinephrine or epinephrine) secretion significantly compared with controls.

LFS of PC12 cells for 3 or 24 hours had no significant effect on catecholamine secretion (Tables 3–5). However, the effects of HFS and LFS for 24 hours on the

For Peer Review

production of norepinephrine and epinephrine differed significantly ($P = 0.0025$ and $P = 0.017$, respectively).

DISCUSSION

Effects of LFS and HFS on Cell Cultures

The results of this study show that HFS consistently downregulated the production of chemical compounds in two cell lines. The inhibition of prolactin by GH3 cells, and that of dopamine and norepinephrine by PC12 cells was statistically significant compared with control cells. Although HFS also inhibited epinephrine production by PC12 cells, this did not reach statistical significance. By contrast, there was a non-significant trend for LFS to increase the production of chemical compounds in the two cell lines included in this study (prolactin in GH3 cells; norepinephrine and epinephrine in PC12 cells).

GH3 cells synthesize and secrete prolactin into a chemically defined culture medium.[20] As prolactin is not degraded intracellularly or in the medium, and as prolactin is not stored in large amounts intracellularly,[21,22] extracellular production of prolactin reflects the synthesis and secretion of the hormone in GH3 cells. Inhibition of prolactin secretion by HFS was found to be of the same order of magnitude as the inhibitory effect induced by dopamine, a well known prolactin inhibitory factor. (Dopaminergic agonists such as bromocriptine are used medically to reduce the volume and secretion of pituitary prolactinomas.)

Interestingly, in our study, a significant production of epinephrine was observed in control PC12 cultures. This differs from what has been reported for the original clone from which these cells were derived.[15] Whereas the original PC12 clone contained

For Peer Review

considerable amounts of norepinephrine and dopamine, epinephrine and the enzyme phenylethanolamine-N-methyltransferase (PNMT), which catalyzes the conversion of norepinephrine to epinephrine, were not detectable. Neither could they be induced by exposure of the cells (either treated or untreated with nerve growth factor (NGF) to 10^{-4} to 10^{-6} M dexamethasone for 2 weeks, which normally regulates the levels of PNMT in the adrenal gland.[23] Although the PC12 cell line used in our study derives from PC12 clones (clone 2), it has been reported to synthesize small amounts of epinephrine.[16] In addition, dexamethasone was found to increase both the epinephrine content and the activity of PNMT.[16] These differences could be due to mutations in the cell line with increasing passage number. For example, a de-repression of the PNMT gene might have occurred between the 70th passage in 1976 (when the original clone was reported) and the passage numbers reached by the line used in this study. The coexistence of adrenergic and noradrenergic morphotypes in this cell line could be due to a rate-limiting factor that prevents PNMT from totally converting norepinephrine to epinephrine.

However, we consider this discrepancy with regard to epinephrine secretion to have no influence on the nature or meaning of our results, although it is interesting to note that epinephrine produced by our PC12 cells was neither downregulated significantly by HFS nor upregulated significantly by LFS.

Mechanism of Action of LFS and HFS on Cell Cultures

LFS is usually considered excitatory for neural elements. LFS-induced increases in the release of chemical products by cell lines is, therefore, a logical expectation, and is supported by trends observed in some of our experiments (although these increases never reached statistical significance). This lack of statistical significance in the increase in

For Peer Review

neurotransmitter and hormone production observed in our study could be due to the fact that the same current intensity was used at both LFS and HFS, possibly accounting, therefore, for a temporal summation effect (the total amount of electrical charge per unit of time being 130/10 times lower during LFS than during HFS). Higher current intensities of LFS might have produced more statistically significant results, but could also have been deleterious to the cells. These complementary experiments could not be performed, due to the fact that rat prolactin antibodies used in this study are no longer commercially available.

The decrease in the production of neurotransmitters and hormones induced by HFS, the main finding of this current study, is more difficult to explain. The mechanisms of action of HFS are currently poorly understood and are the matter of considerable debate, which involves theories based on the excitation of cell bodies, excitation of axons, jamming of neural messages in neurons and neural networks, excitation of inhibitory GABAergic terminals, etc. Such theories must take into account and be compatible with the unchallengeable fact that HFS and ablative lesions of various nuclei of the brain (STN, GPi, Vim, centrum medianum-parafascicularis nucleus, radiatio prelemniscalis, SNr, etc.), which are considered to be “targets” for functional neurosurgery, have similar and comparable effects on clinical symptoms in several diseases, particularly in movement disorders (e.g. PD, essential tremor, multiple sclerosis tremor, dystonia, tardive dystonias) and other disorders (e.g. epilepsy, obsessive compulsive disorders, cluster headache, Gilles de la Tourette syndrome, depression). This pragmatic, phenomenological analogy suggests that HFS induces a “functional inhibition”, which is probably more than a simple neuronal silencing, and might involve other phenomena, both acute and long term.

For Peer Review

Cellular and Molecular Effects of HFS in Cells in Culture

In this study, HFS, but not LFS, decreased in vitro prolactin release from GH3 cells to a degree comparable to that of the prolactin inhibitory factor dopamine at non-cytotoxic concentrations. The effect of dopamine on GH3 cells involves at least two different transduction mechanisms: inhibition of cAMP formation,[24,25] and modulation of potassium and calcium fluxes.[26,27] cAMP and dopamine produce opposite effects, the former stimulating and the latter inhibiting the synthesis of prolactin.[24] Furthermore, the majority of dopaminergic antagonists block the inhibition of pituitary adenylate cyclase by dopamine.[24,25] Finally, dopamine is known to inhibit prolactin release by modulating ion channel activity,[26–28] and HFS could also inhibit the synthesis and secretion of prolactin in GH3 cells via a similar mechanism: recent data[10] from rat brain slices have suggested the involvement of voltage-dependent ion channels in HFS.

Catecholamine production by PC12 cells has been extensively documented.[15] In the present study, a statistically significant inhibitory effect on the production of dopamine and norepinephrine, but not epinephrine, was observed with HFS after 24 but not 3 hours. By contrast, HFS was found to inhibit prolactin secretion in GH3 cells after only 3 hours. This finding of a faster inhibitory effect of HFS in GH3 than in PC12 cells could possibly be explained by the existence of a storage compartment in PC12 cells for catecholamines. Such a compartment would induce a delay in catecholamine release into the culture medium.

Membrane depolarization plays a role during electrical stimulation of neuronal cells. Tyrosine hydroxylase is one limiting enzyme of catecholamine synthesis.[29] Tyrosine hydroxylase mRNA translation is possibly inhibited by HFS during catecholamine synthesis.[30] Protein kinase C and Ca^{2+}/calmodulin kinase regulate protein

For Peer Review

synthesis and catecholamine secretion by PC12 cells.[31,32] Their role might be also altered by HFS.

Relevance of these Data to the Effects of HFS in Human Neural Networks

The current study provides additional data to help elucidate how HFS paradoxically mimics the effect of ablative lesions in several basal ganglia and related neuronal structures. Further work in this field needs to be performed to better understand the effects of HFS on the various steps of protein synthesis and release. Not only might this help elucidate the mechanisms of HFS, but it might also lead to new therapeutic applications for HFS.

Several teams are close to reaching an agreement about the opposite effects of excitation of cell bodies and excitation of the axons. Therefore, if it is the case that the somata of the glutamatergic neurons of STN are silenced by HFS, then it must also be the case that the axons originating from these somata and exiting the stimulated area in the vicinity of the electrode are excited. In these circumstances, spikes would be initiated and would travel the axons orthodromically as well as antidromically. The antidromic spikes would backfire on the soma and could account for the high frequency bursts observed during single neuron intracellular recordings in rat superfused brain slices.[10] The orthodromic spikes would travel the axons down to the synapses (in this case, the subthalamo-pallidal glutamatergic synapses); logically, this would excite the pallidal neurons, and this would be compatible with reports of increased activity in pallidal neurons in MPTP monkeys[33] exposed to STN stimulation, and with reports of increased delivery of glutamate in the entopeduncular nucleus and the SNr in normal anesthetized rats.[13,14] What happens at the level of the synapses, particularly the subthalamo-pallidal

For Peer Review

synapses, is difficult to investigate, either using electrophysiological methods, because of electrical artifacts that are difficult to suppress,[10–12,34] or microdialysis, because of the poor temporal and spatial resolution of the dialysis probes,[13,14] which make these data unreliable.

The aim of this study was to observe what happens at the level of the release of hormones or transmitters by excitable cells, assuming that phenomena similar to those observed in this situation would happen at the level of axono-neural synapses, such as those between STN to GPi and SNr. The results of the present study show that HFS may downregulate the production of some chemical products of stimulated cells. Our hypothesis is that action potentials initiated at the level of the axons originating from the neurons situated within the stimulated area travel the axon down to the synapse, but do not release neurotransmitter into the synaptic cleft. Neurotransmitter-containing vesicles are not able to release their chemical load because of downregulation of production at the level of the cell body situated in the stimulated area. The neurons therefore "fire blanks", according to the expression coined by Schuske and Jorgensen,[35] who found that glutamatergic vesicles could not be refilled by a deficient glutamate transporter. Thus, the global result of HFS within a nucleus corresponds to its functional inhibition, producing an effect equivalent to that of ablative lesion. At the same time, however, axons "de passage", which are crossing the stimulated area but originate from cell bodies situated far away from the stimulation site, are excited and deliver their normal neurotransmitter product at the level of the synapse, producing the corresponding artifacts. The synapses here are still functional and do not "fire blanks", as the cell bodies they originate from are outside the stimulated area and therefore are still able to produce the neurotransmitters required by the synapses.

For Peer Review

CONCLUSION

The present work provides evidence that HFS may downregulate neurotransmitter and/or hormone production in stimulated GH3 and PC12 cells. Although this study does not fully elucidate the mechanism of action of HFS, it demonstrates in two different cellular models that LFS has a non-significant trend to an excitatory effect, whereas HFS has a significant inhibitory effect, which is, in the case of the hormonal cell line GH3, of the same order of magnitude than that obtained with the physiological inhibitor dopamine. This downregulation may contribute to the complex events induced by HFS and lead to functional inhibition, which mimics the effects of ablative surgery in the deep brain structures. It also provides a unifying hypothesis that explains how both inhibition of the cell bodies of excitable cells and excitation of the efferent axons can still be coherent with inhibitory effects of HFS. This paper also provides an in vitro model by which to study the effects of the electrical stimulation of cells as a function of their biological properties, including their electrical excitability, and of stimulation parameters (frequency, pulse width, waveform, temporal pattern of the pulses). Further work in this field is needed to better understand the mechanisms underlying DBS.

For Peer Review

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their appreciation to the Department of Nuclear Medicine and the Neurophysiology Laboratory of the University Hospital of Grenoble, and to Dr. Bayle and Dr. Beurriand for their skilled contribution to the prolactin radioimmunassay and

catecholamine enzyme immunoassays. This work was supported by INSERM and a Medtronic fellowship (to R.X.) through INSERM.

REFERENCES

1. Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. Science 1965;150(699):971–979.

2. Benabid AL, Pollak P, Gervason C, et al. Long-term suppression of tremor by chronic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus. Lancet 1991;337(8738):403–406.

3. Limousin P, Pollak P, Benazzouz A, et al. Effect on parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. Lancet 1995;345(8942):91–95.

4. Limousin P, Krack P, Pollak P, et al. Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. N Engl J Med 1998;339(16):1105–1111.

5. Benabid AL, Pollak P, Louveau A, Henry S, de Rougemont J. Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. Appl Neurophysiol 1987;50(1-6):344–346.

6. Benazzouz A, Piallat B, Pollak P, Benabid AL. Responses of substantia nigra pars reticulata and globus pallidus complex to high frequency stimulation of the subthalamic nucleus in rats: electrophysiological data. Neurosci Lett 1995;189(2):77–80.

7. Benazzouz A, Gao DM, Ni ZG, Piallat B, Bouali-Benazzouz R, Benabid AL. Effect of high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus on the neuronal activities of the substantia nigra pars reticulata and ventrolateral nucleus of the thalamus in the rat. Neuroscience 2000;99(2):289–295.

For Peer Review

8. Benabid AL, Pollak P, Hommel M, Gaio JM, de Rougemont J, Perret J. Traitement du tremblement parkinsonien par stimulation chronique du noyau ventral intermédiaire du thalamus. Rev Neurol (Paris) 1989;145(4):320–323.

9. McIntyre CC, Grill WM, Sherman DL, Thakor NV. Cellular effects of deep brain stimulation: model-based analysis of activation and inhibition. J Neurophysiol 2004;91(4):1457–1469.

10. Garcia L, Audin J, D'Alessandro G, Bioulac B, Hammond C. Dual effect of high-frequency stimulation on subthalamic neuron activity. J Neurosci 2003;23(25):8743–8751.

11. Filali M, Hutchison WD, Palter VN, Lozano AM, Dostrovsky JO. Stimulation-induced inhibition of neuronal firing in human subthalamic nucleus. Exp Brain Res 2004;156(3):274–281.

12. Welter ML, Houeto JL, Bonnet AM, et al. Effects of high-frequency stimulation on subthalamic neuronal activity in parkinsonian patients. Arch Neurol 2004;61(1):89–96.

13. Windels F, Bruet N, Poupard A, et al. Effects of high frequency stimulation of subthalamic nucleus on extracellular glutamate and GABA in substantia nigra and globus pallidus in the normal rat. Eur J Neurosci 2000;12(11):4141–4146.

14. Bruet N, Windels F, Carcenac C, et al. Neurochemical mechanisms induced by high frequency stimulation of the subthalamic nucleus: increase of extracellular striatal glutamate and GABA in normal and hemiparkinsonian rats. J Neuropathol Exp Neurol 2003;62(12):1228–1240.

For Peer Review

15. Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Proc Natl Acad Sci USA 1976;73(7):2424–2428.

16. Byrd JC, Hadjiconstantinou M, Cavalla D. Epinephrine synthesis in the PC12 pheochromocytoma cell line. Eur J Pharmacol 1986;127(1-2):139–142.

17. Balkowiec A, Katz DM. Activity-dependent release of endogenous brain-derived neurotrophic factor from primary sensory neurons detected by ELISA in situ. J Neurosci 2000;20(19):7417–7423.

18. Balkowiec A, Katz DM. Cellular mechanisms regulating activity-dependent release of native brain-derived neurotrophic factor from hippocampal neurons. J Neurosci 2002;22(23):10399–10407.

19. Brevet A, Pinto E, Peacock J, Stockdale FE. Myosin synthesis increased by electrical stimulation of skeletal muscle cell cultures. Science 1976;193(4258):1152–1154.

20. Tashjian AH, Jr., Yasumura Y, Levine L, Sato GH, Parker ML. Establishment of clonal strains of rat pituitary tumor cells that secrete growth hormone. Endocrinology 1968;82(2):342–352.

21. Dannies PS, Tashjian AR, Jr. Effects of thyrotropin-releasing hormone and hydrocortisone on synthesis and degradation of prolactin in a rat pituitary cell strain. J Biol Chem 1973;248(17):6174–6179.

22. Haug E, Gautvik KM. Effects of sex steroids on prolactin secreting rat pituitary cells in culture. Endocrinology 1976;99(6):1482–1489.

23. Wurtman RJ, Axelrod J. Control of enzymatic synthesis of adrenaline in the adrenal medulla by adrenal cortical steroids. J Biol Chem 1966;241(10):2301–2305.

For Peer Review

24. De Camilli P, Macconi D, Spada A. Dopamine inhibits adenylate cyclase in human prolactin-secreting pituitary adenomas. Nature 1979;278(5701):252–254.

25. Enjalbert A, Bockaert J. Pharmacological characterization of the D2 dopamine receptor negatively coupled with adenylate cyclase in rat anterior pituitary. Mol Pharmacol 1983;23(3):576–584.

26. Castelletti L, Memo M, Missale C, Spano PF, Valerio A. Potassium channels involved in the transduction mechanism of dopamine D2 receptors in rat lactotrophs. J Physiol 1989;410:251–265.

27. Malgaroli A, Vallar L, Elahi FR, Pozzan T, Spada A, Meldolesi J. Dopamine inhibits cytosolic Ca2+ increases in rat lactotroph cells. Evidence of a dual mechanism of action. J Biol Chem 1987;262(29):13920–13927.

28. Thorner MO, Hackett JT, Murad F, MacLeod RM. Calcium rather than cyclic AMP as the physiological intracellular regulator of prolactin release. Neuroendocrinology 1980;31(6):390–402.

29. Haycock JW, Haycock DA. Tyrosine hydroxylase in rat brain dopaminergic nerve terminals. Multiple-site phosphorylation in vivo and in synaptosomes. J Biol Chem 1991;266(9):5650–5657.

30. Bach LA, Leeding KS. Insulin-like growth factors decrease catecholamine content in PC12 rat pheochromocytoma cells. Horm Metab Res 2002;34(9):487–491.

31. Nose PS, Griffith LC, Schulman H. Ca2+-dependent phosphorylation of tyrosine hydroxylase in PC12 cells. J Cell Biol 1985;101(4):1182–1190.

32. Schweitzer ES, Sanderson MJ, Wasterlain CG. Inhibition of regulated catecholamine secretion from PC12 cells by the Ca2+/calmodulin kinase II inhibitor KN-62. J Cell Sci 1995;108 (Pt 7):2619–2628.

For Peer Review

33. Hashimoto T, Elder CM, Okun MS, Patrick SK, Vitek JL. Stimulation of the subthalamic nucleus changes the firing pattern of pallidal neurons. J Neurosci 2003;23(5):1916–1923.

34. Hashimoto T, Elder CM, Vitek JL. A template subtraction method for stimulus artifact removal in high-frequency deep brain stimulation. J Neurosci Methods 2002;113(2):181–186.

35. Schuske K, Jorgensen EM. Neuroscience. Vesicular glutamate transporter--shooting blanks. Science 2004;304(5678):1750–1752.

For Peer Review

Figure 1

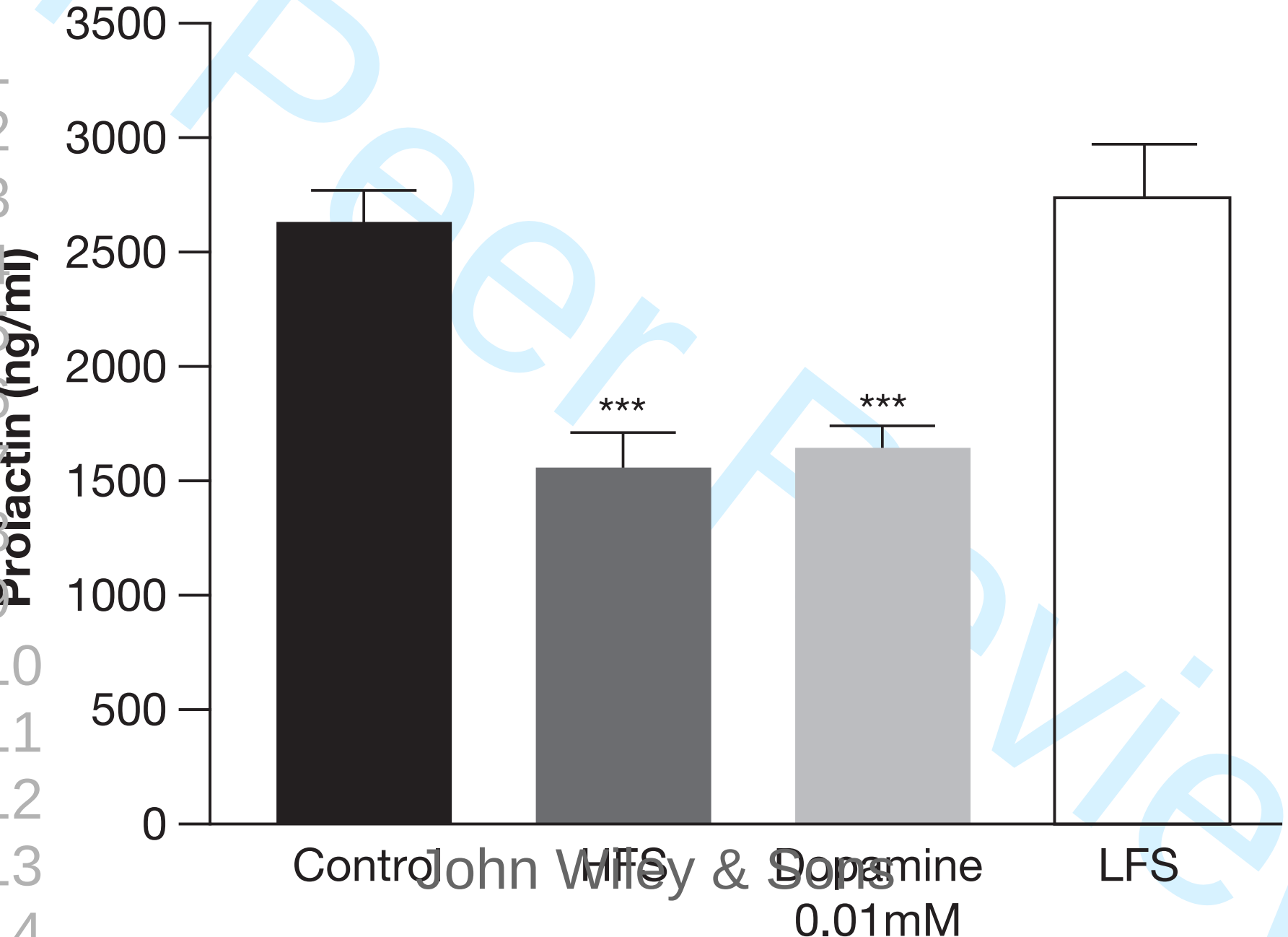
Effects of 24 hours of electrical and dopamine stimulation on prolactin secretion in GH3 cells (ng/ml). High-frequency stimulation (HFS) and dopamine 0.01 mM induced significant decreases (40% and 38%, respectively; ***$P < 0.001$) in prolactin secretion. Low-frequency stimulation (LFS) induced a non-significant increase in prolactin secretion (4%, $P = 0.16$).

Figure 2

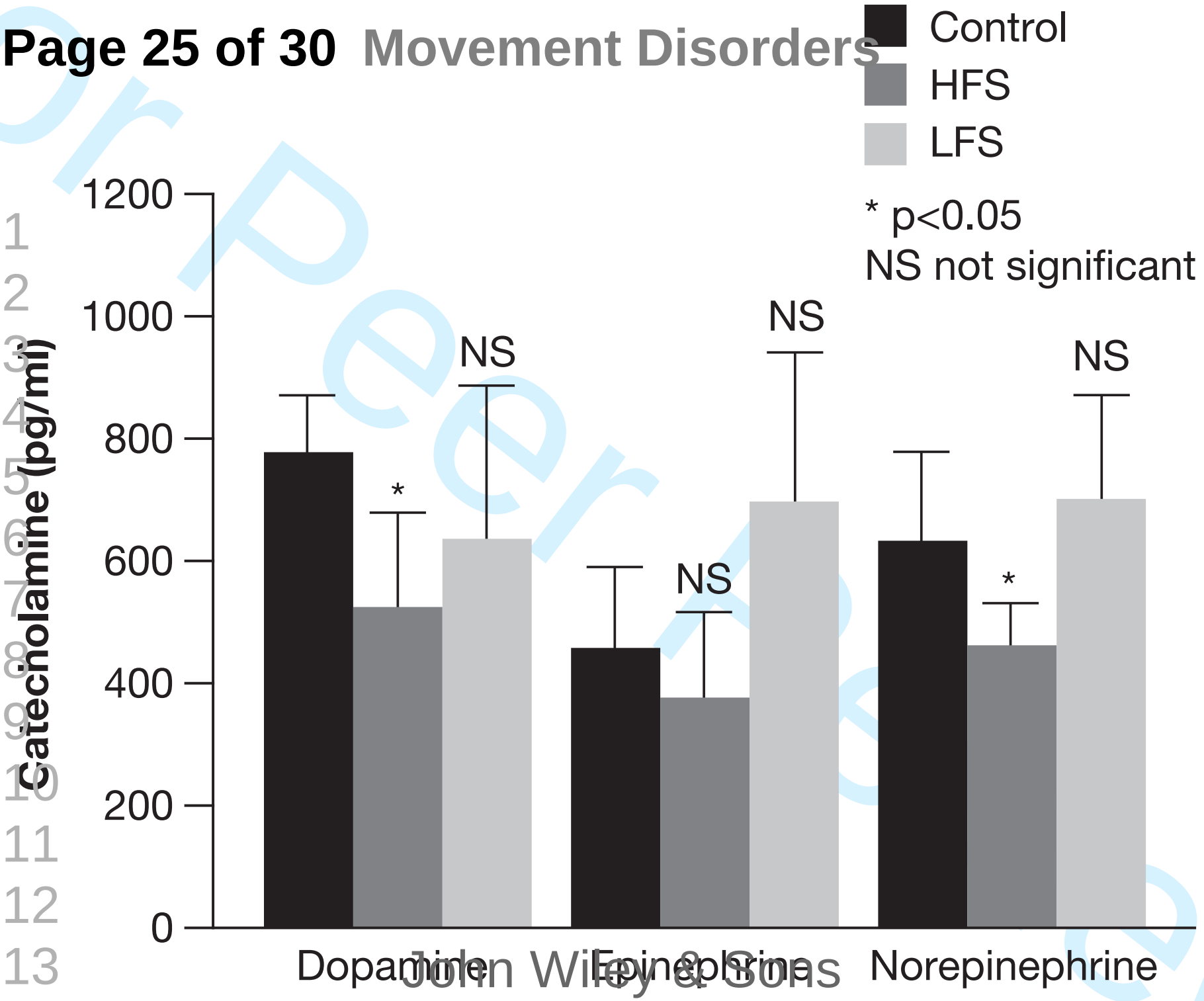
Effects of 24 hours of electrical stimulation on catecholamine secretion in PC12 cells (ng/ml). High-frequency stimulation (HFS) decreased and low-frequency stimulation (LFS) increased catecholamine secretion, but this was significant (*$P < 0.05$) only for reductions in dopamine and norepinephrine secretion with HFS. However, the effects of HFS and LFS on epinephrine and norepinephrine secretion differed significantly ($P = 0.017$ and $P = 0.0025$, respectively).

For Peer Review

*** p<0.001



John Wiley & Sons
For Peer Review



John Wiley & Sons
For Peer Review

Table 1. Prolactin secretion by GH3 cells following either incubation with dopamine or exposure to low- or high-frequency electrical stimulation (LFS or HFS, respectively) for 3 hours.

				Dopamine	
	Controls	HFS	LFS	0.1 mM	0.01 mM
Mean prolactin secretion, ng/ml	283.53	243.10	281.30	245.91	257.94
SD	39.25	17.99	30.20	18.80	23.79
N/n*	11/11	10/11	10/10	11/11	11/11
P (ANOVA)		**0.0014**	0.8526	**0.0022**	**0.0327**
Reduction in prolactin secretion vs. controls		14%	<1%	13%	9%

*N, number of experiment repeats; n, number of wells per experiment.

For Peer Review

Table 2. Prolactin secretion by GH3 cells following either incubation with dopamine or exposure to low- or high-frequency electrical stimulation (LFS or HFS, respectively) for 24 hours.

	Controls	HFS	LFS	Dopamine 0.01 mM
Mean prolactin secretion, ng/ml	2615.85	1562.51	2715.22	1633.18
SD	125.88	123.82	259.55	85.91
N/n*	11/11	11/11	11/11	11/11
P (ANOVA)		**<0.001**	0.1596	**<0.001**
Reduction in prolactin secretion vs. controls		40%	–4%	38%

*N, number of experiment repeats; n, number of wells per experiment.

For Peer Review

Table 3. Dopamine secretion by PC12 cells following exposure to low- or high-frequency electrical stimulation (LFS or HFS, respectively) for 24 hours.

	Dopamine		
	Control	HFS	LFS
Mean dopamine secretion (pg/ml)	776.86	522.80	636.77
SD	94.63	147.80	247.56
N/n*	5/12	5/12	5/12
P (ANOVA)		**0.035**	0.2373
Reduction in dopamine secretion		33%	18%

*N, number of experiment repeats; n, number of wells per experiment.

For Peer Review

Table 4. Norepinephrine secretion by PC12 cells following exposure to low- or high-frequency electrical stimulation (LFS or HFS, respectively) for 24 hours.

	Norepinephrine		
	Control	HFS	LFS
Mean norepinephrine secretion (pg/ml)	631.09	460.52	701.09
SD	145.22	72.99	176.66
N/n*	5/5	5/5	5/5
P (ANOVA)		**0.039**	0.162
Reduction in norepinephrine secretion		27%	—11%

*N, number of experiment repeats; n, number of wells per experiment.

For Peer Review

Table 5. Epinephrine secretion by PC12 cells following exposure to low- or high-frequency electrical stimulation (LFS or HFS, respectively) for 24 hours.

	Epinephrine		
	Control	HFS	LFS
Mean epinephrine secretion (pg/ml)	459.85	376.77	693.84
SD	128.06	138.82	251.80
N/n*	5/5	5/5	5/5
P (ANOVA)		0.4836	0.0645
Reduction in epinephrine secretion		18%	–51%

*N, number of experiment repeats; n, number of wells per experiment.

For Peer Review

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
C. R. Biologies 328 (2005) 177–186
COMPTES RENDUS BIOLOGIES
http://france.elsevier.com/direct/CRASS3/

Neurosciences

Therapeutic electrical stimulation of the central nervous system

Alim-Louis Benabid *, Bradley Wallace, John Mitrofanis, Celine Xia, Brigitte Piallat, Valérie Fraix, Alina Batir, Paul Krack, Pierre Pollak, François Berger

INSERM U318, université Joseph-Fourier, CHU Albert-Michallon, pavillon B, BP 217, 38043 Grenoble cedex 9, France

Available online 18 January 2005

Presented by Nicole Le Douarin & Henri Korn

Abstract

The electrical effects on the nervous system have been known for long. The excitatory effect has been used for diagnostic purposes or even for therapeutic applications, like in pain using low-frequency stimulation of the spinal cord or of the thalamus. The discovery that High-Frequency Stimulation (HFS) mimics the effect of lesioning has opened a new field of therapeutic application of electrical stimulation in all places where lesion of neuronal structures, such as nuclei of the basal ganglia, had proven some therapeutic efficiency. This was first applied to the thalamus to mimic thalamotomy for the treatment of tremor, then to the subthalamic nucleus and the pallidum to treat some advanced forms of Parkinson's disease and control not only the tremor but also akinesia, rigidity and dyskinesias. The field of application is increasingly growing, currently encompassing dystonias, epilepsy, obsessive compulsive disease, cluster headaches, and experimental approaches are being made in the field of obesity and food intake control. Although the effects of stimulation are clear-cut and the therapeutic benefit is clearly recognized, the mechanism of action of HFS is not yet understood. The similarity between HFS and the effect of lesions in several places of the brain suggests that this might induce an inhibition-like process, which is difficult to explain with the classical concept of physiology where electrical stimulation means excitation of neural elements. The current data coming from either clinical or experimental observations are providing elements to shape a beginning of an understanding. Intra-cerebral recordings in human patients with artefact suppression tend to show the arrest of electrical firing in the recorded places. Animal experiments, either in vitro or in vivo, show complex patterns mixing inhibitory effects and frequency stimulation induced bursting activity, which would suggest that the mechanism is based upon the jamming of the neuronal message, which is by this way functionally suppressed. More recent data from in vitro biological studies show that HFS profoundly affects the cellular functioning and particularly the protein synthesis, suggesting that it could alter the synaptic transmission by reducing the production of neurotransmitters. It is now clear that this method has a larger field of application than currently known and that its therapeutical applications will benefit to several diseases of the nervous system. The understanding of the mechanism has opened a new field of research, which will call for reappraisal of the basic effects of electricity on the living tissues. ***To cite this article: A.-L. Benabid et al., C. R. Biologies 328 (2005).***

© 2005 Académie des sciences. Published by Elsevier SAS. All rights reserved.

* Corresponding author.
E-mail address: alim-louis.benabid@ujf-grenoble.fr (A.-L. Benabid).

1631-0691/$ – see front matter © 2005 Académie des sciences. Published by Elsevier SAS. All rights reserved.
doi:10.1016/j.crvi.2004.10.011

Résumé

La stimulation électrique thérapeutique du système nerveux central. Les effets de l'électricité sur le système nerveux sont connus depuis longtemps. Les effets excitateurs ont été utilisés dans un but diagnostique et même pour des applications thérapeutiques, telles que le traitement de la douleur, en utilisant une stimulation à basse fréquence de la moelle épinière ou du thalamus. La découverte que la stimulation à haute fréquence (SHF) mime les effets des lésions a ouvert un nouveau champ aux applications thérapeutiques de la stimulation électrique dans toutes les zones du cerveau où la lésion de structures neuronales, telles que les noyaux de la base, pouvait avoir une certaine efficacité thérapeutique. Ceci fut appliqué pour la première fois dans le thalamus pour mimer les effets de la thalamotomie dans le traitement du tremblement, puis au niveau du noyau subthalamique et du pallidum pour traiter certaines formes avancées de la maladie de Parkinson et contrôler non seulement le tremblement, mais aussi l'akinésie, la rigidité et les dyskinésies. Le champ d'application de la SHF s'élargit régulièrement, comprenant à ce jour les dystonies, épilepsie, les troubles obsessifs compulsifs, les algies vasculaires de la face, tandis que des approches expérimentales sont faites dans le domaine de l'obésité et du contrôle de l'alimentation. Bien que les effets de la stimulation soient évidents et que le bénéfice thérapeutique soit clairement reconnu, le mécanisme d'action de la SHF reste actuellement méconnu. La similitude entre la SHF et les effets des lésions en différents endroits du cerveau suggèrent qu'elle pourrait induire un processus de type inhibition difficile à expliquer dans le cadre du concept classique de la physiologie où stimulation électrique est synonyme d'excitation des éléments nerveux. Les données actuelles en provenance, soit des observations cliniques, soit des éléments expérimentaux, fournissent des éléments permettant de façonner le début d'une explication. Les enregistrements intracérébraux chez des patients humains en utilisant des techniques de suppression d'artefacts tendent à montrer qu'il existe un arrêt de l'électrogenèse dans les endroits enregistrés. L'expérimentation animale, que ce soit in vitro in vivo, montre des *patterns* complexes associant des effets inhibiteurs et des activités en *burst* induites par la stimulation à haute fréquence qui suggérerait que le mécanisme est en partie fondé sur le brouillage d'un message neuronal, qui est de cette façon fonctionnellement supprimé. Des données plus récentes d'études biologiques in vitro montrent que la stimulation haute fréquence affecte profondément le fonctionnement cellulaire, et particulièrement la synthèse protéique, suggérant qu'elle pourrait altérer la transmission synaptique en réduisant la production de neurotransmetteurs. Il est maintenant clair que cette méthode possède un champ d'application plus large que celui actuellement connu et que les applications thérapeutiques bénéficieront à de multiples maladies du système nerveux. La compréhension des mécanismes a ouvert un nouveau champ de recherche, qui va réévaluer les effets fondamentaux de l'électricité sur les tissus vivants. ***Pour citer cet article : A.-L. Benabid et al., C. R. Biologies 328 (2005).***

© 2005 Académie des sciences. Published by Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: Parkinson's disease; Basal ganglia; Subthalamic nucleus; Deep-brain stimulation; Neuroprotection; Epilepsy; Obsessive compulsive disorders

Mots-clés : Maladie de Parkinson ; Ganglions basaux ; Noyau subthalamique ; Stimulation du cerveau profond ; Neuroprotection ; Épilepsie ; Troubles obsessionnels compulsifs

1. Introduction

Surgery and pharmacology have always been the only therapeutic tools for neurodegenerative diseases. In the field of movement disorders, surgery came first [1,2], but had complications, particularly when it was performed bilaterally. The introduction of the treatment by the Dopamine precursor LevoDopa [3] was successful in compensating the loss of production of Dopamine by the degenerated *substantia nigra pars compacta* (SNc), and eradicated surgery. However, the LevoDopa-induced dyskinesias and motor fluctuations, as well as the complications of surgery called for new methods to complement the therapeutical panel. The discovery [4] that the effects of deep-brain stimulation depend on the frequency provided such an alternative

2. Paradoxical effects of high-frequency stimulation

Electrical stimulation is usually associated to excitation of neural elements. Depolarization induced by cathodal stimulation triggers the opening of sodium voltage-dependent channels and leads to the initiation of a spike, self-reproducing and propagated along the axon in a non-decremental manner. Repetition of the

stimuli leads to an increased efficiency, due to temporal and spatial summations. This is not a linear phenomenon and the excitability of the membrane increases with frequency until an optimum above which excitability decreases again. Stimulation is used as a tool to explore the functions of neural structures, in various circumstances and particularly during surgical procedures to help defining the target.

Intraoperative thalamic stimulation abolishes Parkinsonian rest tremor at frequencies above 100 Hz.

It is during a surgery for thalamotomy in a patient with essential tremor [4], who underwent some months ago a thalamotomy on the other side, which we performed for the first time the implantation of an electrode aimed at delivering high-frequency stimulation [HFS]. The reason was that performing a bilateral thalamotomy is usually considered as bearing a higher risk of complication, particularly neuropsychological complications [5–9]. We had observed during previous surgeries that using stimulation for exploration purposes, at low and high frequency, that high frequency (i.e., higher than 100 Hz) was able to stop the tremor, while low frequency (lower than 50 Hz) was not able to stop it or was even able to drive the tremor at frequencies around 5 to 10 Hz. This observation was used for several patients in a row as an additional tool for locating the best site where to make the lesion of thalamotomy. The idea came quickly that this could be used permanently as a treatment, because of the availability of the hardware, previously designed to deliver low-frequency stimulation in the nervous system or along the spinal cord, mainly for treatment of intractable pain.

Using this method in patients who at that time were indications for thalamotomy, and had either rest tremor (patients with Parkinson's disease (PD)) or postural tremor (patients with essential tremor (ET)), it was quickly demonstrated that deep-brain stimulation (DBS) at high frequency (HF) replaces ablative stereotactic methods [4,10]. The electrodes were stereotactically implanted, during a procedure guided by a combination of ventriculography, magnetic resonance imaging (MRI), and electrophysiology (using both microrecording and microstimulation). These electrodes were then connected to programmable pulse generators, implanted in the subclavicular area similarly to cardiac pacemakers. Contrarily to thalamotomy, DBS could be well tolerated when performed bilaterally in the same session. Stimulation was continuous, unipolar (the electrode being the cathode and the case of the stimulator the anode), with frequency at 130 Hz, pulse width at 60 μs, amplitude around 2–5 V.

This empirical observation-based concept could be then applied, in addition to the thalamic target Vim (ventral intermedius thalamic nucleus) for rest tremor and for postural essential tremor, but also to the other classical targets for PD, particularly to the internal pallidum GPi [11–14], known for its specific effect on levodopa-induced dyskinesias and used in pallidotomies [15,16].

The demonstration that the method was reliable, and safe comparatively to lesioning methods, allowed its extension to new targets, theoretically designed from basic neuroscience, such as the subthalamic nucleus (STN) [17–20].

One may consider that, as a conclusion of this first period, one had established the empirical concept 'HFS is equivalent to Lesion', stating that HFS-DBS produced a functional inhibition mimicking the effects of lesion. This concept has currently the status of an axiom as it is verified in every circumstance where it is applied (not only in all three targets used for PD, but also in other clinical indications such as the posterior hypothalamus for cluster headaches [21,22], or in experimental animals in the ventromedial hypothalamus [23] where changes in feeding behaviour can be induced), and still cannot be demonstrated. This concept has two consequences:

- Are there other indications?
- Is this a new physiological concept? And if so, what is its mechanism?

3. Other indications

Based on these clinically proven experiences, several other indications have been explored and are treated, either on the basis of the extension of the concept to targets having already proven their efficiency, or on the basis of theoretical expectations, drawn from experimental evidence.

3.1. HF-DBS for dystonia

Since the previous reports of [24], thalamotomies were performed either in Vim or in more anterior tar-

gets, such as ventro-oral posterior or anterior thalamic nuclei (Vop or Voa), and even in the pallidum. HFS of Vim, although providing some benefits [25], has not been very successful for treating dystonia. Following the reports of improvement of dystonia by pallidotomy [13], HFS has been tried in GPi where once gain it mimics the effects of lesions created by pallidotomy [26–28]. It is striking to observe that in this particular indication the similarities between the effects of HFS and lesion are concern also the time course of improvement of symptoms. While in PD, the effects of HFS are almost immediate (within seconds) and similarly reversible, in dystonia, these improvements are not seen before a rather longer delay, of days if not weeks and keep improving along time even over some years. This delayed time course is similar for HFS and for pallidotomies, proving that this is related to the nature of the cause of the dystonia rather than to the method of altering the function of GPi.

3.2. HF-DBS for epilepsy

It has been known for long [29,30] that cortical excitability may be modified by pharmacological and lesioning manipulations of the nigral system, leading to the concept of 'Nigral Control of Epilepsy'. Injection of GABA agonists or NMDA inhibitors in the *substantia nigra pars reticulata* (SNr), or GABA antagonists into the *superior colliculus* induces an anti-epileptic effect on most of the experimental models of epilepsy in laboratory animals. Based on these observations and on our previous experience of HF-DBS in the STN for PD, and on the direct projections of STN onto SNr, we have implanted STN in several cases of intractable epilepsy with significant results [31,32], opening on a clinical controlled trial of STN HF-DBS in epilepsy cases due to genetic anomalies (ring chromosome). Other targets are being considered, such as the anterior thalamus, projection site of the mamillo-thalamic tract. In these cases, the efficiency is still obtained at 130 Hz. Other data are being reported on the efficiency of direct stimulation of the amygdalo-hippocampic formation [33] or even the epileptic focus itself [34].

3.3. HF-DBS for OCD

The discredit of psychosurgery during the second half of the 20th century has deprived some psychiatric patients from a very useful therapy when all other treatments have failed. Capsulotomies and cingulotomies were still performed in rare institutions, but the risk of complications and their irreversible nature has been a persisting restriction. The reversibility of HF-DBS has reopened an opportunity. Obsessive compulsive disorders (OCD) have been the psychiatric condition that benefited the most from psychosurgery when indications were correctly chosen. For this reason, DBS was used to replace lesions in the internal capsule [35]. The reported results were encouraging, but the parameters used (high voltage, large pulse width) suggested that the neuronal structure involved was at distance from the real target, which could be, according to the current understanding of the physiology of the basal ganglia, the *nucleus accumbens*. Recent and preliminary data reporting results of HF-DBS of the *nucleus accumbens* are in agreement with this hypothesis. HF-DBS of STN in two PD cases that had in addition traits of OCD showed that the improvement of the PD symptoms was paralleled by the improvement of the OCD symptoms, as evaluated with the Y-BOC rating scale [36]. A third unpublished case seems to confirm these preliminary observations. A multicentre-randomized double-blinded study has been initiated to verify or delete this hypothesis.

3.4. HF-DBS for cluster headaches

Cluster headaches might be a devastating disease, occurring repeatedly in patients prone to this vascular dysregulation. PET-scan studies have shown that the episodes corresponded to a hyperactivity of the ipsilateral posterior hypothalamus [37]. The implantation of this area with electrodes has demonstrated a striking, acute, reversible, and ipsilateral effect of high-frequency stimulation [21,22].

4. Future applications?

4.1. HFS for obesity or anorexia nervosa?

The ventromedial hypothalamus, and the lateral hypothalamus are structures involved in the control of feeding behaviour. Lesions of the hypothalamus due to lipomas or secondary to surgical lesion (such as after surgery for craniopharyngiomas) may also induce

malignant obesity. Experimental data in dogs and cats demonstrated that lesion of the VMH or low frequency stimulation of LH induce hyperphagia and then obesity, while low frequency stimulation of VMH and lesion of LH induce the reverse behaviour, leading to a cachectic state. In rat experiments [23] HF-DBS of VMH in rats induce hyperphagia, while low frequency stimulation decreases the food intake of fasted rats

These are experimental data, suggesting that HF-DBS could be used for treatment of obesity or *anorexia mentosa*. However, this requires more experimental data and raise important ethical problems to be solved prior to the first clinical attempts

As a conclusion of this second part, HF-DBS is a surgical tool, adaptable, reversible, usable as substitute for lesions in various neural structures and applicable to several targets at the same time. It seems to have wide applications in various targets, and future developments can be foreseen. We still have to understand its mechanism and to investigate its effects

5. Mechanism

The challenge is to solve the following paradox: how can stimulation produce the same clinical effects than lesions in various structures of the brain? Actually, the facts are different depending on the frequency. HFS (more than 50 Hz, actually at about 130–185 Hz) mimics the effects of ablative procedures (considered as inhibitory) in neural somatic structures such as the thalamus (Vim, CM-Pf), the basal ganglia (GPi, STN) and the hypothalamus (VMH). On the contrary, HFS and LFS excite neural-fibre bundles, such as the optic tract (inducing flashes), the pyramidal tract (inducing contractions), the lemniscus medialis (inducing paresthesias), or the third nerve fibres (inducing mono-ocular deviations). When a chronic electrode (1.27 mm in diameter) bearing four contacts (1.5 mm long, separated from the next one by 0.5 mm), with a voltage of about 2 to 3 V, which corresponds to 2 to 3 mA as the average impedance of the system is about 1000 Ω, the area involved by the suprathreshold currents is not limited to a point and even to a homogeneous structure such as STN, comprises neuronal somata, of course, but also their dendritic fields, the corresponding synapses and the afferent fibres, as well as the efferent axons of the neurons. The different elements of the neurons respond differently to stimulation. Fibres have a lower threshold than the cell bodies; the orientation of the fibres is important depending on they are parallel or perpendicular to the current lines. Stimulation might induce the silencing of the neuronal firing, the jamming of a network or a feedback loop that would make the wrong message erased or meaningless, the fatigue of synapses by depletion of the neurotransmitter. Several of these mechanisms could be involved altogether in the same structure or at different levels, which allows us to propose a tentative model for the mechanism (Figs. 1 and 2).

At the level of the cell body, there is now evidence that the neuronal firing is inhibited: direct recording of neuron activity at the site of stimulation has been done in the GPi [38,39], as well as in the STN [40,41], which show that spikes are not induced during HFS, as well as immediately after stimulation [42–44]. However, the stimulation field necessarily encompasses also the neighbouring axons, either originating within the stimulated structure (such as subthalamopallidal axons), or passing by it (such as in the F1 and F2 Forel fields, or in the internal capsule). This might explain the results of Garcia et al. [45] on rat-brain slices: HFS of STN induces a dual effect, made of inhibition of firing interrupted by burst of spikes driven at the frequency of stimulation, which might be due to a retrograde propagation to the cell body of axonal spikes initiated along the part of the STN axon leaving the nucleus and involved by the electrical field.

At the level of axons, observation of the effect of stimulation during surgical exploration of the target and of its surroundings demonstrates that high-frequency as well as low-frequency stimulations excite these elements. The excitation of the fibres passing close to the site of stimulation induces the expected symptoms: paresthesias in the lemniscus medialis, muscular contractions in the internal capsule at the level of the pyramidal tract, conjugated eye deviation in the geniculate tract of the internal capsule, mono-ocular deviation in the fibres of the third cranial nerve. Therefore, the axons efferent from the subthalamic neurons should be also excited. The induced spikes should therefore travel along the efferent axons and reach the synapses to the target structures, such as SNr or GPi. Recording in GPi during STN stimulation in monkeys shows increased activity [47], but this could be due to activation of fibres close to the

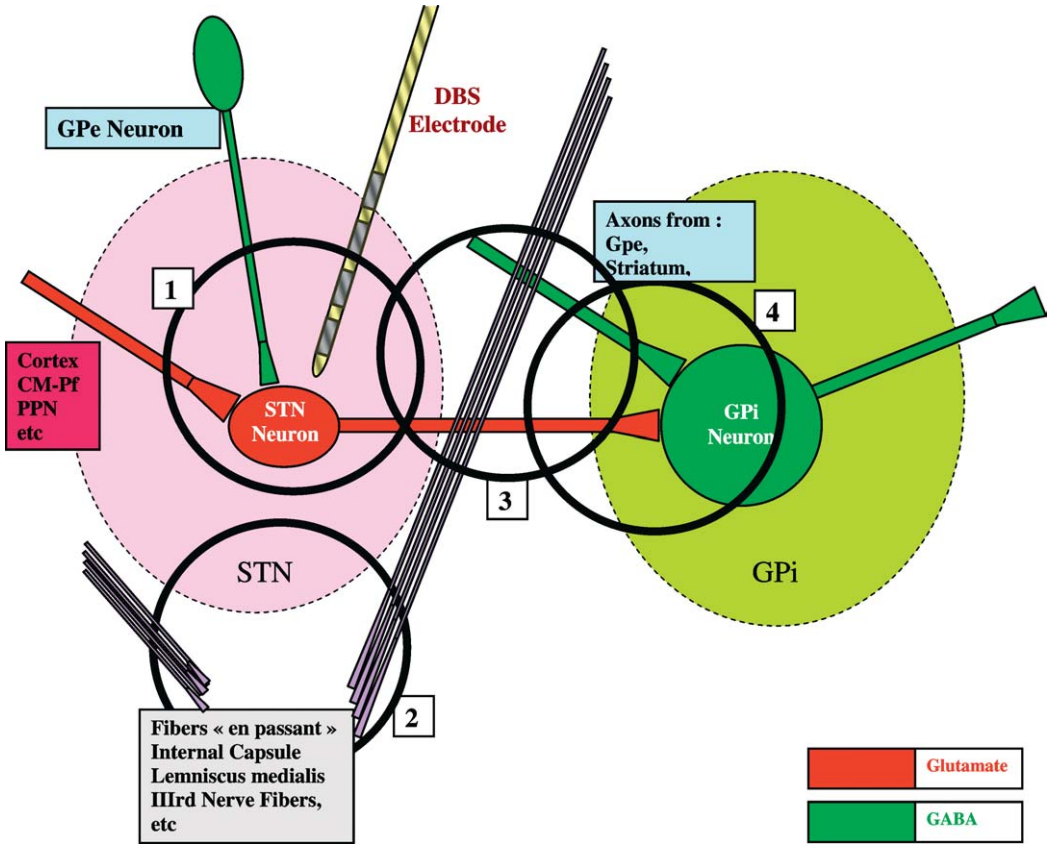


Fig. 1. A global model of HFS-induced functional inhibition. Within STN nucleus, where the chronic DBS electrode is inserted, a STN neuron receives Gabaergic afferents from Gpe and Glutamatergic afferents from the cortex, the CM-Pf and PPN nuclei, and emits Glutamatergic efferents to the target nuclei GPi (and SNr not represented here), which receives also terminals from other origins (such as Gpe and the Striatum). Not directly related to this network, axons pass by these structures, constituting the Internal Capsule, the *Lemniscus medialis*, or lower and more medial, the fibres of the third nerve.

site of stimulation, which in the experimental situation of this paper (monkeys stimulated in STN with a human chronic electrode) might overpass the STN nucleus. Anyway, this activity induced in GPi is linked to the stimulation and disturbs the spontaneous activity, which might create at this level a jamming. Microdialysis in the rat shows an increased release of glutamate, presumably coming from the STN. These data are difficult to interpret because the prolonged time course of the release outpasses by large the duration of the effects of STN stimulation. Moreover, the size of the probe as compared to the size of the investigated structure does not allow us to consider these data as representative of the structure, and therefore does not make the microdialysis data reliable [48]. However, axons originating from the STN neurons should be excited as well. They would be therefore responsible for the excitation of the target cells, in SNr as well as in GPi, provided that the spikes are able to induce a synaptic activity at this level. To check this, we have studied the effect of HFS on a prolactinoma cell line producing prolactine in culture. The release of prolactine is decreased by HFS in a similar extent than by the addition of dopamine, the prolactine inhibitor factor. Similar experiments were performed on the neuronal-like cell line PC12 using a long oligonucleotide microchip bearing 5000 rat gene on a nylon film, with radioactive detection. These experiments show that HFS decreases transcription in 80% of the genes [49] (unpublished data).

One may therefore assume that the synapses activated by the axons originating from neurons situated

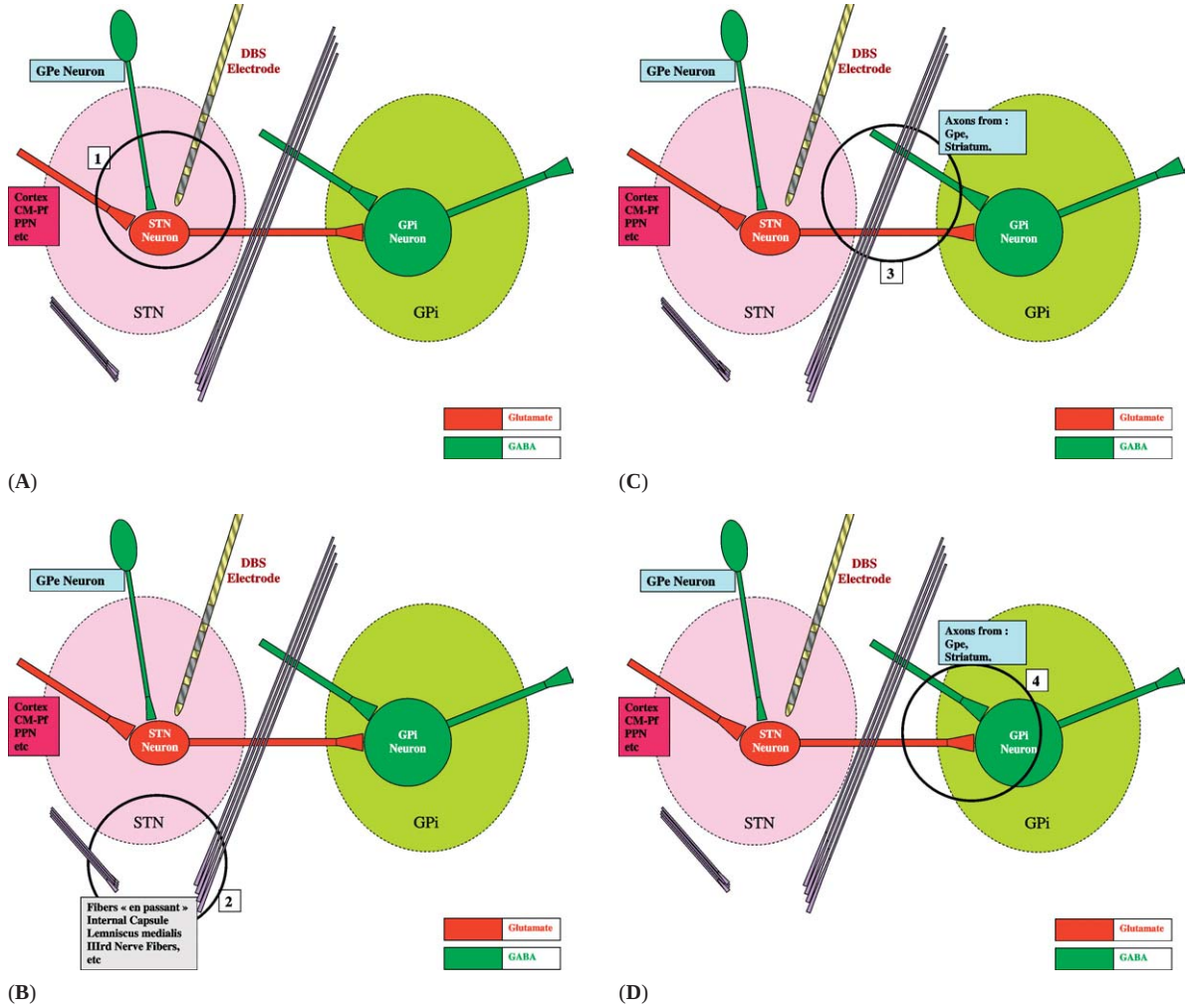


Fig. 2. (**A**) HFS inhibits spike initiation at the level of the STN membrane [40,42,46] and decreases neurotransmitter (glutamate) synthesis and synaptic release [49]. Axons impinging upon the stimulated neurons and their terminals would be excited and would deliver an increased amount of their neurotransmitters. However, their postsynaptic effect (initiation of EPSPs by glutamate terminals coming from the cortex, the CM-Pf and PPN nuclei, or of IPSPs by GABA terminals coming from GPe) might be annihilated by the inhibition of the spike initiation at the level of the postsynaptic STN membrane by HFS (**1** in Fig. 1). (**B**) Axons passing by the stimulated structure but coming from cell bodies which are far from the site of stimulation (such as the fibres of the internal capsule or the fibres of the third nerve) would be excited, therefore inducing remote side effects (gaze deviation, monocular deviation, muscular contractions, sensory paresthesias) (**2** in Fig. 1). (**C**) Axons (subthalamo-pallidal, pallido- and striato-pallidal, and axons *en passant*) are excited at low and at high frequency. The effect of HFS on these axons depends on their origin, whether or not their cell bodies are within the stimulated area (**3** in Fig. 1). (**D**) Axons originating from the stimulated STN neurons are probably stimulated and generate spikes that are propagated to the subthalamo-pallidal (or nigral) synapse: however, at this level, the neurotransmitter cannot be released anymore, as its synthesis would have been inhibited at the level of the STN cell body [49,50]. If this inhibition is insufficient, the spikes that are not inhibited are propagated under a disrupted pattern of firing; this would render the final neuronal message meaningless for the whole network [47], in a global process which we have called ‘jamming’. Axons originating from Gpe and/or the striatum may be excited when passing close to the stimulated area: they are Gabaergic and should participate to the inhibition of the target structures, GPi and SNr (**4** in Fig. 1).

in the area of stimulation cannot release the expected neurotransmitter, making these neurons like ‘firing blanks’ [50] and creating a functional inhibition.

At the level of the cell body, the axon terminals coming from the afferent neurons are mainly glutamatergic from the cortex, the parafascicularis nucleus

and the pedunculopontine nucleus, but also GABAergic coming from the external Pallidum GPe. These two types of afferents might therefore be excited and deliver both glutamate and GABA, the last one being dominant in term of the final results. The hypothesis of the GABA action is the one suggested by Dostrovsky et al. [38,39]. Moreover, the axons originating in GPe are retrogradely activated [42]; they could participate to either a jamming or an incoming additional inhibitory GABA input onto STN, participating to the STN inhibition.

On the basis of these considerations, we propose a global model explaining the major observations and supporting the concept of HFS induced functional inhibition (Figs. 1 and 2). HFS at the level of a neuronal structure inhibits spike initiation at the membrane level and decreases neurotransmitter synthesis and synaptic release. Axons originating from the stimulated neurons could initiate and propagate spikes, which however would be inefficient at the synaptic level, considering the above-described inhibition of the neurotransmitter production and release. If this inhibition were insufficient, the disrupted pattern of firing would render the final neuronal message meaningless for the whole network, in a global process that we would call 'jamming'. Axons impinging upon the stimulated neurons and their terminals would be excited and would deliver their neurotransmitters (provided their somata would be at sufficient distance to avoid inhibition of the neurotransmitter production), but their action might be inefficient because of the inhibition of the spike initiation at the level of the membrane by HFS. Axons passing by the stimulated structure but coming from cell bodies which are far from the site of stimulation would be excited and would deliver an increased output of their neurotransmitters at the level of their target synapses, therefore inducing remote side effects.

6. Effects of STN inhibition: the putative neuroprotective effect of STN-HFS

The Working Hypothesis is that HF-DBS of STN shuts down or significantly decreases the STN output of glutamate, an excitotoxic amino-acid which in PD might participate to the neurodegenerative process. This is based on the hyperactivity of STN in PD [51], the glutamatergic projections from STN to SNr and SNc [52], the glutamate neurotoxicity through NMDA receptors [53], the NMDA enhancement of neurotoxicity of metamphetamine [54], the attenuation of neurotoxicit by NMDA antagonists (MK801, CPP, ...) [55]. To test this hypothesis, experiments were done in a 6OHDA rat model and in a MPTP monkey model.

The 60HDA rat program was achieved using the Sauer and Oertel model [56] where intrastriatal injection of neurotoxin 6OHDA induces a retrograde degeneracy of the dopaminergic neurons of the *substantia nigra pars compacta* (SNc), which is significantly decreased when the neurotoxin is injected after injection of kainic acid into STN [57–59]. The MPTP monkey program was achieved using MPTP systemic injection. Neuroprotection was obtained either by lesioning the STN with kainic acid injections or by chronic STN stimulation through implanted electrodes connected to a permanent stimulator. In all experimental conditions, the ratio between the protected versus the non protected side was about 1.19 ± 0.06 ($p < 0.0001$) for the cell count using the Nissl stain and 1.21 ± 0.1 ($p < 0.0001$) using tyrosine immunoreactive staining [60].

Long-term effects in human patients were investigated using the OFF medication-OFF stimulation score at patient evaluation in 89 bilaterally-implanted STN cases of PD. Continuing impairment as usual in PD was observed in 25% of the patients, 36% were stable and 38% showed significant improvement, 19% continuously improving over five years. Although this is usually not observed in PG patients in whom annual impairment is about 10% [61], one might be cautious before interpreting these results as neuroprotection, as it is known that long-lasting effects of levodopa treatment have been observed.

The conclusion of this third part is that HF-DBS of basal ganglia is the current surgical alternative in the treatment of Parkinson's disease. It has already several applications to other diseases (dystonias, epilepsy, OCD, cluster headaches) and future indications are being investigated. Its mechanisms are not fully understood, but produce a functional inhibition, with multiple complex components, from the cell to the gene. The physiology of electrical stimulation in general, or even at a larger scale, the biological effects of electricity, might be further investigated.

References

[1] D. Albe-Fessard, G. Arfel, G. Guiot, Activités électriques caractéristiques de quelques structures cérébrales chez l'homme, Ann. Chir. 17 (1963) 1185–1214.

[2] C. Ohye, R. Nakamura, A. Fukamachi, H. Narabayashi, Recording and stimulation of the ventralis intermedius nucleus of the human thalamus, Confin. Neurol. 37 (1975) 258.

[3] G. Cotzias, M. Van Woert, L. Schiffer, Aromatic amino acids and modification of Parkinsonism, N. Engl. J. Med. 276 (1967) 374–379.

[4] A.-L. Benabid, P. Pollak, A. Louveau, S. Henry, J. de Rougemont, Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the Vim thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease, Appl. Neurophysiol. 50 (1987) 344–346.

[5] D. Louw, K.J. Burchiel, Ablative therapy for movement disorders. Complications in the treatment of movement disorders, Neurosurg. Clin. N. Am. 2 (1998) 367–373.

[6] K. Matsumoto, T. Asano, T. Baba, T. Miyamoto, T. Ohmoto, Long-term follow-up review of cases of Parkinson's disease after unilateral or bilateral thalamotomy, Appl. Neurophysiol. 39 (1976) 257–260.

[7] K. Matsumoto, F. Shichijo, T. Fukami, Long-term follow-up review of cases of Parkinson's disease after unilateral or bilateral thalamotomy, J. Neurosurg. 60 (1984) 1033–1044.

[8] R.R. Tasker, M. Munz, F.S. Junn, Z.H. Kiss, K. Davis, J.O. Dostrovsky, A.M. Lozano, Deep-brain stimulation and thalamotomy for tremor compared, Acta Neurochir. Suppl. (Wien) 68 (1997) 49–53.

[9] R.R. Tasker, Deep-brain stimulation is preferable to thalamotomy for tremor suppression, Surg. Neurol. 49 (1998) 145–153.

[10] A.-L. Benabid, P. Pollak, C. Gervason, D. Hoffmann, D.M. Gao, M. Hommel, J. Perret, J. de Rougemont, Long-term suppression of tremor by chronic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus, Lancet 337 (1991) 401–406.

[11] J. Siegfried, B. Lippitz, Bilateral chronic electrostimulation of ventroposterolateral pallidum: a new therapeutic approach for alleviating all parkinsonian symptoms, J. Neurosurg. 35 (1994) 1126–1130.

[12] P. Krack, P. Pollak, P. Limousin-Dowsey, D. Hoffmann, J. Xie, A. Benazzouz, A.-L. Benabid, Subthalamic nucleus of internal pallidal stimulation in young onset Parkinson's disease, Brain 121 (1998) 451–457.

[13] A.M. Lozano, R. Kumar, R.E. Gross, N. Giladi, W.D. Hutchison, J.O. Dostrovsky, A.E. Lang, *Globus pallidus internus* pallidotomy for generalized dystonia, Mov. Disord. 12 (1997) 865–870.

[14] J. Volkmann, V. Sturm, P. Weiss, J. Kappler, J. Voges, A. Koulousakis, R. Lehrke, H. Hefter, H. Freund, Bilateral high-frequency stimulation of the internal *globus pallidus* in advanced Parkinson's disease, Ann. Neurol. 44 (1998) 953–961.

[15] L. Laitinen, A. Bergenheim, M. Hariz, Leksell's posteroventral pallidotomy in the treatment of Parkinson's disease, J. Neurosurg. 76 (1992) 53–61.

[16] M. Hariz, H. Hirabayashi, Is there a relationship between size and site of the stereotactic lesion and symptomatic results of pallidotomy and thalamotomy?, Stereotactic Funct. Neurosurg. 69 (1997) 28–45.

[17] H. Bergman, T. Wichmann, M.R. DeLong, Reversal of experimental Parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus, Science 249 (1990) 1436–1438.

[18] P. Pollak, A.-L. Benabid, C. Gross, D.M. Gao, A. Laurent, A. Benazzouz, D. Hoffmann, M. Gentil, J. Perret, Effets de la stimulation du noyau sous-thalamique dans la maladie de Parkinson, Rev. Neurol. (Paris) 149 (1993) 175–176.

[19] P. Limousin, P. Pollak, A. Benazzouz, D. Hoffmann, J.-F. Le Bas, E. Broussolle, J.-E. Perret, A.-L. Benabid, Effect on parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation, Lancet 345 (1995) 91–95.

[20] P. Krack, A. Batir, N. Van Blercom, S. Chabardes, V. Fraix, C. Ardouin, A. Koudsie, P.D. Limousin, A. Benazzouz, J.F. LeBas, A.-L. Benabid, P. Pollak, Five-year follow-up of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease, N. Engl. J. Med. 349 (2003) 1925–1934.

[21] A. Franzini, P. Ferroli, M. Leone, G. Broggi, Stimulation of the posterior hypothalamus for treatment of chronic intractable cluster headaches: first reported series, Neurosurgery 52 (2003) 1095–1099.

[22] M. Leone, A. Franzini, G. Broggi, G. Bussone, Hypothalamic deep-brain stimulation for intractable chronic cluster headache: a 3-year follow-up, Neurol. Sci. 24 (Suppl. 2) (2003) S143–S145.

[23] S. Chabardes, La stimulation aiguë et chronique à haute et basse fréquences des noyaux ventro-médian et latéral de l'hypothalamus chez le rat : effets sur le poids et la prise alimentaire, université Joseph-Fourier–Grenoble-1, diplôme d'études approfondies (DEA), 1999.

[24] I.S. Cooper, Ligation of anterior choroidal artery for involuntary movements–parkinsonism, Psychiatr. Q. 27 (1953) 317–319.

[25] L. Vercueil, P. Pollak, V. Fraix, E. Caputo, E. Moro, A. Benazzouz, J. Xie, A. Koudsie, A.-L. Benabid, Deep-brain stimulation in the treatment of severe dystonia, J. Neurol. 248 (2001) 695–700.

[26] P. Coubes, A. Roubertie, N. Vayssiere, S. Hemm, B. Echenne, Treatment of DYT1-generalised dystonia by stimulation of the internal *globus pallidus*, Lancet 355 (2000) 2220–2221.

[27] P. Coubes, N. Vayssiere, H. El Fertit, S. Hemm, L. Cif, J. Kienlen, A. Bonafe, P. Frerebeau, Deep-brain stimulation for dystonia. Surgical technique, Stereotactic Funct. Neurosurg. 78 (2002) 183–191.

[28] O. Detante, L. Vercueil, S. Thobois, E. Broussolle, N. Costes, F. Lavenne, S. Chabardes, D. Lebars, M. Vidailhet, A.-L. Benabid, P. Pollak, GPi stimulation in primary generalized dystonia: a $H_2{}^{15}O$ PET study, Brain (in press).

[29] K. Gale, Role of the *substantia nigra* in GABA-mediated anticonvulsant actions, Adv. Neurol. 44 (1986) 343–364.

[30] K. Bressand, M. Dematteis, D.M. Gao, L. Vercueil, A.-L. Benabid, A. Benazzouz, *Superior colliculus* firing changes after lesion or electrical stimulation of the subthalamic nucleus in the rat, Brain Res. 943 (2002) 93–100.

[31] A.-L. Benabid, L. Minotti, A. Koudsie, A. de Saint Martin, E. Hirsch, Antiepileptic effect of high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus (*corpus luysi*) in a case of medically-intractable epilepsy caused by focal dysplasia: a 30-month follow-up: technical case report, Neurosurgery 50 (2002) 1385–1391.

[32] S. Chabardes, P. Kahane, L. Minotti, A. Koudsie, E. Hirsch, A.-L. Benabid, Deep-brain stimulation in epilepsy with particular reference to the subthalamic nucleus, Epileptic Disord. 4 (Suppl. 3) (2002) 83–93.
[33] K. Vonck, P. Boon, E. Achten, J. De Reuck, J. Caemaert, Long-term amygdalohippocampal stimulation for refractory temporal lobe epilepsy, Ann. Neurol. 52 (2002) 556–565.
[34] F. Velasco, M. Velasco, A.L. Velasco, D. Menez, L. Rocha, Electrical stimulation for epilepsy: stimulation of hippocampal foci, Stereotactic Funct. Neurosurg. 77 (2001) 223–227.
[35] B. Nuttin, P. Cosyns, H. Demeulemeester, J. Gybels, B. Meyerson, Electrical stimulation in anterior limbs of internal capsules in patients with obsessive-compulsive disorder, Lancet 354 (1999) 1526.
[36] L. Mallet, V. Mesnage, J.-L. Houeto, A. Pelissolo, J. Yelnik, C. Behar, M. Gargiulo, M.-L. Welter, A.-M. Bonnet, B. Pillon, P. Cornu, D. Dormont, B. Pidoux, J.-F. Allilaire, Y. Agid, Compulsions, Parkinson's disease, and stimulation, Lancet 360 (2002) 1302–1304.
[37] A. May, A. Bahra, C. Buchel, R.S. Frackowiak, P.J. Goadsby, Hypothalamic activation in cluster headache attacks, Lancet 352 (1998) 275–278.
[38] J.O. Dostrovsky, R. Levy, J.P. Wu, W.D. Hutchison, R.R. Tasker, A.M. Lozano, Microstimulation-induced inhibition of neuronal firing in human *globus pallidus*, J. Neurophysiol. 84 (2000) 570–574.
[39] J.O. Dostrovsky, A.M. Lozano, Mechanisms of deep-brain stimulation, Mov. Disord. 17 (2002) S63–S68.
[40] M.L. Welter, J.-L. Houeto, A.-M. Bonnet, P.B. Bejjani, V. Mesnage, D. Dormont, S. Navarro, P. Cornu, Y. Agid, B. Pidoux, Effects of high-frequency stimulation on subthalamic neuronal activity in parkinsonian patients, Arch. Neurol. 61 (2004) 89–96.
[41] M. Filali, W.D. Hutchison, V.N. Palter, A.M. Lozano, J.O. Dostrovsky, Stimulation-induced inhibition of neuronal firing in human subthalamic nucleus, Exp. Brain Res. 156 (2004) 274–281.
[42] A. Benazzouz, B. Piallat, P. Pollak, A.-L. Benabid, Responses of *substantia nigra pars reticulata* and *globus pallidus* complex to high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus in rats: electrophysiological data, Neurosci. Lett. 189 (1995) 77–80.
[43] A. Benazzouz, D.M. Gao, Z.G. Ni, B. Piallat, R. Bouali-Benazzouz, A.-L. Benabid, Effect of high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus on the neuronal activities of the *substantia nigra pars reticulata* and *ventrolateral nucleus* of the thalamus in the rat, Neuroscience 99 (2000) 289–295.
[44] A. Benazzouz, D. Gao, Z. Ni, A.-L. Benabid, High-frequency stimulation of the STN influences the activity of dopamine neurons in the rat, Neuroreport 11 (2000) 1593–1596.
[45] L. Garcia, J. Audin, G. D'Alessandro, B. Bioulac, C. Hammond, Dual effect of high-frequency stimulation on subthalamic neuron activity, J. Neurosci. 23 (2003) 8743–8751.
[46] C. Beurrier, B. Bioulac, C. Hammond, Slowly inactivating sodium current (I(NaP)) underlies single-spike activity in rat subthalamic neurons, J. Neurophysiol. 83 (2000) 1951–1957.
[47] T. Hashimoto, C.M. Elder, M.S. Okun, S.K. Patrick, J.L. Vitek, Stimulation of the subthalamic nucleus changes the firing pattern of pallidal neurons, J. Neurosci. 23 (2003) 1916–1923.
[48] F. Windels, N. Bruet, A. Poupard, C. Feuerstein, A. Bertrand, M. Savasta, Influence of the frequency parameter on extracellular glutamate and gamma-aminobutyric acid in *substantia nigra* and *globus pallidus* during electrical stimulation of subthalamic nucleus in rats, J. Neurosci. Res. 72 (2003) 259–267.
[49] R. Xia, B. Piallat, F. Berger, A.-L. Benabid, The effects of variable frequency electrical stimulation on endocrine cells (submitted).
[50] K. Schuske, E.M. Jorgensen, Vesicular glutamate transporter – shooting blanks, Science 3004 (2004) 1750–1752.
[51] W.C. Miller, M.R. De Long, Altered tonic activity of neurons in the *globus pallidus* and subthalamic nucleus in the primate MPTP model of Parkinsonism, in: M.B. Carpenter, A. Jayaraman (Eds.), The Basal Ganglia II, Advances in Behavioral Biology, Plenum Press, New York, 1987, pp. 415–427.
[52] C. Hammond, J. Feger, B. Bioulac, J.-P. Souteyrand, Experimental hemiballism in the monkey produced by unilateral kainic acid lesion in *corpus luysii*, Brain Res. 171 (1979) 577–580.
[53] A. Novelli, J.A. Reilly, P.G. Lysko, R.C. Henneberry, Glutamate becomes neurotoxic via the *N*-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced, Brain Res. 451 (1988) 205–212.
[54] J.F. Marshall, S.J. O'Dell, F.B. Weihmuller, Dopamine-glutamate interactions in methamphetamine-induced neurotoxicity, J. Neural Transm. Gen. Sect. 91 (1993) 241–254.
[55] K.W. Lange, P.A. Loschmann, E. Sofic, M. Burg, R. Horowski, K.T. Kalveram, H. Wachtel, P. Riederer, The competitive NMDA antagonist CPP protects *substantia nigra* neurons from MPTP-induced degeneration in primates, Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 348 (1993) 586–592.
[56] H. Sauer, W.H. Oertel, Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat, Neuroscience 59 (1994) 401–415.
[57] B. Piallat, A. Benazzouz, A.-L. Benabid, Subthalamic nucleus lesion in rats prevents dopaminergic nigral neuron degeneration after striatal 6-OHDA injection: behavioural and immunohistochemical studies, Eur. J. Neurosci. 8 (1996) 1408–1414.
[58] B. Piallat, A. Benazzouz, A.-L. Benabid, Neuroprotective effect of chronic inactivation of the subthalamic nucleus in a rat model of Parkinson's disease, J. Neural Transm. (Suppl.) 55 (1999) 71–77.
[59] G. Paul, W. Meissner, S. Rein, D. Harnack, C. Winter, K. Hosmann, R. Morgenstern, A. Kupsch, Ablation of the subthalamic nucleus protects dopaminergic phenotype but not cell survival in a rat model of Parkinson's disease, Exp. Neurol. 185 (2004) 272–280.
[60] B.A. Wallace, The neuroprotective effects of subthalamic nucleus (STN) suppression, PhD thesis in Neurosciences, université Joseph-Fourier–Grenoble-1, 2004.
[61] P.K. Morrish, J.S. Rakshi, D.L. Bailey, G.V. Sawle, D.J. Brooks, Measuring the rate of progression and estimating the preclinical period of Parkinson's disease with [^{18}F]dopa PET, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 64 (1998) 314–319.

RESUME

Un dispositif de stimulation électrique *in vitro* sur des lignées cellulaires a été optimisé afin de nous permettre d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires de la SHF. Deux lignées cellulaires (GH3 et PC12) ont été analysées au niveau transcriptomique, protéomique et de la sécrétion hormonale et de neurotransmetteurs.

Nous avons comparé les niveaux de sécrétion de PRL des GH3 traitées par SHF, SBF ou par la dopamine; ainsi que les niveaux des catécholamines (DA, AD et NA) des PC12 traitées par SHF, SBF ou par 6-OHDA. La synthèse protéique des cellules stimulées a été analysée par les techniques d'incorporation de ^{35}S méthionine et de SELDI-TOF-MS. Enfin nous avons recherché les modifications d'expression génique des cellules stimulées en utilisant la technique des microarray à base d'oligonucléotides longs sur nylon et détection radioactive.

Les premières expériences montrent une diminution significative de la quantité de prolactine à un niveau comparable à celui obtenu avec l'inhibiteur conventionnel, la dopamine. De la même façon, la production de catécholamines dans le milieu est inhibée. Les données transcriptomiques montrent l'existence des profils d'expression caractéristique de la neurostimulation à haute fréquence, avec environ 100 gènes discriminants impliqués dans la synthèse protéique, la signalisation calcique, l'énergétique cellulaire pour les principaux. Nous avons confirmé l'impact de la neurostimulation sur la synthèse protéique en SELDI-TOF comme en incorporation de méthionine.

Un mécanisme original de SHF peut donc être proposé, impliquant la neutralisation de la synthèse protéique dans l'inactivation réactionnelle des structures neuronales. L'implication de la signalisation calcique et des voies PKC est suggérée.

Mot-clé: stimulation électrique à haute fréquence, culture cellulaire, GH3, Prolactine, PC12, Catécholamines, sécrétion extracellulaire, synthèse protéique, SELDI-TOF-MS, élongation, transcription.

ABSTRACT

A system for electrical stimulation on cells lines *in vitro* was optimized for studying cellular and molecular mechanism of high frequency electrical stimulation. Two cells lines (GH3 and PC12) were analysed at the transcriptomic and proteomic level as well as for the impact on hormonal secretion and neurotransmitter release.

We compared PRL secretion of GH3 cell by HFS, LFS and dopamine as well as catecolamine (DA, AD and NA) secretion of PC12 cell treated by HFS, LFS and 6-OHDA. Proteomic synthesis of stimulated cells were analysed by ^{35}S methionine incorporation and by SELDI-TOF-MS. At last we have investigated modifications of gene expression of stimulated cells using DNA nylon microarray based on long oligonucleotides and radioactive detection.

First experiments demonstrated that HFS induced a significant decrease of the amount of prolactin to a level comparable to the level obtained with dopamine, one well known inhibitor of prolactin. Similarly, the amount of catecholamines detected in the cell culture medium was significantly down regulated. Transcriptomic data manifested the existence of characteristic expression profiles for high frequency electrical stimulation. About 100 discriminatory genes were individualized upon HFS involved in the proteomic synthesis, calcium signalisation and cellular energetic. We confirmed the impact of HFS on protein synthesis with SELDI-TOF technique and methionine incorporation.

One original HFS mechanism has been validated, involving protein synthesis neutralisation in the reacted inactivation of neuronal structures. Implication of calcium signalisation and PKC pathway were also suggested.

Key word: high frequency electrical stimulation , cell culture, GH3, Prolactin, PC12, Cathecolamines, secretion extracelar, protein synthesis, SELDI-TOF-MS, elongation, transcription.