



HAL
open science

ILLUMINATION PROCHE INFRAROUGE À VISÉE NEUROPROTECTRICE DANS LA MALADIE DE PARKINSON : ÉTUDE PRÉCLINIQUE

Florian Reinhart

► **To cite this version:**

Florian Reinhart. Illumination proche infrarouge à visée neuroprotectrice dans la maladie de Parkinson : étude préclinique. Neurosciences. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAS043 . tel-01743852

HAL Id: tel-01743852

<https://theses.hal.science/tel-01743852>

Submitted on 26 Mar 2018

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Neurosciences

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Florian REINHART

Thèse dirigée par **Pr François BERGER**

Neuro-oncologue, Inserm (UA01)

et co-encadrée par **Pr Alim-Louis BENABID**

Neurochirurgien, CEA/Clnatec

Ainsi que par **Dr Cécile MORO**

Docteur, CEA/Clnatec

Préparée au sein du **Commissariat à l'Énergie Atomique et aux
Energies Renouvelables, Institut de Recherche Edmond J.
Safra, Clnatec.**

Dans l'École Doctorale « Ingénierie pour la Santé, la Cognition
et l'Environnement »

Illumination proche infrarouge à visée neuroprotectrice dans la maladie de Parkinson : Etude préclinique.

Thèse soutenue publiquement le **22 Janvier 2016**,
devant le jury présidé par **Pr Alim-Louis BENABID**

et composé de :

Pr Stéphane PALFI

Neurochirurgien, Hôpital Henry-Mondor, Créteil

(Rapporteur)

Dr Emmanuel RABISCHONG

Docteur, Boston Scientifique, St Quentin en Yvelines

(Rapporteur)

Pr François FERON

Professeur, NICN, UMR 7259, Marseille

(Evaluateur)

Pr François BERGER

Neuro-oncologue, Inserm, UA01, Grenoble

(Directeur)

Pr Alim-Louis BENABID

Neurochirurgien, CEA/Clnatec, Grenoble

(Président du jury)

Dr Cécile MORO

Docteur, CEA/Clnatec, Grenoble

(Co-encadrante)

Dr Napoléon TORRES-MARTINEZ

Neurochirurgien, CEA/Clnatec, Grenoble

(Invité)



Cette thèse de doctorat a été entièrement réalisée au sein du **Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives**, dans l'**Institut de Recherche Edmond J. Safra, Clnatec**. Elle a été financée pendant 3 ans par l'**Association France Parkinson**.

Cette thèse s'est déroulée dans un contexte multidisciplinaire et multiculturel, en collaboration avec les laboratoires du **CEA/Leti/DTBS** et le service d'**Anatomie et d'Histologie de l'Université de Sydney**.

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury,

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail et d'être présents pour cette soutenance :

Au Professeur **Stéphane PALFI** et au Docteur **Emmanuel RABISCHONG** pour l'honneur qu'ils me font de juger ce travail en tant que rapporteurs. Au Professeur **François FERON** d'avoir accepté d'être examinateur.

Aux directeurs de thèse et encadrants,

Mes remerciements au Professeur **François BERGER** d'avoir accepté d'être directeur de thèse.

Toute ma reconnaissance au Professeur **Alim-Louis BENABID** d'avoir dirigé mes travaux de doctorat pendant ces trois années. Merci pour votre expertise scientifique et votre disponibilité. Merci pour les nombreuses réunions, souvent (très) longues mais toujours passionnantes qui ont ponctué ces trois années. Au-delà de votre expérience et de votre aide, je retiendrai votre humanité et les valeurs de persévérance que vous m'avez inculquées.

Un très chaleureux merci au Docteur **Cécile MORO** d'avoir encadré mes travaux. Merci pour ton immense disponibilité et ton soutien, même dans les périodes où tu ne pouvais pas être présente. Merci d'avoir recadré mes travaux quand cela était nécessaire, et merci d'avoir su me laisser toute l'autonomie dont j'avais besoin. Surtout, merci de ta confiance !

Merci beaucoup au Docteur **Napoléon TORRES-MARTINEZ**. Merci d'avoir participé à l'encadrement de mes travaux pendant la première année. Merci pour ton aide sur certaines campagnes expérimentales. Merci pour ton humour et ta bonne humeur légendaire !

A ma bêta-lectrice attentive,

Merci infiniment à **Céline CRETALLAZ** pour ta relecture ultra-complète de mon manuscrit. Tu n'étais pas obligée de le faire, merci ! Merci également de ta participation à mes travaux (j'ai pu prendre quelques jours de vacances la première année grâce à toi !), merci pour tous ces moments passés à parler science, ou pas. Mention spéciale à ton célèbre « sacré toi ! ».

A ceux qui ont participé à ce travail, pour leur aide et leurs conseils,

Mes remerciements les plus sincères au Professeur **John MITROFANIS** de l'Université de Sydney pour son implication sans faille dans le projet Nlr. Ces quelques mots ne suffiront pas à exprimer toute ma gratitude pour votre aide en histologie. Thank you for your help, thank you for everything.

Merci à **Fannie DARLOT**, merci pour ces deux années de collaboration. Ma thèse, mais surtout le projet Nlr te doivent énormément. Félicitations pour ta petite fille !

Un immense merci à **Claude « Maître » CHABROL** ! Ton rôle dans mes travaux est tellement gigantesque que je ne pourrai jamais te remercier assez. Sans toi j'en serais encore à essayer de comprendre ce que veut dire « lumière proche infrarouge », au lieu d'écrire ces lignes et de boucler mon manuscrit. Merci, sincèrement.

Tous mes remerciements à **Vincent AUBOIROUX**. Ton expertise de l'IRM et ta disponibilité m'ont été précieuses.

Merci à **Thomas COSTECALDE** pour tes conseils en chirurgie. Merci pour ta bonne humeur et tous tes « tuyaux ».

Merci à **Vincente Di CALOGERO** pour ton aide sur mes protocoles expérimentaux pendant la première année. Heureusement que tu étais là !

Merci à toute l'équipe de l'animalerie : **Diane AGAY, Mylène DORCHYMONT, Clément PERRIN, Guillaume BARBOUX, Cyril ZENGA, Julie LE BER**. Merci pour tout votre travail, pour votre implication dans le bien-être des animaux. Merci pour votre aide sur mes expérimentations.

Merci à **Aurélien « blinge » LAMBERT** pour ton aide en électronique.

Merci à l'équipe d'histologie de Clinatéc, **David RATEL** et **Christophe GAUDE** pour votre aide sur mes protocoles *in vitro*.

Merci à tous ceux que j'oublie mais qui, de près ou de loin, ont participé et participent à la réussite du projet Nlr.

Merci à tous les rongeurs qui ont participé à ces travaux. Les patients qui profiteront des avancées scientifiques que vous avez permis vous sont redevables.

A mes amis,

De Grenoble...

Tout d'abord, **Florent SEIGNON**, pour notre complicité, pour tous ces moments vécus ensemble et ceux à venir. Même si nous ne nous voyons plus aussi fréquemment que par le passé, sache que ton amitié m'est précieuse.

Merci à **Marie-Caroline SCHAEFFER**, **Arthur « trute » TREMEAU**, **Umit KONUKCU**, **Florent « bubu » BURDIN**, **Manon FURRER**. Merci à tous, pour ce que vous représentez. « ALALA ! ».

... Ou d'ailleurs,

A mon ami de toujours, **Lucas BOGNIAUX**. Tu es toujours prêt à partager mes rêves les plus fous, et à y ajouter ta propre folie. Ton courage et ton combat quotidiens sont un exemple pour moi, que je m'efforce de suivre autant que possible. Merci pour tout ce que nous vivons ensemble depuis toutes ces années, parce que dormir sous le déluge, dans une tente non étanche qui se transforme progressivement en lac... ça n'a pas de prix !

Merci à **Geoffroy ROUME** pour ces années d'amitié. Il y a 8 ans — 8 ans ! —, nous nous rencontrons sur les bancs de la première année de fac'. Ce que nous avons vécu depuis ce jour est précieux.

A **Isabelle VIRARD**. Tu es celle qui m'a fait découvrir la recherche. Rares étaient les manips qui donnaient quelque chose, mais il y avait, dans notre « sous-équipe » une énergie débordante. Je pense que cette époque me manque.

Merci à tous les « **Neuro Power** » de master, et les « **Luminy Power** » de licence. Nous ne nous voyons plus que rarement, mais vous avez tous participé au parcours qui m'a amené au doctorat, et donc à ce manuscrit.

A ma famille,

A **mes frère et sœurs**, merci pour votre soutien, ou parfois, à l'inverse, vos mises en garde qui, dans un cas comme dans l'autre ont toujours le même effet : m'inciter à continuer sur le chemin que j'ai choisi, coûte que coûte.

A **mes neveux et nièces**, pour tous ces moments et tous ces fous rires. Aux deux plus grands, désolé pour toutes les fois où vous vous êtes fait punir à cause de mes bêtises ;) . Je termine mes études, vous débutez les vôtres... Arrachez-vous pour ce en quoi vous croyez ; ne perdez pas votre temps avec le reste.

A mes animaux, même si vous ne lirez jamais ces lignes...

A mon cheval, **Nicky**, pour tous les kilomètres parcourus ensemble. Pour toutes ces régions découvertes en ta compagnie.

A mes chats, **Prunelle** et **Shadow**, pour votre innocence et votre présence, même si franchement, dérouler le papier toilette quand j'oublie de fermer la salle de bain, ce n'est absolument pas drôle comme jeu !

Ce manuscrit est dédié à ceux qui me sont le plus chers,

A **mes parents** pour votre soutien indéfectible depuis 27 ans, pour vos encouragements en toutes circonstances. Je n'aurais probablement pas la même force de caractère, ni la même détermination dans tout ce que j'entreprends sans ce que vous m'avez transmis au fil de ces nombreuses années. C'est infiniment plus précieux que tout l'or du monde.

A **Aurélia**, pour... la liste est trop longue. Merci de m'avoir secoué les puces quand j'avais envie de jeter mon manuscrit par la fenêtre. Merci de m'avoir accompagné dans ce marathon de trois ans, et plus généralement dans tout ce que j'entreprends.

Surtout, merci pour ton soutien au quotidien, pour ton écoute, pour notre complicité. Tu sais me ramener sur terre quand je m'envole un peu trop vite, un peu trop loin ; merci pour cela, même si sur le coup, ça peut parfois m'agacer (ce n'est pas une raison pour en profiter !).

Merci d'être celle que tu es.

I. TABLE DES MATIERES

| | |
|--|------------|
| I. TABLE DES MATIERES | IX |
| II. TABLES DES FIGURES, TABLEAUX ET ABREVIATIONS | XIV |
| II.1. TABLE DES FIGURES | XIV |
| II.2. TABLE DES TABLEAUX | XVII |
| II.3. ABREVIATIONS | XVIII |
| III. INTRODUCTION | 1 |
| III.1. LA MALADIE DE PARKINSON : UN ENJEU DE SANTE PUBLIQUE | 1 |
| III.1.1. GENERALITES (HISTORIQUE, EPIDEMIOLOGIE, ETIOLOGIE) | 1 |
| III.1.2. LES TROUBLES MOTEURS DE LA MALADIE DE PARKINSON | 3 |
| III.1.3. LES TROUBLES NON MOTEURS DE LA MALADIE DE PARKINSON | 4 |
| III.1.4. CYTOPATHOLOGIE DE LA MALADIE DE PARKINSON | 5 |
| III.1.5. LES TRAITEMENTS DE LA MALADIE DE PARKINSON | 8 |
| III.1.5.1. Approches pharmacologiques | 8 |
| III.1.5.2. Approches neurochirurgicales | 9 |
| III.2. LA NEUROPROTECTION COMME STRATEGIE THERAPEUTIQUE | 11 |
| III.2.1. CONCEPT DE NEUROPROTECTION ET METHODES D'EVALUATION | 11 |
| III.2.1.1. Etudes symptomatiques | 11 |
| III.2.1.2. Etudes des marqueurs biologiques | 12 |
| III.2.1.3. L'apport de l'imagerie médicale | 13 |
| III.2.2. LES STRATEGIES NEUROPROTECTRICES ACTUELLES ET LEURS LIMITES | 14 |
| III.2.2.1. Inhibition de la monoamine oxydase B | 14 |
| III.2.2.2. Les agonistes dopaminergiques | 15 |
| III.2.2.3. Soutien à la fonction mitochondriale | 16 |
| III.2.2.4. Traitements anti-inflammatoires | 17 |
| III.2.3. L'APPORT DES MODELES ANIMAUX DE LA MALADIE DE PARKINSON | 19 |
| III.2.3.1. Modèle pharmacologique historique : reserpine | 19 |
| III.2.3.2. Modèles neurotoxiques | 20 |
| | IX |

| | | |
|---------------|--|-----------|
| III.2.3.2.1. | Modèle rat 6-OHDA | 20 |
| III.2.3.2.2. | Modèle souris MPTP | 22 |
| III.2.3.3. | Modèles génétiques | 26 |
| III.2.3.4. | Modalités de suivi de l'évolution d'un modèle animal de la maladie de Parkinson | 27 |
| III.2.3.4.1. | Approche comportementale | 27 |
| III.2.3.4.2. | Approche histologique | 28 |
| III.3. | POTENTIEL NEUROPROTECTEUR DE L'ILLUMINATION PROCHE INFRAROUGE : ETAT DE L'ART | 29 |
| III.3.1. | ETUDES <i>IN VITRO</i> HISTORIQUES | 30 |
| III.3.2. | ETUDES <i>IN VIVO</i> ET AXES ACTUELS DE RECHERCHE | 31 |
| III.3.3. | ETUDES CLINIQUES | 35 |
| III.4. | OBJECTIFS DU PRESENT TRAVAIL DE THESE | 36 |
| IV. | <u>MATERIELS ET METHODES</u> | 39 |
| IV.1. | ANIMAUX ET CONSIDERATIONS ETHIQUES | 39 |
| IV.2. | PROCEDURES CHIRURGICALES ET SUIVI POST-OPERATOIRE | 40 |
| IV.2.1. | CHIRURGIE STEREOTAXIQUE | 40 |
| IV.2.2. | SUIVI POST-OPERATOIRE | 40 |
| IV.3. | INDUCTION DU MODELE PARKINSONIEN | 42 |
| IV.3.1. | MODELE SOURIS MPTP | 42 |
| IV.3.2. | MODELE UNILATERAL RAT 6-OHDA | 42 |
| IV.4. | PROTOCOLES D'ILLUMINATIONS | 43 |
| IV.4.1. | DISTANCE DE PENETRATION DE LA LUMIERE PROCHE INFRAROUGE DANS LES TISSUS CEREBRAUX | 43 |
| IV.4.2. | ILLUMINATION EXTRA-CEREBRALE | 44 |
| IV.4.2.1. | Principe général | 44 |
| IV.4.2.2. | Protocole d'illumination n°1 | 44 |
| IV.4.2.3. | Protocole d'illumination n°2 | 45 |
| IV.4.2.4. | Protocole d'illumination n°3 | 47 |
| IV.4.3. | ILLUMINATION INTRACEREBRALE | 49 |
| IV.4.3.1. | Développement du dispositif implanté chronique | 49 |
| IV.4.3.2. | Tolérance de l'implantation par les rats | 50 |
| IV.4.3.3. | Protocole d'illumination | 50 |
| IV.5. | ETUDES COMPORTEMENTALES | 52 |
| IV.5.1. | ACTIVITE LOCOMOTRICE : MODELE MPTP | 52 |
| IV.5.2. | COMPORTEMENT ROTATOIRE : MODELE 6-OHDA | 52 |

| | |
|---|-----------|
| IV.6. THERMOMETRIE IRM | 54 |
| IV.7. EUTHANASIE ET PRELEVEMENTS | 55 |
| IV.8. HISTOLOGIE | 56 |
| IV.8.1. COUPES FRONTALES DE CERVEAUX | 56 |
| IV.8.2. IMMUNOMARQUAGE DE LA TYROSINE HYDROXYLASE | 56 |
| IV.8.3. IMMUNOMARQUAGE DE IBA1 | 56 |
| IV.9. BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE | 58 |
| IV.9.1. ACTIVITE DE L'ENZYME MAO-B | 58 |
| IV.10. ANALYSES STATISTIQUES | 59 |
| | |
| V. RESULTATS | 63 |
| <hr/> | |
| V.1. THEME 1 : VALIDATION DES MODELES ANIMAUX ET D'ILLUMINATION UTILISES DANS LE TRAVAIL DE THESE | 64 |
| V.1.1. VALIDATION DES MODELES ANIMAUX UTILISES | 64 |
| V.1.1.1. Modèle souris MPTP | 64 |
| V.1.1.2. Modèle rat 6-OHDA | 66 |
| V.1.1.3. Interactions entre lumière proche infrarouge et mécanismes d'assimilation du MPTP et de la 6-OHDA | 67 |
| V.1.1.3.1. La lumière proche infrarouge ne modifie pas l'activité de la MAO-B | 67 |
| V.1.1.3.2. La lumière proche infrarouge ne modifie pas l'activité de hDAT | 68 |
| V.1.2. DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DU MODELE D'ILLUMINATION INTRACEREBRALE CHRONIQUE | 69 |
| V.1.2.1. Optimisation du dispositif implanté chronique | 69 |
| V.1.2.2. Mesures physiques d'atténuation lumineuse dans le cerveau de rat | 71 |
| V.1.2.3. Sécurité thermique d'une illumination proche infrarouge intracérébrale par thermométrie IRM | 72 |
| V.1.2.3.1. Évolution de la température et de sa diffusion en fonction du temps | 72 |
| V.1.2.3.2. Évolution de la température et de sa diffusion en fonction de la puissance optique délivrée | 74 |
| V.1.2.4. Développement d'une cage d'hébergement permettant l'illumination chronique | 77 |
| V.1.2.5. Evaluation du bien-être animal | 78 |
| V.1.2.5.1. Douleur post-implantatoire chez le rat | 78 |
| V.1.2.5.2. Masse corporelle des rats | 78 |
| V.1.2.5.3. Activité motrice des rats | 79 |
| V.2. THEME 2 : POTENTIEL THERAPEUTIQUE D'UNE ILLUMINATION PROCHE INFRAROUGE DANS DES MODELES RONGEURS DE LA MALADIE DE PARKINSON | 81 |

| | | |
|--------------|---|------------|
| V.2.1. | PREUVE DE CONCEPT SUR LE MODELE NEUROTOXIQUE MPTP : ILLUMINATION EXTRA-CEREBRALE A 810 NM | 82 |
| V.2.1. | PREUVE DE CONCEPT SUR LE MODELE NEUROTOXIQUE 6-OHDA : ILLUMINATION INTRACEREBRALE A 670 NM | 89 |
| V.3. | THEME 3 : OPTIMISATION DU POTENTIEL NEUROPROTECTEUR DE LA LUMIERE PROCHE INFRAROUGE DANS LA MALADIE DE PARKINSON | 104 |
| V.3.1. | INFLUENCE DE LA LONGUEUR D'ONDE : COMPARAISON ET ASSOCIATION ENTRE 670 ET 810 NM | 105 |
| V.3.1.1. | Analyse comportementale | 105 |
| V.3.1.2. | Analyse histologique | 107 |
| V.3.2. | INFLUENCE DE LA FENETRE TEMPORELLE DE TRAITEMENT SUR L'EFFICACITE THERAPEUTIQUE : PRE-/POST-TRAITEMENT | 108 |
| V.3.3. | INFLUENCE DE LA QUANTITE DE LUMIERE SUR L'EFFICACITE THERAPEUTIQUE | 118 |
| V.3.3.1. | Corrélation entre quantité d'énergie lumineuse et efficacité thérapeutique | 118 |
| V.3.3.1.1. | Analyse comportementale | 118 |
| V.3.3.1.2. | Analyse histologique | 119 |
| V.3.3.2. | Efficacité croisée entre puissance optique et durée d'une seule illumination | 121 |
| V.3.3.2.1. | Analyse comportementale | 121 |
| V.3.3.2.2. | Analyse histologique | 122 |
| VI. | DISCUSSION GENERALE | 127 |
| VI.1. | DEVELOPPEMENT DU DISPOSITIF IMPLANTE D'ILLUMINATION INTRACEREBRALE CHRONIQUE CHEZ LE RAT | 127 |
| VI.2. | ESTIMATION DE LA PUISSANCE OPTIQUE REÇUE PAR LES SUBSTANCES NOIRES | 130 |
| VI.3. | SECURITE THERMIQUE DE L'ILLUMINATION INTRACEREBRALE | 132 |
| VI.4. | INTERETS ET LIMITES DES MODELES D'ETUDE UTILISES | 134 |
| VI.4.1. | VALIDATION DES MODELES UTILISES | 134 |
| VI.4.1.1. | Le modèle aigu MPTP souris | 134 |
| VI.4.1.2. | Le modèle 6-OHDA rat | 136 |
| VI.4.2. | LA LUMIERE PROCHE INFRAROUGE N'INFLUE PAS SUR L'ACTIVITE DE LA MAO-B ET DE DAT, <i>IN VITRO</i> | 137 |
| VI.5. | POTENTIEL THERAPEUTIQUE D'UNE ILLUMINATION PROCHE INFRAROUGE DANS LA MALADIE DE PARKINSON | 139 |
| VI.6. | COMPARAISON ET ASSOCIATION DES POTENTIELS NEUROPROTECTEURS DE DEUX LONGUEURS D'ONDE : 670 ET 810 NM | 141 |
| VI.6.1. | APPLICATIONS SIMULTANEEES DES DEUX LONGUEURS D'ONDE | 142 |
| VI.6.2. | APPLICATIONS DIFFEREES DES DEUX LONGUEURS D'ONDE | 143 |
| VI.7. | CONDITIONS OPTIMALES D'APPLICATION DE LA LUMIERE A 670 NM | 144 |

| | |
|--|-------------------|
| VI.8. DUREE D'ACTION D'UN TRAITEMENT LUMINEUX | 149 |
| <u>VII. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</u> | <u>153</u> |
| <u>VIII. BIBLIOGRAPHIE</u> | <u>157</u> |
| <u>IX. ANNEXES</u> | <u>181</u> |
| IX.1. LISTE DES PUBLICATIONS | 181 |
| IX.2. LISTE DES COMMUNICATIONS AFFICHEES | 182 |
| IX.3. RESUME | 183 |
| IX.4. ABSTRACT | 184 |

II. TABLES DES FIGURES, TABLEAUX ET ABREVIATIONS

II.1. TABLE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| FIGURE III-1 : ILLUSTRATION DE LA VOIE NIGROSTRIEE. A : CERVEAU SAIN. B : CERVEAU ATTEINT DE LA MALADIE DE PARKINSON. ADAPTE DE GUTTMAN ET AL. | 5 |
| FIGURE III-2 : SCHEMA EXPLICATIF DU FONCTIONNEMENT DE LA VOIE NIGROSTRIEE. ADAPTE DE SCHWARZSCHILD ET AL, 2006. | 6 |
| FIGURE III-3 : EXEMPLE DU MECANISME D'ASSIMILATION DU MPTP. TIRE DE DAUER ET AL 2003. | 23 |
| FIGURE IV-1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN CRANE DE RAT, VUE DU DESSUS. | 44 |
| FIGURE IV-2 : PROTOCOLE D'ILLUMINATION N°1 ; UTILISE POUR LES CAMPAGNES EXPERIMENTALES « PREUVE DE CONCEPT ILLUMINATION PROCHE INFRAROUGE MODELE MPTP » ET « INFLUENCE DE LA LONGUEUR D'ONDE SUR L'EFFET NEUROPROTECTEUR DE LA LUMIERE PROCHE INFRAROUGE ». | 45 |
| FIGURE IV-3 : PROTOCOLE D'ILLUMINATION N°2 ; UTILISE POUR LES CAMPAGNES EXPERIMENTALES « INFLUENCE DE LA QUANTITE DE LUMIERE SUR L'EFFICACITE THERAPEUTIQUE ». | 46 |
| FIGURE IV-4 : PROTOCOLE D'ILLUMINATION N°3 ; UTILISE POUR LA CAMPAGNE EXPERIMENTALE « INFLUENCE DE LA FENETRE TEMPORELLE DE TRAITEMENT SUR L'EFFICACITE THERAPEUTIQUE DE LA LUMIERE PROCHE INFRAROUGE ». | 48 |
| FIGURE IV-5 : PROTOCOLE D'ILLUMINATION PROCHE INFRAROUGE INTRACEREBRALE, CHEZ LE RAT 6-OHDA. | 51 |
| FIGURE IV-6 : EXEMPLE DE 6 SOURIS PLACEES DANS DES OPEN-FIELDS AFIN D'EVALUER LEUR ACTIVITE MOTRICE. | 52 |
| FIGURE IV-7 : EXEMPLE D'UN RAT 6-OHDA SOUS APOMORPHINE PLACE DANS UNE ARENE CIRCULAIRE AFIN D'EVALUER SON COMPORTEMENT ROTATOIRE. | 53 |
| FIGURE V-1 : COMPARAISON DE L'ACTIVITE MOTRICE DES SOURIS SALINE ET DES SOURIS MPTP. | 64 |
| FIGURE V-2 : COMPARAISON DU NOMBRE DE CELLULES TH ⁺ DANS LA SUBSTANCE NOIRE ENTRE LES SOURIS SALINE ET MPTP. | 65 |
| FIGURE V-3 : COMPTAGE DES CELLULES NISSL ET TH ⁺ DE LA SUBSTANCE NOIRE, CHEZ LES RATS 6-OHDA. | 66 |

| | |
|--|-----|
| FIGURE V-4 : COMPORTEMENT ROTATOIRE SOUS APOMORPHINE. COMPARAISON DE L'ÉVOLUTION DU NOMBRE DE TOURS EN 10 MINUTES ENTRE LES GROUPES SALINE ET 6-OHDA, SUR TROIS SEMAINES. | 68 |
| FIGURE V-5 : ACTIVITE <i>IN VITRO</i> DE L'ENZYME MAO-B DANS L'OBSCURITE, A 670 NM, ET A 810 NM. | 68 |
| FIGURE V-6 : ACTIVITE <i>IN VITRO</i> DU TRANSPORTEUR DAT DANS L'OBSCURITE, A 670 NM, ET A 810 NM. | 68 |
| FIGURE V-7 : ILLUSTRATIONS DES ÉVOLUTIONS DU DISPOSITIF D'ILLUMINATION INTRACEREBRAL CHRONIQUE. | 69 |
| FIGURE V-8 : MESURE DU SIGNAL LUMINEUX PERÇU PAR LES FIBRES RECEPTRICES, EN FONCTION DE LEUR DISTANCE PAR RAPPORT A LA SOURCE OPTIQUE. | 71 |
| FIGURE V-9 : MESURE DE L'ÉVOLUTION DE LA TEMPERATURE PENDANT UNE ILLUMINATION A 670 NM DE 30 MINUTES, A UNE PUISSANCE OPTIQUE DE 115 MW, AVEC UNE FIBRE OPTIQUE DE Ø 200 µM. | 72 |
| FIGURE V-10 : DIFFUSION DE LA TEMPERATURE A PARTIR DU POINT LE PLUS CHAUD (A 115 MW OPTIQUES). | 73 |
| FIGURE V-11 : ÉVOLUTION DE LA DIFFUSION DE LA TEMPERATURE EN FONCTION DU TEMPS (A 115 MW D'ILLUMINATION). ECHELLE : 1,5 CM. | 73 |
| FIGURE V-12 : ÉVOLUTION DE LA TEMPERATURE EN FONCTION DE LA PUISSANCE OPTIQUE DELIVREE. | 75 |
| FIGURE V-13 : ÉVOLUTION DE LA TEMPERATURE EN FONCTION DE LA PUISSANCE OPTIQUE DELIVREE. | 75 |
| FIGURE V-14 : ÉVOLUTION DE LA DIFFUSION DE LA TEMPERATURE EN FONCTION DE LA PUISSANCE OPTIQUE DELIVREE. | 76 |
| FIGURE V-15 : POTENCE D'ALIMENTATION ELECTRIQUE LONG TERME DE L'IMPLANT RAT. | 77 |
| FIGURE V-16 : ÉVOLUTION DE LA DOULEUR POST-IMPLANTATOIRE CHEZ LE RAT. IMPLANTATION A JO. | 78 |
| FIGURE V-17 : ÉVOLUTION DE LA MASSE CORPORELLE DES RATS AU COURS DU TEMPS. | 79 |
| FIGURE V-18 : ÉVALUATION EN OPEN-FIELD DE L'ACTIVITE MOTRICE DES RATS AU COURS DU TEMPS. | 79 |
| FIGURE V-19 : COMPARAISON DE L'ACTIVITE MOTRICE DES SOURIS MPTP, EN FONCTION DU TRAITEMENT LUMINEUX REÇU. | 105 |
| FIGURE V-20 : COMPARAISON DU NOMBRE DE CELLULES TH ⁺ , EN FONCTION DU TRAITEMENT LUMINEUX REÇU. | 107 |
| FIGURE V-21 : EFFICACITE THERAPEUTIQUE (BASEE SUR L'ACTIVITE MOTRICE) EN FONCTION DE LA QUANTITE D'ENERGIE DELIVREE EN UN SEUL FLASH. | 119 |

| | |
|---|-----|
| FIGURE V-22 : EFFICACITE THERAPEUTIQUE (BASEE SUR L'IMMUNO-REACTIVITE TH) EN FONCTION DE LA QUANTITE D'ENERGIE DELIVREE EN UN SEUL FLASH. | 120 |
| FIGURE V-23 : REPRESENTATION COLORIMETRIQUE DE L'EFFICACITE THERAPEUTIQUE D'UNE ILLUMINATION A 670 NM SUR L'ACTIVITE MOTRICE DES SOURIS (EN FONCTION DE LA PUISSANCE DELIVREE ET DE LA DUREE DE DELIVRANCE). | 121 |
| FIGURE V-24 : REPRESENTATION COLORIMETRIQUE DE L'EFFICACITE THERAPEUTIQUE D'UNE ILLUMINATION A 670 NM SUR LE COMPTAGE DES CELLULES TH ⁺ (EN FONCTION DE LA PUISSANCE DELIVREE ET DE LA DUREE DE DELIVRANCE). | 123 |
| FIGURE VI-1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA FENETRE D'EFFICACITE MAXIMUM D'UNE ILLUMINATION PROCHE INFRAROUGE CHEZ LA SOURIS MPTP. | 147 |
| FIGURE VI-2 : SCHEMA THEORIQUE EXPLICATIF DE L'EFFET DE LA DUREE D'ILLUMINATION ET DE LA PUISSANCE OPTIQUE SUR L'EFFICACITE THERAPEUTIQUE. | 147 |

II.2. TABLE DES TABLEAUX

| | |
|--|-----|
| TABLEAU IV-1 : COORDONNEES D'IMPLANTATION DES FIBRES OPTIQUES POUR LA MESURE DE LA PENETRATION DE LA LUMIERE PROCHE INFRAROUGE. | 43 |
| TABLEAU IV-2 : PUISSANCES OPTIQUES (MW) ET DUREES D'ILLUMINATION (S) APPLIQUEES DANS LES DIFFERENTS GROUPES DE SOURIS. | 47 |
| TABLEAU V-1 : REPRESENTATION TABULAIRE DE L'EFFICACITE THERAPEUTIQUE D'UNE ILLUMINATION A 670 NM SUR L'ACTIVITE MOTRICE DES SOURIS (EN FONCTION DE LA PUISSANCE DELIVREE ET DE LA DUREE DE DELIVRANCE). | 122 |
| TABLEAU V-2 : REPRESENTATION TABULAIRE DE L'EFFICACITE THERAPEUTIQUE D'UNE ILLUMINATION A 670 NM SUR LE NOMBRE DE CELLULES TH ⁺ PRESENTES DANS LA SUBSTANCE NOIRE COMPACTE (EN FONCTION DE LA PUISSANCE DELIVREE ET DE LA DUREE DE DELIVRANCE). | 123 |
| TABLEAU VI-1 : RESUME INTERMEDIAIRE DES PARAMETRES D'ILLUMINATION INFLUENÇANT L'EFFICACITE THERAPEUTIQUE. | 145 |
| TABLEAU VI-2 : RESUME GLOBAL DES PARAMETRES D'ILLUMINATION INFLUENÇANT L'EFFICACITE THERAPEUTIQUE. | 148 |

II.3. ABREVIATIONS

6-OHDA : 6 hydroxydopamine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

ApoA1 : Apolipoprotéine A1

ATP : Adénosine triphosphate

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

BSA : Bovine Serum Albumine (Sérum d'albumine bovin)

CoQ10 : Coenzyme Q10

DAT : Transporteur de la dopamine

DBS : Deep brain stimulation (stimulation cérébrale profonde)

GDNF : Facteur neurotrophe dérivé de la glie

GPe : Globus pallidus pars externa

GPi : Globus pallidus pars interna

GSH : Gluthation (forme réduite)

HSP : Heat shock protein (protéine de choc thermique)

IRM : Imagerie par résonance magnétique

L-dopa : Lévodopa

LLLTpi : Low-Level Light Therapy (Thérapie lumineuse à faible énergie) proche infrarouge

LRRK2 : Leucine-rich repeat kinase 2

MAO-B : Monoamine oxydase B

MDS-UPDRS : Movement Disorders Society Unified Parkinson's Disease Rating Scale

Mfb : médial forebrain bundle (faisceau médian antérieur)

MPDP⁺ : 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium

MPP⁺ : 1-methyl-4-phenylpyridinium

MPTP : 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine

NASA : National American Spatial Agency (Agence Spatiale Nationale Americaine)

NET : Transporteur de la noradrenaline

NIR : Near Infrared (Proche Infrarouge)

Nurr-1 : Nuclear receptor related 1 protein

PBS : Phosphate Buffer Saline (Tampon Phosphate Salin)

PINK1 : PTEN-induced putative kinase 1

Pitx-3 : Pituitary homeobox 3

PNH : Primate non humain

RGS : Rat Grimace Scale

SNc : Substance noire compacte

SNr : Substance noire réticulée

SPECT : Tomographie d'émission monophotonique

STC : Sonographie transcraniale

STN : Subthalamic nucleus (Noyau subthalamique)

TEP : Tomographie par émission de positons

TH⁺ : Positif au marquage de la tyrosine hydroxylase

UCH-L1 : Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1

UPDRS : Unified Parkinson's Disease Rating Scale

VMAT2 : Transporteur de la monoamine vésiculaire 2

INTRODUCTION

III. INTRODUCTION

III.1. LA MALADIE DE PARKINSON : UN ENJEU DE SANTE PUBLIQUE

III.1.1. Généralités (historique, épidémiologie, étiologie)

La maladie de Parkinson est une atteinte neurologique chronique et dégénérative qui touche le système nerveux central. En 1817, Sir James Parkinson, un médecin anglais, dans son « Essay on the Shaking Palsy »¹ est le premier à décrire une *paralysie agitante*, qui provoque des tremblements de repos et dont l'évolution est progressive. La dénomination « Maladie de Parkinson » date de la seconde moitié du XIX^e siècle ; elle est due au neurologue français Jean-Martin Charcot, également à l'origine de la description de la triade symptomatique — tremblements de repos, rigidité, bradykinésie — caractéristique de la pathologie².

De nos jours, la maladie de Parkinson touche près de 6,3 millions de personnes dans le monde. Sa répartition à l'échelle de la planète est relativement homogène. Dans les pays occidentaux, il s'agit de la seconde maladie neurodégénérative, après la maladie d'Alzheimer. Elle touche de manière égale hommes et femmes avec une incidence d'environ 15/100 000 habitants par an. L'âge moyen du début de la maladie se situe entre 44 et 66 ans, avec une augmentation du risque de la développer avec l'âge, même si 15 % des parkinsoniens débutent leur maladie avant 40 ans. Certains cas très sévères peuvent débiter dès 20 ans (forme juvénile)³, même si cela reste très exceptionnel.

Sur le plan cellulaire, les neurones majoritairement touchés dans la maladie de Parkinson sont les neurones dopaminergiques de la substance noire, avec 50 à 85 % de dégénérescence neuronale⁴. La substance noire est un noyau de la base du système nerveux situé au niveau du mésencéphale ; une substance noire est présente dans chaque hémisphère. Elle tient son nom de la couleur foncée des cellules qui la composent, en raison de la présence de neuromélanine. La substance noire est composée de deux sous-régions, la substance noire *pars reticulata* et la *pars compacta*. La dégénérescence de la substance noire induit une réduction du niveau de dopamine présent dans les ganglions de la base, dont le striatum^{5,6}. Les mécanismes impliqués dans ce processus neurodégénératif de la maladie de Parkinson ne sont pas encore complètement compris. Néanmoins, dans les formes idiopathiques de la maladie, un dysfonctionnement du métabolisme énergétique mitochondrial, principalement au niveau de la chaîne respiratoire, a été mis en évidence dans les neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta*⁷.

Les causes de la pathologie ne sont pas non plus bien déterminées. Toutefois, on peut recenser : 1 – des prédispositions génétiques⁸ (enzymes de détoxification, de la chaîne respiratoire mitochondriale, gènes intervenant dans le maintien de l'homéostasie dopaminergique) ; 2 – une toxicité environnementale (exposition à des pesticides comme la rotenone par exemple)⁹ ; et 3 – dans de rares cas, des formes familiales, avec mutations ponctuelles sur le gène codant pour l'alpha-synucléine, la leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2), ou la parkine, par exemple¹⁰.

III.1.2. Les troubles moteurs de la maladie de Parkinson

Les troubles moteurs de la maladie de Parkinson s'articulent autour de trois symptômes cardinaux, que l'on appelle la **triade symptomatique** :

— Le **tremblement de repos**. C'est le symptôme le plus connu du grand public. Toutefois, 20 % des patients ne présentent pas de tremblement de repos. D'autre part, il s'agit d'un symptôme la plupart du temps peu handicapant pour la personne, car les tremblements diminuent de façon significative dès l'exécution d'un mouvement. Il s'agit d'un tremblement qui commence généralement de façon unilatérale et qui prédomine au niveau des extrémités des membres supérieurs avec un pic de fréquence de 4 à 6 Hertz¹¹.

— La **rigidité** est assimilée à une hypertonie musculaire généralisée, homogène et continue. Lorsqu'une commande motrice volontaire est envoyée aux muscles effecteurs, cesdits muscles — dans un état de tonicité excessive — ne peuvent répondre de façon adéquate. Dans ces conditions, les contraintes mécaniques sur les membres et le niveau général de fatigue du patient augmentent sensiblement¹².

— La **bradykinésie**. Ce symptôme se manifeste de deux façons : tout d'abord une raréfaction voire une privation du mouvement volontaire, mais également un ralentissement plus ou moins sévère de son exécution¹³. Son origine vient d'un défaut de l'initiation du mouvement ; en effet, à mesure de l'évolution de la maladie, un délai significatif apparaît entre l'intention de mouvement et son exécution.

Un quatrième symptôme, plus tardif, se manifeste au cours de l'évolution de la maladie : l'**instabilité posturale**. On parle ici d'un des symptômes les plus handicapants de la maladie de Parkinson, qui se manifeste par des troubles de l'équilibre pouvant entraîner des chutes.

Le diagnostic de la maladie de Parkinson sera validé par la présence *a minima* d'une bradykinésie, couplée à un des trois autres symptômes.

III.1.3. Les troubles non moteurs de la maladie de Parkinson

Longtemps réputée comme étant une pathologie exclusivement motrice, la maladie de Parkinson ne se limite pas aux simples symptômes moteurs. La qualité de vie des patients est également fortement diminuée par des symptômes non moteurs, qui apparaissent parfois avant que les symptômes moteurs deviennent handicapants. Parmi ceux-ci, on retrouve une perte olfactive (chez 80 % des patients), une hypotension orthostatique, des troubles gastro-intestinaux et de tonicité des sphincters (70 % des patients). Sur le plan cognitif, on note des akathisies (besoin irrésistible d'agitation)¹⁴, des troubles de l'humeur et du sommeil, ainsi que des déficits de type syndrome dysexécutif sous-cortico-frontal^{15,16}. Des douleurs chroniques, musculo-squelettiques, neuropathies et/ou liées à des dystonies (mouvements et postures anormales)^{17,18} sont également possibles.

III.1.4. Cytopathologie de la maladie de Parkinson

La dégénérescence des neurones de la voie dopaminergique nigro-striée est l'origine principale des symptômes de la maladie de Parkinson¹⁹. Ainsi, on observe une apparition des symptômes à partir de 50-60 % de dégénérescence de ces neurones, avec une dénervation dopaminergique d'au moins 75 % des noyaux caudés et du putamen^{20,21} (Figure III-1²²).

Cette dégénérescence n'est toutefois jamais complète, et ce même dans les régions cérébrales les plus sensibles (substance noire compacte [SNc] par exemple). Diverses études suggèrent par ailleurs que si la mort neuronale dopaminergique existe chez les sujets sains (moins de 0,5 % par an), elle est de l'ordre de 10 % chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, et peut être beaucoup plus rapide dans les formes sévères^{23,24}.

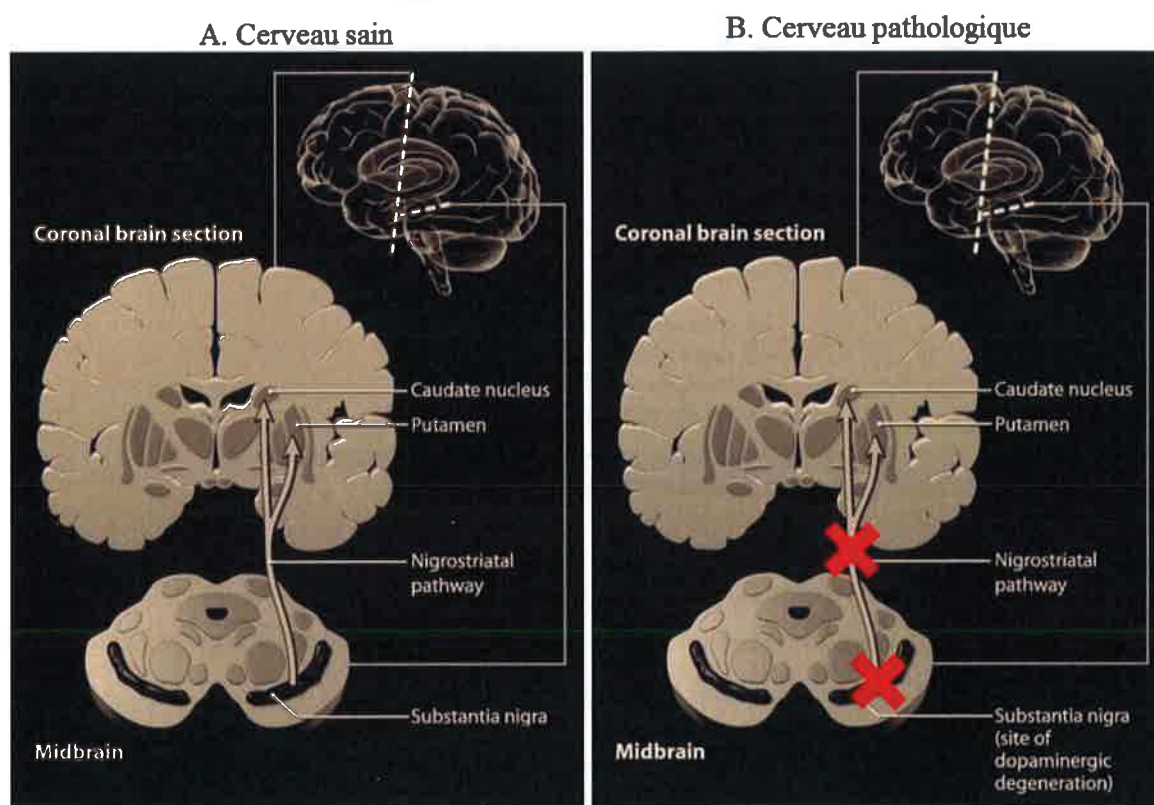


Figure III-1 : Illustration de la voie nigrostriée. A : cerveau sain. B : Cerveau atteint de la maladie de Parkinson. Adapté de Guttman et al.

Dans un fonctionnement sain des noyaux gris centraux, la SNc inhibe le *globus pallidus pars interna* (GPi) par l'intermédiaire de la substance noire réticulée (SNr), par une voie directe, et une voie indirecte (Figure III-2) :

- 1- Voie directe : la SNc active les projections dynorphiniques du striatum. A leur tour, ces projections inhibent le SNr-GPi.
- 2- Voie indirecte : la SNc inhibe les projections enkephalinergiques du striatum, ce qui désinhibe le *globus pallidus pars externa* (GPe). Ainsi, le GPe peut inhiber directement le SNr-GPi. La GPe, inhibe également le noyaux subthalamique, qui est un activateur du SNr-GPi.

Dans le cas de la maladie de Parkinson, les projections dopaminergiques sur le striatum de la SNc ne sont plus présentes. Les voies directe et indirecte d'inhibition du SNr-GPi ne sont plus fonctionnelles. Le SNr-GPi, alors désinhibé, inhibe le thalamus, ce qui est à l'origine des troubles moteurs connus dans la maladie de Parkinson, en particulier la bradykinésie²⁵ (Figure III-2²⁵).

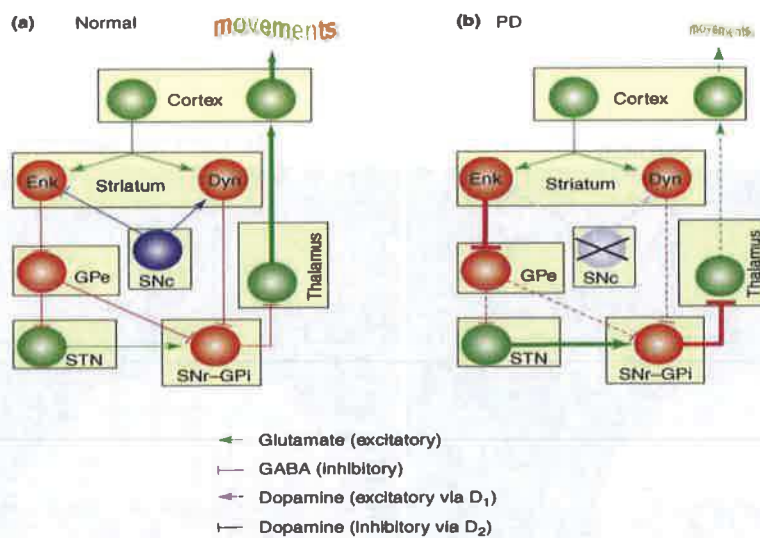


Figure III-2 : Schéma explicatif du fonctionnement de la voie nigrostriée. Adapté de Schwarzschild et al, 2006.

D'autre part, il convient de faire une distinction entre les projections dorsolatérales sur le striatum — plutôt dévolues aux fonctions motrices et particulièrement touchées dans la pathologie —, et les projections ventrales intervenant dans les fonctions cognitives²⁶.

Il est à noter que la voie nigro-striée, si elle est la plus atteinte dans la maladie de Parkinson, n'est pas la seule voie dopaminergique à être touchée. En effet, le déficit dopaminergique concerne également les voies méso-limbique et méso-corticale ; ces deux voies sont par ailleurs impliquées dans certains troubles cognitifs associés à la pathologie^{27,28}.

Par ailleurs, les voies dopaminergiques ne sont pas les seules atteintes. La maladie de Parkinson est en effet une pathologie plus diffuse. On observe également une mort d'environ 50 % des neurones noradrénergiques du locus coeruleus²⁹. Une perte d'environ 40 % des neurones

sérotoninergiques du raphé³⁰, des neurones cholinergiques du noyau basal de Meynert et du noyau pédonculopontin³¹ ont également été rapportés au début des années 1990.

Par ailleurs, à l'instar de l'Atrophie Multisystématisée et de la démence à corps de Lewy, la maladie de Parkinson appartient aux synucléinopathies. Elle se caractérise en effet par la présence anormale d'agrégats d' α -synucléine, formant des inclusions neuronales éosinophiles cytoplasmiques nommées « corps de Lewy »³². En plus de l' α -synucléine, on retrouve dans les corps de Lewy d'autres protéines comme l'ubiquitine³³, les chaînes *alpha B cristallin* (protéine de la famille des HSP). Les corps de Lewy se trouvent dans le cortex et dans le tronc cérébral ; dans ce second cas, ils sont entourés d'enchevêtrements fibrillaires composés de la protéine Tau^{34,35}. Les liens sont ainsi étroits entre la maladie de Parkinson et les autres maladies neuro-neurodégénératives.

III.1.5. Les traitements de la maladie de Parkinson

Les traitements actuellement utilisés en clinique contre la maladie de Parkinson sont tous symptomatiques, mais aucun n'agit de façon curative sur le processus de neurodégénérescence de cette pathologie³⁶. Les traitements les plus couramment utilisés sont essentiellement efficaces sur les troubles moteurs de la maladie. En ce sens, il existe deux grandes stratégies thérapeutiques :

- 1- Les approches pharmacologiques permettant de compenser la déplétion dopaminergique dans le système nerveux central. C'est un traitement substitutif. L'objectif est de 1 – rétablir les taux de dopamine circulant (dopa-thérapie), 2 – stimuler les récepteurs dopaminergiques (agonistes dopaminergiques), et 3 – potentialiser les effets de ces derniers en réduisant la dégradation de la dopamine résiduelle (inhibiteurs enzymatiques).
- 2- Une approche neurochirurgicale, dont l'objet est de supprimer le fonctionnement anormal du circuit neuronal des ganglions de la base. Cela, soit 1 – en détruisant certains circuits, par des lésions (chirurgie ablatrice) du Thalamus par exemple, ou du Pallidum interne, 2 – par la stimulation électrique à haute fréquence, qui mime les effets de ces lésions mais de façon réversible et adaptable en créant une inhibition fonctionnelle, dans le noyau sous-thalamique, le thalamus, ou le pallidum, par exemple, via un stimulateur implanté intracérébralement.

III.1.5.1. Approches pharmacologiques

Nous prendrons ici l'exemple de la dopa-thérapie, puisqu'il s'agit du traitement de référence de la maladie de Parkinson depuis son développement dans les années 1960, avec la découverte révolutionnaire de la Lévodopa (L-dopa), précurseur de la dopamine³⁷⁻³⁹.

Cette thérapeutique est très efficace dans les premiers temps du traitement, bien qu'un certain nombre d'effets secondaires moteurs apparaissent à long-terme. On distingue 3 phases « classiques » dans le traitement de la maladie de Parkinson à la L-dopa, à savoir :

- 1- La « lune de miel » dure de 3 à 6 ans, suivant les patients, qui ont alors une qualité de vie quasiment ramenée à la normale grâce au traitement. Toutefois, durant cette période, la maladie continue de progresser de façon sous-jacente.
- 2- Avec l'aggravation de la maladie, et le manque de plus en plus important en dopamine dans le système nerveux central, les doses de L-dopa doivent être augmentées. Ceci finit par perturber la pharmacocinétique des récepteurs dopaminergiques striataux et induit des périodes de fluctuations et de complications motrices. Ces complications touchent plus de

60 % des patients après 6 ans de traitement. On note ainsi une détérioration de fin de dose, qui correspond à une perte progressive des effets de la L-dopa, avec des symptômes moteurs réapparaissant plus rapidement lorsqu'on se rapproche de la fin d'une dose de traitement. Avec l'augmentation des doses nécessaires de L-dopa, et le caractère pulsatile de l'administration des doses, les récepteurs dopaminergiques striataux sont altérés et perdent leur souplesse de fonctionnement. Ceci induit des fluctuations brutales (périodes ON-OFF) et des dyskinésies dopa-induites. Les patients se retrouvent alors dans une situation où ils sont « OFF » sans traitement, à savoir akinétiques et/ou bradykinétiques, puis dyskinétiques (mouvements désordonnés et incontrôlés) pendant les périodes « ON » sous traitement.

- 3- Avec l'aggravation de la maladie, certains patients finissent par atteindre un stade, encore plus handicapant, où la L-dopa n'est plus efficace. Les patients sont alors totalement bloqués, sans que la L-dopa ne parvienne à rétablir une partie de leurs capacités de mouvements.

III.1.5.2. Approches neurochirurgicales

Le noyau sous-thalamique appartient à un ensemble de régions sous-corticales appelé « ganglions de la base » ou « noyaux gris centraux » qui comprennent aussi, entre autres, le thalamus et le pallidum, en étroite connexion avec le striatum (noyau caudé et putamen). La voie dopaminergique nigro-striée joue un rôle principal dans la modulation du circuit des ganglions de la base. Dans ces conditions, il est aisé de comprendre que la dénervation dopaminergique observée dans la maladie de Parkinson entraîne des modifications fonctionnelles importantes au sein des ganglions de la base. On retrouve notamment une hyperactivité du noyau sous-thalamique, sur le plan électrophysiologique^{40,41} mais également métabolique⁴².

Fortes de ce constat, et sur la base de constatations pragmatiques, les premières approches chirurgicales étaient lésionnelles, avec une destruction de tout ou partie du noyau thalamique (efficace surtout sur le tremblement) et du pallidum interne (efficace surtout sur les dyskinésies et la rigidité). Des études sur des modèles primates de la maladie de Parkinson ont mis à jour le rôle du noyau sous-thalamique, en suggérant qu'une inhibition (destruction en l'occurrence) du noyau sous-thalamique pouvait réduire les troubles moteurs de la maladie^{43,44}.

Toutefois, toute approche lésionnelle pose le problème de la réversibilité. D'autant plus que les lésions du noyau sous-thalamique étaient réputées s'accompagner d'effets secondaires aussi spectaculaires (hemiballisme) que sévères. Ainsi, à la fin des années 1980, sous l'impulsion de l'école grenobloise (Professeur Benabid), l'approche lésionnelle a été remplacée par une stimulation

électrique à haute fréquence, la « stimulation cérébrale profonde », ou DBS pour « deep brain stimulation » du thalamus d'abord, puis du pallidum, et enfin, en 1993, du noyau sous-thalamique⁴⁵. Cette nouvelle approche réduit drastiquement les troubles moteurs des trois symptômes de la triade dopaminergique^{46,47} et permet notamment de diminuer la médication pharmacologique antiparkinsonienne de 50 à 100 %⁴⁸. En plus d'être très efficace contre les symptômes en eux-mêmes, cette approche permet donc, indirectement, de diminuer les dyskinésies L-dopa induites chez les patients⁴⁹. Enfin, l'efficacité de la DBS est corrélée à une bonne réponse des patients au traitement à la L-dopa, ce qui en fait un des facteurs clés de sélection des malades pour l'indication opératoire de la stimulation sous-thalamique.

Notons toutefois que la DBS est essentiellement symptomatique. Elle présente l'inconvénient de nécessiter une implantation à vie de dispositifs permettant des réglages pour optimiser les effets. Il s'agit par ailleurs d'un acte chirurgical invasif, quoique bien moins invasif que les thalamotomies ou pallidotomies, et *a fortiori* que les subthalamotomies. La DBS est habituellement réalisée chez des patients chez qui les effets secondaires de la L-dopa à forte dose les privent d'un soulagement optimal.

III.2. LA NEUROPROTECTION COMME STRATEGIE THERAPEUTIQUE

III.2.1. Concept de neuroprotection et méthodes d'évaluation

Ginsberg et al, en 2008⁵⁰ définissent la neuroprotection comme toute thérapeutique ou combinaison de thérapeutiques stoppant ou ralentissant la mort neuronale. Dans le cadre de la maladie de Parkinson, il s'agit d'une thérapeutique capable d'agir sur l'évolution de la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc. Le développement d'une stratégie thérapeutique permettant un ralentissement de la maladie de Parkinson est l'un des axes de recherche les plus étudiés actuellement.

Toutefois, la question de l'évaluation des capacités neuroprotectrices d'un traitement reste entière à ce jour. En effet, s'il est aisé, dans les modèles *in vitro* ou animaux de la pathologie, d'apporter la preuve de concept du potentiel neuroprotecteur d'une nouvelle thérapeutique (par comptage cellulaire par exemple), cela s'avère bien plus compliqué chez l'humain. Un simple comptage cellulaire, par analyse histologique de tranches de cerveaux n'est pas possible chez l'humain, dans la mesure où les patients impliqués dans un essai clinique restent vivants à la fin du protocole. On souhaite de plus juger cette neuroprotection dès le début de la mise en œuvre de l'approche étudiée.

Dans ces conditions, plusieurs méthodes de mesure ont été proposées, pour déterminer le pouvoir neuroprotecteur d'une thérapeutique testée lors d'un essai clinique.

III.2.1.1. Etudes symptomatiques

Plusieurs études ont proposé de se baser sur le délai de mise en place d'un traitement dopaminergique comme paramètre de mesure. Au premier abord, ce paramètre semble d'intérêt, puisque 1 – il est un témoin indirect de la sévérité de la maladie chez le patient, et 2 – il est applicable chez des patients présentant une pathologie non encore sévère (quoique peu sensible sur des patients en tout début de maladie). Toutefois, la quantification de ce paramètre est très sujette aux interprétations des personnels soignants, du fait de leurs habitudes thérapeutiques⁵¹. Le fait que nous ne sachions toujours pas à ce jour si la maladie de Parkinson suit une évolution linéaire ou non, rend également ce paramètre de mesure incertain⁵².

L'outil le plus utilisé actuellement pour quantifier la gravité des symptômes chez le patient parkinsonien est l'échelle *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPDRS), qui classe et quantifie l'état clinique du malade⁵³. Celle-ci a été récemment améliorée, pour y intégrer une

quantification des troubles non moteurs de la maladie : *Mouvement Disorders Society-UPDRS* (MDS-UPDRS⁵⁴). Cette modification semble par ailleurs mieux adaptée à des études à long-terme.

III.2.1.2. *Etudes des marqueurs biologiques*

Un autre angle d'approche de l'évolution de la maladie de Parkinson est l'utilisation de marqueurs biologiques. Si l'étude histologique directe n'est pas possible pour les raisons présentées plus haut, certains marqueurs en relation avec le stress oxydatif, mesurables dans la circulation sanguine, pourraient être utilisés pour quantifier le niveau d'évolution de la dégénérescence⁵⁵. Pour ce faire, il est cependant indispensable de connaître la relation entre la cinétique d'évolution de tels marqueurs et celle de la pathologie ; ce n'est pas le cas aujourd'hui.

Une solution pourrait résider dans l'imagerie fonctionnelle médicale. Par exemple, on peut quantifier la captation de la 18 fluoro-L-dopa⁵⁶ par tomographie par émission de positons (TEP) et du 123-I-β-CIT⁵⁷ par la SPECT-CT (single-photon Emission computerized tomography — coupled with CT) qui sont des marqueurs anatomo-fonctionnels de la synapse dopaminergique (semi quantitatif pour 123-I-β-CIT). Ceci est un bon témoin de la survie neuronale dans les régions étudiées. Toutefois, ces mesures restent des témoins indirects de la survie neuronale et possèdent, pour le 123-I-β-CIT par exemple, une résolution spatiale limitée.

Au-delà de la dégénérescence dopaminergique, certains autres biomarqueurs de la maladie pourraient être envisagés comme témoins de l'évolution de celle-ci, et donc de l'efficacité potentielle d'un traitement neuroprotecteur. Ainsi, nous pouvons citer l'apolipoprotéine A1 (ApoA1). En effet, Qiang et al ont montré en 2013 qu'une faible concentration plasmatique d'ApoA1 est un facteur de risque de la maladie de Parkinson. De plus, cette diminution de concentration est corrélée à une perte dopaminergique dans le putamen. Nous pourrions donc imaginer que le dosage de l'ApoA1 puisse être un outil de suivi de l'évolution de la pathologie, ou de son ralentissement par un neuroprotecteur.

D'autres marqueurs peuvent être envisagés, comme le taux d'amyloïdes dans le fluide cébrospinal qui, s'il est réduit, est un facteur de risque pour les symptômes non moteurs de la pathologie. Notons également l'urée dont le taux est réputé réduit chez les patients parkinsoniens. Ces bio-marqueurs, s'ils sont d'intérêts dans le diagnostic de la pathologie, n'ont pas encore fait leurs preuves dans l'étude de l'évolution de celle-ci.

III.2.1.3. L'apport de l'imagerie médicale

Il existe plusieurs modalités d'imagerie médicale utilisées dans la maladie de Parkinson. Nous avons déjà évoqué précédemment la TEP et son intérêt dans le suivi de l'évolution de la neurodégénérescence. Nous avons également mentionné la tomographie d'émission monophotonique (SPECT). Ces deux méthodes permettent de suivre l'évolution de la mort neuronale, à travers différents marqueurs (18 fluoro-L-dopa pour la TEP, transporteur DAT ou transporteur de la monoamine vésiculaire de type 1 pour la SPECT, par exemple). D'autre part, elles permettent de détecter une perte neuronale avant même que les premiers symptômes moteurs apparaissent, ce qui en fait une des méthodes diagnostiques à la fois précoces et capables de suivre l'évolution de la maladie. Elles sont donc, *a priori*, adaptées à un essai clinique cherchant à évaluer le potentiel neuroprotecteur d'une stratégie thérapeutique. Toutefois, les résultats obtenus avec ces méthodes sont peu corrélés à l'échelle UPDRS, surtout dans les premières phases de la pathologie.

D'autre part, la sonographie transcraniale (STC) met en évidence une échogénicité accrue chez 90 % des patients parkinsoniens étudiés. La STC permet en outre de prédire le risque de développer une maladie de Parkinson. Ainsi, Berg et al, en 2011, ont montré que sur 1847 personnes âgées étudiées, celles possédant une hyper-échogénicité nigrale présentent 17 fois plus de risque de déclarer une maladie de Parkinson. Cette méthode d'imagerie est par ailleurs totalement non invasive. Toutefois, à notre connaissance, aucune étude n'a suivi l'évolution de cette échogénicité en fonction de la mort neuronale. Les résultats d'une telle étude pourraient déterminer si la STC représente un intérêt dans l'évaluation du potentiel neuroprotecteur d'une thérapeutique. Ces méthodes participent à évaluer les facteurs de risque d'évolution de la maladie, mais restent insuffisantes pour apprécier précisément l'évolution sous traitement des formes très précoces de celle-ci.

Notons enfin l'imagerie par résonance magnétique (IRM), entre autre l'IRM avec étude de l'anisotropie de diffusion. Plusieurs études ont montré qu'une réduction de l'anisotropie de diffusion dans la substance noire est corrélée à la sévérité des symptômes moteurs observés. Cette méthode semble donc permettre d'évaluer la progression de la pathologie. Elle paraît adaptée à l'évaluation du potentiel neuroprotecteur d'une thérapeutique.

cultures cellulaires (PC12) et murins^{80,81}. Le pramipexole favorise la protection dopaminergique dans des modèles 6-OHDA et MPTP *in vivo* et *in vivo*⁸²⁻⁸⁴.

A ce jour, les mécanismes d'action d'une éventuelle neuroprotection induite par les agonistes dopaminergiques ne sont pas bien connus. Bien que ces molécules puissent agir comme éliminateurs des radicaux libres, cette propriété semble être présente uniquement en cas de fortes concentrations.

Sur la base de ces nombreux résultats encourageants, deux études cliniques ont été réalisées, afin d'évaluer le potentiel neuroprotecteur des agonistes dopaminergiques chez l'humain.

La première étude a analysé pendant 4 ans l'effet du pramipexole sur la désafférentation dopaminergique chez des patients récemment diagnostiqués⁵⁷. Ici, les patients ayant reçu le traitement au pramipexole ont présenté 36 % de moins de désafférentation dopaminergique dans le striatum que les patients non traités (mesure par SPECT de la recapture du β -CIT). Des résultats similaires ont été observés dans la seconde étude, qui évaluait le potentiel neuroprotecteur du ropinirole, par mesure par TEP de la recapture de la fluorodopamine⁵⁶. Toutefois, il est à noter qu'aucune de ces deux études n'a pu montrer de bénéfice clinique en faveur des agonistes dopaminergiques.

Aucun groupe placebo n'a été inclus dans ces études, ce qui interdit toute conclusion sur le potentiel neuroprotecteur des agonistes dopaminergiques. De plus, le fait que certains patients aient reçu un traitement à la L-dopa pendant le protocole, du fait de la dégradation de leur état, peut biaiser les résultats et empêcher de tirer des conclusions claires. En tous les cas, les résultats d'imagerie démontrent que les agonistes dopaminergiques ralentissent la neurodégénérescence, bien qu'il n'y ait pas de bénéfice clinique correspondant.

Dans ces conditions, et en résumé, il semble nécessaire de réaliser des études à plus long terme, avec des groupes placebo, pour trancher de façon claire sur le potentiel neuroprotecteur des agonistes dopaminergiques dans la maladie de Parkinson.

III.2.2.3. Soutien à la fonction mitochondriale

La démonstration d'une déficience du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, ainsi que l'identification de causes génétiques mitochondriales dans la maladie de Parkinson, a ouvert un nouveau champ de recherche pour la neuroprotection : le soutien de la fonction bioénergétique de la mitochondrie comme traitement de la maladie de Parkinson⁸⁵⁻⁸⁷.

Par exemple, le coenzyme Q10 (CoQ10), qui est un transporteur d'électrons entre les complexes I et III dans la chaîne respiratoire, mais également un antioxydant, a été cité comme neuroprotecteur potentiel. Ainsi, une étude clinique en double aveugle, avec groupe placebo, a démontré qu'à de fortes doses de CoQ10, la dégradation des performances motrices et de la qualité de vie des patients (échelle UPDRS) était ralentie par rapport au groupe contrôle⁸⁸. Toutefois, ces résultats ont été obtenus en tout début de protocole. Plusieurs analyses de la futilité du CoQ10 ont donné des résultats contradictoires⁸⁸⁻⁹¹. Il semble donc difficile, dans ces conditions, de déterminer si le CoQ10 présente un réel intérêt neuroprotecteur dans la maladie de Parkinson.

Un second exemple peut être donné avec celui de la créatine. Celle-ci est phosphorylée en phosphocréatine et peut alors transférer son groupement phosphate sur l'adénosine diphosphate (ADP), pour produire de l'adénosine triphosphate (ATP). De cette façon, la production énergétique cellulaire est augmentée. L'hypothèse de travail pour la neuroprotection a donc été qu'un traitement à la créatine pourrait soutenir la production énergétique des neurones dopaminergiques et ainsi les aider à lutter contre l'atteinte parkinsonienne. C'est ce que suggèrent les résultats de Matthews et al⁹². Une étude clinique en aveugle, avec placebo, sur 24 mois, n'a toutefois pas montré de différence sur l'échelle UPDRS, ou en SPECT de densité du transporteur de la dopamine, entre les groupes traité et contrôle⁹³. Malgré tout, le groupe traité requérait un soutien dopaminergique symptomatique inférieur au groupe contrôle. Ceci indiquerait un effet positif de la créatine, sans pouvoir le démontrer avec certitude.

III.2.2.4. Traitements anti-inflammatoires

Les exemples d'activation des processus inflammatoires dans la substance noire, dans la maladie de Parkinson, sont nombreux⁹⁴. Toutefois, il n'est toujours pas clairement défini si cette réaction inflammatoire est un symptôme primaire de la maladie ou s'il s'agit d'une conséquence secondaire. En tous les cas, la piste anti-inflammatoire comme stratégie neuroprotectrice dans la maladie de Parkinson semble faire sens. En effet, quel que soit le mécanisme qui induit l'inflammation, celle-ci contribue à la mort cellulaire, et chercher à limiter ses effets semble aller de soi. Plusieurs études précliniques ont montré l'efficacité de molécules anti-inflammatoires dans des modèles de la maladie de Parkinson.

Prenons l'exemple de l'acide acétylsalicylique (aspirine), inhibiteur des cyclooxygénases 1 et 2, et du meloxicam, inhibiteur de la cyclooxygénase 2. Dans un modèle rat 6-OHDA, la mort des neurones dopaminergiques de la substance noire est significativement réduite par ces deux molécules, prodiguées en pré-traitement⁹⁵.

D'autre part, des études épidémiologiques ont étudié le potentiel neuroprotecteur des anti-inflammatoires. Ainsi, Chen et al⁹⁶ ont montré que l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens plusieurs fois par semaine permettait de réduire de 45 % le risque de développer la maladie de Parkinson.

Autre exemple : la minocycline. Il s'agit d'un anti-inflammatoire et d'un anti-apoptotique. Une analyse de futilité a montré l'intérêt de cette molécule comme neuroprotecteur⁹⁷. Toutefois, comme pour tous les anti-inflammatoires, les effets secondaires de cette molécule ne sont pas négligeables. Enfin, certaines études ont présenté des résultats contradictoires à ceux ci-dessus, voire même un effet délétère sur l'état clinique des patients⁹⁸.

En résumé, bien que potentiellement neuroprotecteurs, les anti-inflammatoires n'ont pas montré d'efficacité réelle contre la maladie de Parkinson.

En conclusion de cette section, bien que les stratégies neuroprotectrices contre la maladie de Parkinson soient nombreuses, et parfois prometteuses, aucune d'elles n'a réussi à démontrer une efficacité sans équivoque dans le ralentissement de la neurodégénérescence, lors d'une étude clinique en aveugle.

III.2.3. L'apport des modèles animaux de la maladie de Parkinson

Dans un objectif de découverte de nouvelles stratégies neuroprotectrices contre la maladie de Parkinson, il apparaît que la recherche préclinique et l'utilisation de modèles animaux est indispensable. On note deux types principaux de modèles de la maladie de Parkinson : 1 – les modèles pharmacologiques, neurotoxiques, et 2 – les modèles génétiques.

La présente section n'a pas pour but de lister de façon exhaustive les modèles existants. Il s'agit ici de présenter les modèles les plus couramment utilisés et de s'attarder sur les modèles utilisés dans nos propres travaux.

III.2.3.1. Modèle pharmacologique historique : reserpine

Du point de vue mécanistique, la reserpine inhibe le transporteur de la monomamine vésiculaire (VMAT2). Cette inhibition entraîne une diminution centrale et périphérique des monoamines telles que la noradrénaline, la sérotonine et la dopamine. Bien que non spécifique de la dopamine, ce modèle reste intéressant dans l'étude de la maladie de Parkinson, dans la mesure où les voies noradrénergiques et sérotoninergiques sont également impliquées³¹. Heeringa et Abercrombie ont montré une perte dopaminergique de l'ordre de 85 % dans la SNc et de 95 % dans le striatum. Il est intéressant de noter que si une récupération fonctionnelle de l'ordre de 30 % est observée dans la SNc, cette perte est robuste dans le striatum¹⁰⁴.

Il s'agit de l'un des premiers modèles *in vivo* de la maladie de Parkinson. Il présente peu d'intérêt pour des études sur la neuroprotection, car il est principalement centré sur les symptômes de la maladie. Toutefois, c'est grâce à ce modèle que Carlsson et al en 1957⁹⁹ ont pu démontrer l'efficacité de la L-dopa en traitement des symptômes de la pathologie. Pour rappel, la L-dopa est aujourd'hui le standard de référence dans le traitement des symptômes chez les patients parkinsoniens.

Ce modèle animal a également beaucoup contribué à la compréhension du lien entre le métabolisme des monoamines et les symptômes parkinsoniens. Notons que le modèle reserpine présente toujours une utilité de nos jours dans la découverte de nouvelles molécules anti-parkinsoniennes, comme les agonistes des récepteurs D3¹⁰⁰, les agonistes des récepteurs du glutamate du groupe III^{101,102}, ou encore les agonistes A2A/A1¹⁰³.

La reserpine n'agit pas uniquement sur la SNc, mais sur l'ensemble des ganglions de la base. Notons une augmentation de 50 % du taux de décharge du STN¹⁰⁵, phénomène également présent chez les patients¹⁰⁶.

Sur le plan comportemental, la reserpine provoque une akinésie et une rigidité des membres postérieurs chez le rat. C'est précisément la capacité d'un traitement médical à inverser cette rigidité qui en fait un traitement potentiellement intéressant sur la pathologie.

III.2.3.2. Modèles neurotoxiques

III.2.3.2.1. Modèle rat 6-OHDA

La caractérisation de la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) comme neurotoxine dopaminergique de la voie nigrostriée¹⁰⁷ en a fait l'un des modèles références pour induire un syndrome parkinsonien chez le rongeur. Contrairement au 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP), la 6-OHDA est lipophobe et ne peut pas traverser la barrière hémato-encéphalique. Une injection intracérébrale est donc nécessaire. Il existe deux sous-modèles : un par lésions bilatérales et un par lésion unilatérale. Le modèle par lésion unilatérale est toutefois très majoritairement utilisé. En effet, le modèle par lésions bilatérales provoque une mortalité importante des animaux, du fait entre autres d'une aphagie prononcée (intubation alimentaire requise)¹⁰⁸. D'autre part, le modèle unilatéral étant celui que nous avons utilisé dans ces travaux, nous nous concentrerons sur celui-ci.

La 6-OHDA est systématiquement injectée dans la voie nigrostriée. Trois localisations sont principalement utilisées : 1 – directement dans la substance noire compacte, où se trouvent les corps cellulaires dopaminergiques touchés dans la maladie de Parkinson, 2 – dans le faisceau médian antérieur (mfb), par lequel passent les projections nerveuses nigrostriées, et 3 – dans le striatum, au niveau des terminaisons nerveuses de cette même voie. Le choix du lieu d'injection dépend de l'objectif de l'étude donnée. Par exemple, dans une étude où l'intégrité physique de la substance noire doit être assurée, une injection dans le mfb ou le striatum devra être favorisée. D'autre part, une injection dans le mfb provoque une déplétion dopaminergique majeure et rapide, et n'est donc pas favorable à l'étude d'une nouvelle stratégie neuroprotectrice — il doit rester des neurones à protéger^{102,109,110}.

A la suite de son injection, la 6-OHDA est internalisée dans les neurones dopaminergiques par le transporteur de la dopamine (DAT). Puisque la 6-OHDA a également une affinité avec le transporteur de la noradrénaline (NET)¹¹¹, une injection d'inhibiteur de NET peut être couplée à l'injection de 6-OHDA de façon à augmenter la spécificité de celle-ci envers DAT.

Le mécanisme d'action intracellulaire de la 6-OHDA n'est pas complètement connu. Toutefois, il semblerait que la 6-OHDA provoque la mort neuronale à travers un dysfonctionnement

de la chaîne respiratoire mitochondriale et une augmentation du stress oxydatif. Plusieurs études montrent que la 6-OHDA s'oxyde rapidement dans la cellule pour 1 – former des molécules oxygénées réactives comme H_2O_2 ¹¹², 2 – réduire le taux d'enzymes antioxydantes dans le striatum (GSH, superoxyde dismutase)^{113,114}, 3 – élever le taux de fer dans la substance noire¹¹⁵, et 4 – interagir directement avec les complexes I et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui induit un dysfonctionnement de celle-ci, une diminution de la production d'adénosine triphosphate (ATP), et une augmentation du stress oxydatif¹¹⁶. Le grand intérêt de la 6-OHDA dans l'étude de la maladie de Parkinson réside dans le fait que la plupart de ses mécanismes connus existent également dans la véritable pathologie¹¹⁷.

De plus, comme vu précédemment, des mécanismes inflammatoires sont fortement présents dans la pathologie^{118,119}, avec une activation microgliale visible sur des cerveaux de patients, en imagerie TEP post-mortem avec le ligand PK11195¹²⁰. Cette même méthode d'imagerie a montré une activation microgliale équivalente dans le striatum chez des rats 6-OHDA¹²¹. La présence de marqueurs de l'inflammation, comme $TNF-\alpha$ ¹²² chez des rats 6-OHDA, marqueur également présent chez les patients¹²³, confirme la cohérence du modèle 6-OHDA comme modèle de la maladie de Parkinson.

Enfin, le modèle 6-OHDA mime plusieurs spécificités biochimiques de la maladie de Parkinson, comme la réduction du taux de dopamine striatale et du nombre de neurones tyrosine hydroxylase positifs (TH^+) dans la substance noire¹²⁴. Ce dernier marqueur est, avec la sensibilité comportementale à l'apomorphine, l'un des marqueurs de choix pour déterminer 1 – la valeur d'un modèle de la pathologie, et 2 – le potentiel neuroprotecteur d'une stratégie thérapeutique.

Concernant le modèle unilatéral spécifiquement, l'un des intérêts réside dans le fait que la lésion est évolutive dans le temps. Environ deux semaines semblent en effet nécessaires pour atteindre le niveau de lésion maximale¹²⁵⁻¹²⁹. De plus, la quantification du comportement rotatoire sous apomorphine des rats 6-OHDA unilatéraux est le test comportemental de référence pour évaluer l'étendue de la lésion dopaminergique^{126,127,129-131}. Du fait de l'apparition progressive de l'hypersensibilité de dénervation au niveau du striatum, après la mort neuronale dans la substance noire, l'évolution du comportement rotatoire peut prendre plus que deux semaines à se stabiliser¹²⁴.

Malgré les nombreux avantages que présente le modèle 6-OHDA, il existe également certaines limites à celui-ci. Tout d'abord, son injection nécessite des compétences en chirurgie stéréotaxique et un matériel chirurgical spécifique.

La limite principale du modèle 6-OHDA est, au même titre que la plupart des autres modèles neurotoxiques, l'absence de formation de l'un des grands marqueurs de la maladie de Parkinson : le

corps de Lewy. Les corps de Lewy sont des inclusions éosinophiles contenant entre autres de l' α -synucléine^{132,133} (protéine située, dans le cerveau, au niveau des terminaisons présynaptiques, en autres dans les neurones dopaminergiques). L' α -synucléine est connue pour s'accumuler dans le cerveau des patients parkinsoniens¹³⁴. Une étude contradictoire sur le sujet a montré la présence d'agrégats d' α -synucléine dans le modèle 6-OHDA¹³⁵. Ce résultat reste à confirmer. D'autre part, chez l'humain, on observe des altérations physiologiques dans le *locus coeruleus* et les noyaux du raphé, qui n'existent pas dans le modèle 6-OHDA.

De plus, plusieurs études ont noté une récupération spontanée des rats lésés 3-4 mois après la lésion. Ce modèle ne semble donc pas adapté pour une étude à long terme^{136,137}.

Une autre limite importante du modèle 6-OHDA unilatéral réside précisément dans son unilatéralité. Nous avons établi précédemment l'intérêt de celle-ci. Toutefois, puisque le rat est peu touché au niveau moteur (seulement un hémicorps atteint), il parvient sans grandes difficultés à compenser ce déficit moteur avec son hémicorps sain. Ainsi, une étude motrice avec des animaux en situation « OFF » (non supplémentés en agonistes dopaminergiques) s'avère difficile à réaliser¹³⁸ et nécessite des compétences spécifiques en analyse comportementale.

En résumé, le modèle de lésion à la 6-OHDA mime la maladie de Parkinson sous de nombreux aspects : dysfonctionnement mitochondrial, stress oxydatif, inflammation, neurodégénérescence dopaminergique. Toutefois, ce modèle ne présente pas tous les marqueurs de la pathologie. De façon générale, la mort cellulaire intervient plus rapidement dans le modèle 6-OHDA à une seule injection (2 semaines ; soit 1 à 2 ans, ramené à l'espérance de vie humaine) que dans la véritable pathologie (plusieurs années). Enfin, la présence de corps de Lewy doit encore être confirmée, et le caractère unilatéral des symptômes ne mime pas parfaitement la pathologie.

Néanmoins, dans la mesure où l'ensemble de ces limites sont connues et bien comprises, le modèle 6-OHDA reste un modèle de référence de la maladie de Parkinson.

III.2.3.2.2. Modèle souris MPTP

Le MPTP est une molécule capable d'induire un syndrome parkinsonien chez l'humain^{139,140}. Cette propriété, découverte au début des années 1980, fait du MPTP l'une des toxines les plus utilisées pour induire un modèle de maladie de Parkinson chez les rongeurs et les primates non-humains (PNH). Plusieurs études de référence chez le PNH ont identifié la capacité du MPTP à provoquer une destruction sélective de la voie nigrostriée dopaminergique. C'est ce phénomène qui, par ailleurs, est à

l'origine des importants déficits moteurs observés chez les animaux intoxiqués¹⁴¹⁻¹⁴³. Ce mode d'action en fait l'un des modèles animaux de la maladie de Parkinson les plus robustes à ce jour. Dans la mesure où cette thèse se concentre sur des modèles rongeurs de la maladie de Parkinson, nous ne détaillerons pas ici le modèle primate MPTP, sans toutefois oublier l'intérêt préclinique majeur qu'il représente.

Plusieurs espèces, dont le rat, sont très peu sensibles au MPTP, probablement à cause de leur clairance rapide du MPP^+ , à savoir le métabolite toxique du MPTP¹⁴⁴. Toutefois, certaines souches de souris, comme les C57Bl6, les Swiss Webster, ou encore les Balb/c^{145,146} répondent très bien à l'intoxication au MPTP. Le modèle souris MPTP est aujourd'hui l'un des modèles MPTP les plus répandus en laboratoire.

Contrairement à la 6-OHDA, le mécanisme d'action du MPTP est relativement bien connu. Le MPTP est une protoxine lipophile pouvant traverser la barrière hémato-encéphalique après une injection systémique (intra-péritonéale ou sous-cutanée)¹⁴⁷. Une fois dans le cerveau, le MPTP est internalisé dans les astrocytes, puis oxydé en 1-méthyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium ($MPDP^+$) par la MAO-B. Dans un second temps, le $MPDP^+$ s'oxyde spontanément en 1-méthyl-4-phenylpyridinium (MPP^+). Le MPP^+ est ensuite relargué dans l'espace extracellulaire, puis internalisé dans les neurones dopaminergiques par le transporteur DAT (voir Figure III-3). Dans le cytoplasme, le MPP^+ augmente la production de radicaux libres qui contribuent à la toxicité cellulaire¹⁴⁸.

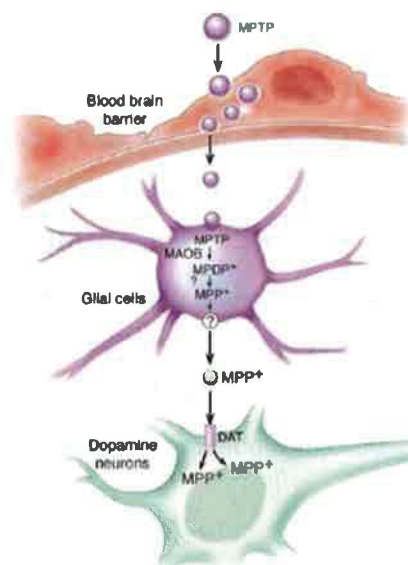


Figure III-3 : Exemple du mécanisme d'assimilation du MPTP. Tiré de Dauer et al 2003.

L'action principale du MPP^+ se trouve cependant au sein des mitochondries. Le MPP^+ dérègle le métabolisme respiratoire en inhibant le complexe I de celui-ci¹⁴⁹. Ceci détruit le flux de transport des électrons tout au long de la chaîne respiratoire, aboutissant à une réduction de la synthèse d'ATP,

et une production importante de radicaux libres (dont le superoxyde). L'effet couplé de la réduction cellulaire du taux d'ATP et de la production de radicaux libres est très probablement à l'origine de l'initiation de signaux de mort cellulaire, telles que la kinase p38¹⁵⁰, la kinase N-terminale c-jun¹⁵¹, et bax^{152,153}. La présence de tous ces mécanismes a été déterminée dans des modèles MPTP *in vivo*. Ils contribuent certainement à la mort des neurones dopaminergiques par apoptose^{154,155}. Retenons par ailleurs que l'ensemble de ces mécanismes ont également été caractérisés dans la véritable maladie de Parkinson, ce qui confirme la cohérence du modèle MPTP dans l'étude de cette pathologie.

De par ses propriétés lipophiles, le MPTP ne nécessite pas de compétences en neurochirurgie pour induire le modèle (contrairement à la 6-OHDA). La lésion induite est toujours bilatérale (même si elle n'est pas parfaitement symétrique), ce qui s'approche de la pathologie humaine. De plus, le MPTP induit un certain nombre de paramètres biochimiques présents dans la maladie de Parkinson. Par exemple, en plus de la réduction dopaminergique dans le striatum et la perte de la positivité à la tyrosine hydroxylase des neurones de la substance noire, on peut noter une élévation du taux d'acétylcholine dans le striatum¹⁵⁶. On note également une augmentation du taux de glutamate extracellulaire au niveau de la substance noire, ce qui est très probablement lié à la forte mort dopaminergique dans cette région¹⁵⁷. De son côté, le taux de GSH est réduit dans cette région¹⁵⁸, comme dans la maladie de Parkinson.

Sur le plan immunologique, certains marqueurs inflammatoires sont fortement augmentés dans le striatum et la substance noire, chez des souris MPTP^{159,160}, tout comme dans la pathologie humaine.

Malgré ces nombreux points en faveur du modèle MPTP, celui-ci présente un certain nombre de limites. Notons tout d'abord la faible reproductibilité des conséquences comportementales de la mort cellulaire. D'autre part, les souris sont moins sensibles au MPTP que les primates, ce qui oblige à utiliser de fortes doses de toxine. De telles doses sont régulièrement létales du fait d'une neurotoxicité périphérique, ou encore d'une cardiotoxicité aigüe¹⁶¹. Cette létalité est dose dépendante¹⁶² et peut être évitée en échelonnant les administrations^{163,164}. En dehors de l'intérêt éthique évident, le fait d'échelonner les injections permet également d'obtenir un modèle plus chronique, et donc plus proche de la pathologie humaine.

L'une des limites pratiques majeures du modèle MPTP est que l'humain présente une grande sensibilité à ce produit. Ceci oblige l'expérimentateur à travailler dans ces conditions de sécurité lourdes et contraignantes, avec une exposition continue à la toxine, mais également aux excréments contaminés des animaux¹⁶⁵.

La présence de corps de Lewy dans le modèle MPTP souris est controversée. Par exemple, Meredith et al¹⁶⁶, en 2002 ont caractérisé *in vivo* des neurones intoxiqués, toujours TH⁺, et présentant

des inclusions d' α -synucléine. Toutefois, celles-ci ne ressemblaient pas à des corps de Lewy. Un grand nombre d'études postérieures n'ont pas trouvé de corps de Lewy, ou toute autre inclusion pouvant s'en approcher, dans leurs modèles souris MPTP^{163,167-169}.

A noter également les difficultés de reproductibilité du modèle. En effet, le modèle MPTP est dépendant de la souche de souris utilisées, mais également du fournisseur des animaux, de l'âge, du sexe et du poids de ceux-ci^{146,170}. Couplé à la multitude de paradigmes expérimentaux décrits dans la littérature scientifique, ceci contribue à la variabilité des lésions induites, rendant l'étude transversale d'une stratégie thérapeutique parfois compliquée.

En effet, les protocoles d'injection du MPTP abondent. Nous pouvons les classer en trois catégories : aigu, subaigu, chronique :

- 1- Le principe des modèles aigus est de provoquer un parkinsonisme rapide, sévère et permettant une étude à court terme. Les modèles aigus présentent toutefois un fort risque de cardiotoxicité (cf paragraphes précédents), et donc une létalité accrue. Il s'agit de modèles développés pour étudier le potentiel thérapeutique ou neuroprotecteur d'un nouveau traitement, et d'optimiser ses effets à grande échelle. Pour ces raisons, et bien que 1 – ces modèles ne miment pas l'évolution progressive de la maladie, et 2 – les animaux présentent une récupération fonctionnelle au bout d'un temps court (quelques jours), nous avons choisi un modèle aigu de la pathologie pour ces travaux de thèse.
- 2- Les modèles subaigus ont à l'origine été développés pour étudier les symptômes pré-moteurs, présents en début de pathologie. L'inconvénient principal de ces modèles réside dans la grande hétérogénéité interindividuelle qu'induisent de faibles doses répétitives de MPTP. D'autre part, puisqu'ils induisent une mort neuronale limitée, ces modèles sont d'un intérêt réduit pour cette thèse.
- 3- Les modèles chroniques ont pour objectif de mimer l'évolution progressive de la maladie de Parkinson, par l'injection de très faibles doses de MPTP sur plusieurs semaines, voire plusieurs mois. Il s'agit de modèles longs à mettre en place. Ils présentent, tout comme les modèles subaigus, une très forte variabilité interindividuelle, difficilement contrôlable dans le cas d'études à grande échelle. En contrepartie, la mise en place progressive de la pathologie permet d'obtenir des animaux avec un parkinsonisme beaucoup plus robuste dans le temps que les modèles aigus.

Pris ensemble, les nombreux avantages et les limites du MPTP en font un modèle de choix pour la découverte et l'étude de nouvelles stratégies thérapeutiques contre la maladie de Parkinson.

III.2.3.3. Modèles génétiques

Si la plupart des patients parkinsoniens souffrent d'une forme sporadique de la pathologie, il existe des formes familiales de la maladie de Parkinson. La découverte de plusieurs gènes impliqués dans la pathologie a permis de développer des modèles animaux génétiquement modifiés, essentiellement souris. Il est par ailleurs intéressant de noter que les produits des gènes découverts sont impliqués dans des mécanismes communs à ceux de la mort cellulaire dans les formes sporadiques de la maladie de Parkinson. On notera 1 – des dysfonctionnements mitochondriaux (α -synucléine, PINK1, DJ-1, LRRK2), et 2 – des altérations de la structure et du métabolisme de certaines protéines (α -synucléine, parkin, UCH-L1, glucocérébrosidase)¹⁷¹⁻¹⁷³.

La première grande famille de modèles génétiques est celle des modèles α -synucléine. Si la découverte des mutations A30P et A53T de l' α -synucléine a permis d'envisager des avancées considérables dans le traitement de la pathologie, la création d'un modèle souris génétiquement modifiée mimant de manière adéquate la maladie n'a pas encore abouti à ce jour¹⁷⁴. En effet, les différents modèles α -synucléines — qu'ils soient « knockout », modèles de surexpression, ou transgéniques —, ont permis de mimer les dysfonctionnements mitochondriaux, la gliose, la perte de motoneurones, l'aggrégation de l' α -synucléine et certains troubles moteurs de la maladie de Parkinson. Néanmoins, une dégénérescence dopaminergique n'est soit pas présente, soit pas aussi marquée que dans la véritable maladie¹⁷⁵.

On notera ensuite le modèle transgénique LRRK2. Les souris LRRK2 présentent des dysfonctionnements des voies dopaminergiques et des déficits moteurs qui répondent à la L-dopa. Toutefois, aucune dégénérescence notable de la voie nigrostriée n'a été rapportée¹⁷⁶.

Les modèles « knockout » des gènes parkin¹⁷⁷, PINK1¹⁷⁸ et DJ-1¹⁷⁹ présentent, quant à eux, des dysfonctionnements mitochondriaux semblables à la véritable pathologie, ainsi que des déficiences de la transmission dopaminergique telles que la réduction de la libération de dopamine dans le striatum. Toutefois, la dégénérescence dopaminergique de la voie nigrostriée n'est pas non plus présente dans ces différents modèles.

En somme, les modèles génétiques existant à ce jour peinent à reproduire le marqueur principal de la maladie de Parkinson, à savoir la mort des neurones dopaminergiques dans la substance noire. Nous pouvons émettre plusieurs hypothèses pour expliquer cela. Dans le cas de l' α -synucléine par exemple, l'allèle sauvage du gène codant pour l' α -synucléine chez la souris est, précisément, l'un des allèles humains mutés associés à la forme familiale de la maladie de Parkinson. D'autre part, il est possible que les processus du vieillissement soient des facteurs cruciaux dans le développement de la pathologie à travers ces gènes. Il est également probable que ces gènes, pris isolément, ne soient pas suffisants pour induire un syndrome parkinsonien chez les souris. En ce sens, la modification

simultanée de plusieurs gènes pourrait être nécessaire pour induire une dégénérescence dopaminergique. Sur la base de cette dernière hypothèse, Kitada et al¹⁸⁰ ont créé un modèle triple « knockout » parkin/DJ-1/PINK1. Malheureusement, ce modèle ne présente pas non plus de dégénérescence marquée des neurones dopaminergiques. Des investigations supplémentaires sont donc nécessaires pour obtenir un modèle génétique de dégénérescence dopaminergique.

Au-delà des modèles historiques présentés ci-dessus, certains modèles génétiques jouant sur la transcription génétique ont été développés. En effet, les facteurs de transcription Nurr-1 et Pitx3 sont essentiels au développement du phénotype dopaminergique sain dans les neurones de la substance noire^{181,182}. De plus, une diminution de l'expression des gènes Nurr1 et Pitx3 a été associée à la maladie de Parkinson¹⁸³⁻¹⁸⁶. Sur la base de ces propriétés, des modèles de souris Nurr-1 et Pitx3 ont été développés.

Les souris « Knockout » Nurr-1 présentent une neurodégénérescence dopaminergique marquée, accompagnée de déficits moteurs, ainsi qu'une hypersensibilité au MPTP^{181,187-189}. Les souris Pitx3 présentent également une neurodégénérescence marquée et des déficits moteurs sensibles à la L-dopa^{183,190}. Toutefois, bien que ces deux modèles semblent prometteurs, leurs caractérisations complètes doivent être réalisées.

En résumé, bien que les modèles génétiques de la maladie de Parkinson n'aient pas encore contribué à la découverte de nouveaux traitements, ils restent des modèles prometteurs nécessitant diverses optimisations pour mimer au mieux la pathologie humaine.

III.2.3.4. Modalités de suivi de l'évolution d'un modèle animal de la maladie de Parkinson

III.2.3.4.1. Approche comportementale

Comme nous venons de le voir, la plupart des modèles rongeurs de la maladie de Parkinson présentent des symptômes moteurs importants. Dans ces conditions, il est relativement aisé de les évaluer, par l'étude des capacités locomotrices, en *open field* par exemple. Cependant, il est crucial de choisir les paramètres moteurs que nous souhaitons utiliser, en fonction de l'axe de recherche souhaité. Si certains paramètres moteurs sont très affectés par les syndromes parkinsoniens (distance parcourue, activité locomotrice¹⁹¹, redressements sur les membres postérieurs¹⁹²), d'autres sont moins révélateurs (immobilité, vitesse maximum¹⁴⁶), surtout dans le cas de parkinsonisme peu sévère ou moyen. De par

sa simplicité et sa bonne corrélation avec la lésion histologique, nous avons choisi comme critère moteur principal l'activité locomotrice moyenne, en *open-field*, dans les présents travaux.

D'autres tests comme le rotarod, le hangtest et le pole test permettent d'évaluer l'endurance et la force motrice des animaux¹⁹².

Le modèle hémiparkinsonien rat 6-OHDA fait exception, de par sa capacité à compenser les troubles moteurs de son hémicorps lésé avec son hémicorps sain. Si certains tests moteurs existent, (comme le *stepping test*¹⁹³), le test standard dans ce modèle est la quantification du comportement rotatoire sous apomorphine¹²⁴.

III.2.3.4.2. Approche histologique

Sur le plan histologique, le moyen le plus direct pour quantifier la lésion dopaminergique est l'immunomarquage à la tyrosine hydroxylase. En effet, la tyrosine hydroxylase est impliquée dans le métabolisme de la dopamine¹⁹⁴. Ainsi, en cas de mort des neurones dopaminergiques, le taux de tyrosine hydroxylase dans les régions de la voie dopaminergique est réduit. Inversement, une réduction du nombre de cellules tyrosine hydroxylase positives est un marqueur de la mort neuronale dopaminergique^{146,164,195-201}. Dans les travaux présentés ci-après, nous utilisons cet immuno-marquage pour quantifier la mort neuronale.

III.3. POTENTIEL NEUROPROTECTEUR DE L'ILLUMINATION PROCHE INFRAROUGE : ETAT DE L'ART

Comme nous l'avons décrit précédemment, aucune des stratégies neuroprotectrices étudiées à ce jour n'a abouti à une preuve clinique de son efficacité. Dans ces conditions, il est nécessaire de s'orienter vers de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Historiquement, les dispositifs d'illumination proche infrarouge ont été développés par l'agence spatiale nationale américaine (NASA), pour permettre la croissance des végétaux, lors de voyages spatiaux, et ainsi favoriser l'alimentation des humains dans l'espace²⁰². Par la suite, plusieurs études ont mis en évidence un intérêt de la thérapie lumineuse à faible énergie (low-level light therapy : LLLT)^{146,164,195}, comme stratégie neuroprotectrice. Les longueurs d'ondes efficaces semblent se situer entre 600 et 1070 nm (lumière rouge à proche infrarouge). En dehors de cet intervalle, la LLLT perd de son efficacité et peut devenir délétère ; ainsi, Romeo et al²⁰³ ont montré qu'un traitement à 440 nm réduisait le nombre de cellules positives à la tyrosine hydroxylase dans la substance noire.

L'idée d'appliquer la LLLT proche infrarouge (LLLTpi) vient du caractère *a priori* ubiquitaire de son action neuroprotectrice. En effet, un grand nombre d'études précliniques ont montré l'intérêt thérapeutique de la LLLTpi sur des modèles animaux de maladie rétinienne²⁰⁴⁻²⁰⁶, traumatismes crâniens^{207,208}, Accidents Vasculaires Cérébraux (AVC)^{209,210}, sclérose latérale amyotrophique²¹¹, sclérose en plaques²¹² et maladie d'Alzheimer^{213,214}.

Des études cliniques ont rapporté que la LLLTpi favorisait la récupération post-lésionnelle, après un AVC^{215,216} et un traumatisme crânien²¹⁷.

Il semblerait donc que la LLLTpi ait un effet non seulement neuroprotecteur, mais plus généralement cytoprotecteur et cicatrisant. Etant donné le large spectre d'action de la LLLTpi, il semble donc justifié d'évaluer son potentiel neuroprotecteur dans la maladie de Parkinson.

III.3.1. Etudes *in vitro* historiques

Les premières études *in vitro* montrant le potentiel neuroprotecteur de la LLLTpi ont rapporté une diminution de la mort neuronale, une augmentation du taux d'ATP cellulaire et une diminution du taux de marqueurs du stress oxydatif intra- et extracellulaire. Ces études ont été réalisées sur les neurones striataux et corticaux de rat, après exposition à la roténone ou au MPP⁺^{209,218}. Deux études ont également montré que la LLLTpi soutenait la fonction mitochondriale et diminuait le stress oxydatif sur des cellules humaines de neuroblastomes surexprimant l' α -synucléine et intoxiquées au MPP⁺^{146,197}. Par ailleurs, Trimmer et al²¹⁹ ont montré un ralentissement du mouvement mitochondrial de cellules hybrides, comportant de l'ADN mitochondrial de patients parkinsoniens (déplacement des mitochondries par association avec le cytosquelette, dont les microtubules). Cette étude démontre l'action de la LLLTpi sur le rétablissement des mouvements mitochondriaux dans ces mêmes cellules.

III.3.2. Etudes *in vivo* et axes actuels de recherche

A notre connaissance, la première étude *in vivo* à démontrer le potentiel neuroprotecteur de la LLLTpi dans un modèle de la maladie de Parkinson est Shaw et al, en 2010, sur un modèle souris MPTP aigu. Plusieurs études ont confirmé ces résultats, sur des modèles MPTP aigus^{146,200} ou chroniques¹⁶⁴ de la maladie.

La LLLTpi protège les neurones dopaminergiques de la toxicité du MPTP, mais elle soutient également l'activité motrice des souris. Moro et al¹⁴⁶ confirment le potentiel neuroprotecteur de la LLLTpi sur les neurones dopaminergiques ; et pour la première fois rapportent une récupération presque totale des capacités motrices des souris MPTP, car les neurones dopaminergiques, protégés, sont toujours fonctionnels. Le taux de dopamine reçu par le striatum des animaux est suffisant pour maintenir des performances motrices proches de la normale.

Moro et al¹⁴⁶ décrivent par ailleurs une différence d'efficacité de la LLLTpi suivant la souche de souris utilisée. En effet, la préservation des neurones dopaminergiques de la substance noire est plus importante chez des souris albinos (Balb/c) que chez des souris noires (C57Bl6). Ceci peut s'expliquer par la différence de pigmentation entre les deux souches de souris. En effet, dans cette étude, la LLLTpi est appliquée par voie extracérébrale. La lumière doit donc traverser les poils, la peau et le crâne de l'animal avant d'arriver dans les régions cérébrales impliquées dans la maladie de Parkinson. Les poils et la peau des souris noires étant, de fait, noirs, il est possible que la lumière peine plus à les traverser ou soit plus absorbée. Ainsi, la quantité de lumière reçue par les substances noires des souris C57Bl6 est inférieure à celle reçue par les souris blanches, et donc probablement insuffisante pour exercer son effet neuroprotecteur. Cette hypothèse est soutenue par deux autres études ayant démontré le potentiel neuroprotecteur de la LLLTpi sur ces souris C57Bl6, mais avec des puissances optiques supérieures à Moro et al^{220,221}.

La longueur d'onde optimale pour obtenir une neuroprotection maximum reste à déterminer. Si la gamme 600-1070 nm fait consensus dans la littérature, deux longueurs d'ondes sont plus couramment utilisées (670 et 808/810 nm), dont l'une (670 nm) principalement. A notre connaissance, aucune étude ne fait une véritable comparaison de leurs efficacités neuroprotectrices respectives.

Comme dans toute stratégie de neuroprotection, il semble préférable de débiter le traitement neuroprotecteur lorsqu'un maximum de neurones est encore vivant et actif. Il en va de même pour la LLLTpi. En effet, plusieurs études ont montré que la LLLTpi apportait une meilleure protection des neurones lorsque l'intoxication au MPTP provoquait 30-40 % de mort cellulaire, que lors de 70-80 % de perte¹⁹⁵. Néanmoins, si Moro et al¹⁴⁶ ont montré une préservation des performances motrices chez des souris MPTP, aucune étude ne démontre clairement la présence, ou non, d'un effet symptomatique

à court terme de la LLLTpi, à partir d'un état symptomatique pathologique déterminé. Il s'agit de l'une des problématiques soulevées dans ce travail de thèse.

De façon intéressante, plusieurs études ont montré que les neurones dopaminergiques des régions cérébrales autres que la substance noire (rétine, matière grise périaqueducale, *zona incerta* de l'hypothalamus) ne profitent pas autant du potentiel neuroprotecteur de la LLLTpi que ceux de la substance noire^{164,195,196}. Ainsi, il est possible que la LLLTpi soit plus efficace sur les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson (liés à la neurodégénérescence dopaminergique de la substance noire), que sur les symptômes non moteurs de la maladie (liés à la perte neuronale dopaminergique d'autres régions cérébrales)^{196,222}.

Les mécanismes induits par la LLLTpi sont mal connus à ce jour. Toutefois, de plus en plus d'études tendent à démontrer que plusieurs mécanismes cellulaires et moléculaires sont impliqués. Sur le plan cellulaire, il semblerait que la LLLTpi induise un stress cellulaire de faible intensité, mais suffisant pour initier les cascades de réponses « anti-stress » et favoriser la cytoprotection^{223,224}. L'hypothèse principale est que la LLLTpi soutiendrait la fonction mitochondriale en stimulant les transferts électroniques dans la chaîne respiratoire, à travers l'action d'un photo-accepteur : la cytochrome c oxydase^{221,223,225}. Il s'agit d'une enzyme majeure de la chaîne respiratoire mitochondriale, ayant des propriétés de photo-accepteur dans le domaine du proche infrarouge. La LLLTpi induirait une ou des modification(s) redox sur la cytochrome c oxydase. Ceci aurait pour conséquence dans un premier temps de 1 – augmenter la synthèse d'ATP^{223,224}, 2 – provoquer une production de radicaux libres et de réduire les mécanismes d'apoptose²²⁵. Dans un second temps, cette augmentation du stress oxydatif induirait l'activation des mécanismes cellulaires et moléculaires de protection et de réparation neuronale²²³⁻²²⁵, ce qui, dans notre cas, favoriserait d'une part la résistance du neurone contre l'attaque parkinsonienne, et d'autre part la récupération fonctionnelle des neurones endommagés, mais pas encore morts. Par ailleurs, des travaux récents ont montré que la LLLTpi réduisait la mort neuronale par apoptose, mais n'avait pas d'effet sur la nécrose de ces mêmes neurones²²⁶. Cette étude est un argument en faveur de la présente hypothèse.

D'autre part, plusieurs études suggèrent un effet, non seulement local, mais également systémique de la LLLTpi. Notons, par exemple, l'effet neuroprotecteur sur les neurones dopaminergiques cérébraux de souris MPTP illuminées au niveau du dos¹⁹⁹. Le mécanisme sous-jacent n'est pas connu, mais il est possible que la LLLTpi agisse sur une molécule et/ou un type cellulaire circulant. En contre argument, les souris sont des animaux de petite taille ; on ne peut donc pas négliger le fait que, malgré les précautions prises pour empêcher la lumière de pénétrer au niveau du crâne, suffisamment de photons soient parvenus jusqu'au cerveau, à travers le corps de l'animal, depuis la source lumineuse située dans le bas du dos. Nous pouvons toutefois imaginer que la LLLTpi

module la réponse inflammatoire. Ainsi, la LLLTpi serait associée à une inhibition des cytokines pro-inflammatoires (gamma-interferon, facteur de nécrose tumorale α), ainsi qu'à une activation des cytokines anti-inflammatoires (interleukine-4 et interleukine-10)²¹². Enfin, il a été montré que l'activité du système immunitaire, comme les mastocytes et les macrophages, joue un rôle dans la neuroprotection^{212,223,227}.

Un autre mécanisme possible de la LLLTpi est l'activation des cellules souches ventriculaires, ce qui favoriserait la neurogénèse et la migration neuronale^{216,223,228}. Plusieurs études ont par ailleurs montré que la LLLTpi favorise la prolifération de cellules c-kit-positives dans la moelle osseuse ; dans le cas d'infarctus du myocarde chez le rat, ces cellules ont été spécifiquement recrutées sur le site de l'infarctus où elles ont favorisé la réduction de ce dernier et de la dilatation ventriculaire^{229,230}. Nous pourrions donc imaginer, dans le cas d'un effet systémique de la LLLTpi sur la maladie de Parkinson, un mécanisme impliquant la moelle épinière.

L'étude du mécanisme d'action au niveau physico-chimique et cellulaire de la LLLTpi est un champ de recherche entier à elle toute seule. Il s'agit d'un sujet qui sera très peu abordé dans le présent manuscrit.

Une autre question centrale d'un potentiel traitement proche infrarouge dans la maladie de Parkinson est celle de la dose à appliquer. Spontanément, il semblerait qu'apporter le maximum de lumière possible sans induire d'effets secondaires permettrait d'obtenir un effet thérapeutique maximum. Toutefois, il s'avère que la question n'est pas si aisée à élucider. En effet, une étude sur la LLLTpi délivrée par le biais d'un implant oculaire a montré qu'une illumination continue sur 6 jours n'apportait pas de bénéfice particulier par rapport à une illumination sous forme de sessions de 360 secondes²²⁵. Pourtant, la dose délivrée est nettement plus forte dans le cas de l'illumination continue. Plusieurs études à 810 nm obtiennent des résultats similaires, avec d'autres paradigmes d'illumination, dans le cas de traumatismes crâniens et d'AVC^{208,216,231}. D'autres part, certaines études ont montré la nécessité de répéter les expositions lumineuses pour obtenir l'effet neuroprotecteur recherché^{146,220,223}. Il semblerait donc qu'il existe un seuil d'activation du ou des mécanismes induit(s) par la LLLTpi qu'il faut dépasser pour obtenir un effet neuroprotecteur.

Toutes ces études abordent le problème de la quantité de lumière à appliquer par l'angle de l'énergie lumineuse nécessaire. Or, l'énergie lumineuse, ou optique (E_{op} en joules) est la résultante de deux composantes physiques de la lumière qui sont la durée d'une illumination (Du en secondes) et la puissance optique délivrée (P en milliwatts optiques), selon l'équation :

$$P \times Du = E_{op}$$

Dans le présent travail de thèse, nous aborderons cette question à travers à la fois l'énergie optique globale délivrée, et le rôle propre de la puissance et de la durée sur l'efficacité thérapeutique.

III.3.3. Etudes cliniques

Les études cliniques sur le potentiel thérapeutique de la LLLTpi dans la maladie de Parkinson sont peu nombreuses. La première étude à s'intéresser à ce sujet chez l'humain date de 2003 ; certains résultats de Zhao et al²³² suggèrent une amélioration globale des symptômes chez des patients parkinsoniens ayant bénéficié d'une LLLTpi intranasale. Plus récemment, notons une publication d'un dentiste ayant montré une réduction des tremblements lors d'une illumination proche infrarouge chez un patient parkinsonien, venu consulter pour des problèmes dentaires²³³. Enfin, en 2010, une étude clinique non randomisée a montré une amélioration de la parole, de la cognition, une diminution des périodes de « blocage » après une LLLTpi extracérébrale chez des patients parkinsoniens²³⁴.

III.4. OBJECTIFS DU PRESENT TRAVAIL DE THESE

L'objectif global, qui soutend l'ensemble du projet « Near Infrared » (NIR), dans lequel s'inscrit mon travail de thèse, est d'apporter une solution neuroprotectrice aux patients parkinsoniens, grâce à l'illumination proche infrarouge. Il s'agit d'un projet multidisciplinaire, organisé autour de trois axes principaux :

- 1- Apporter des preuves de concept du potentiel neuroprotecteur de la LLLTpi lors d'études précliniques.
- 2- Optimiser les paramètres d'illumination.
- 3- Concevoir le dispositif médical, implanté, chronique, d'illumination proche infrarouge intracérébrale, chez l'humain.

Ces trois axes ont pour but de préfigurer un essai clinique dont l'objectif est de démontrer le potentiel neuroprotecteur d'une illumination proche infrarouge dans la maladie de Parkinson.

Au sein de ce projet général, mes travaux de thèse se sont organisés autour des deux premiers axes, avec trois objectifs principaux :

- 1- Développer et valider le modèle d'illumination intracérébrale et valider les modèles animaux utilisés dans le travail de thèse.
- 2- Confirmer le potentiel neuroprotecteur d'une illumination proche infrarouge sur plusieurs modèles rongeurs de la maladie de Parkinson.
- 3- Déterminer les paramètres d'illumination qui influencent l'efficacité thérapeutique, puis étudier ces paramètres afin d'obtenir un effet neuroprotecteur optimal.

L'ensemble de ces travaux a été réalisé sur des rongeurs (souris, rats).

**MATERIELS ET
METHODES**

IV. MATERIELS ET METHODES

IV.1. ANIMAUX ET CONSIDERATIONS ETHIQUES

Toutes les procédures réalisées sur animaux ont conjointement fait l'objet d'un accord préalable par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et par le Comité d'Ethique en expérimentation animale de Grenoble qui les a validées (comité enregistré auprès du Comité National de la Réflexion Ethique sur l'Expérimentation Animale sous le numéro 12).

Toutes les procédures impliquant des rats rentrent dans le cadre du protocole n° 00562. Toutes les procédures impliquant des souris rentrent dans le cadre du protocole n° 240.

Tous les animaux proviennent du fournisseur Charles River France. À leur arrivée au laboratoire, ils ont bénéficié d'une acclimatation de 15 jours avant d'entrer dans les protocoles expérimentaux. Pendant toute la durée totale de leur séjour au laboratoire, les animaux ont été hébergés sous un cycle 12/12h (jour/nuit). Ils avaient un accès *ad libitum* à l'eau et à l'alimentation.

IV.2. PROCEDURES CHIRURGICALES ET SUIVI POST-OPERATOIRE

IV.2.1. Chirurgie stéréotaxique

Les animaux sont anesthésiés avec de l'isoflurane à 4 % dans un mélange d'oxygène 25 % et air (induction), puis avec isoflurane 1,5 % (entretien). Après tonte de la tête, l'animal est placé sur le cadre stéréotaxique (Kopf). La zone d'incision est désinfectée. Avant l'incision, une injection de Buprénorphine 0,01 mg/kg est réalisée par voie sous-cutanée pour l'analgésie générale, suivi d'une injection de xylocaïne 2 %-adréalinée dans la région de l'incision, pour favoriser l'hémostase et réaliser une anesthésie locale.

Afin de favoriser la survie peropératoire ainsi que la récupération et le bien-être post-opératoire des animaux, un tapis chauffant avec contrôle rectal de la température est utilisé. De plus, les yeux des animaux sont couverts d'une compresse imbibée de NaCl, de sorte à éviter les cas de sécheresse oculaire.

Après incision, nettoyage du crâne et dégagement du Bregma, une craniotomie est réalisée à l'aide d'une micro-fraise chirurgicale. Les coordonnées correspondant aux différents protocoles seront rappelées dans les chapitres concernés.

Par la suite, une aiguille de micro-injection et/ou une fibre optique (selon protocole) est descendue dans la région cérébrale d'intérêt à l'aide d'un micro-manipulateur.

Dans le cas où la fibre optique est laissée sur site pour une implantation chronique, des vis chirurgicales en titane sont placées en croix sur les volets frontaux, pariétaux (gauche et droit) et occipitaux du crâne. La fibre optique et les vis sont ensuite coulées dans un ciment dentaire afin d'assurer le maintien de la fibre optique en place.

Une fois le ciment solidifié, l'animal est emmené, selon l'étude, soit en salle de réveil sous lampe chauffante, soit en salle d'IRM pour les analyses de thermométrie IRM.

IV.2.2. Suivi post-opératoire

Pendant les 48 heures suivant la chirurgie, les animaux sont traités à la Buprénorphine 0,01 mg/kg (analgésie) matin et soir. Afin de déterminer le niveau de douleur induit par la chirurgie, et l'implantation, l'échelle RGS (Rat Grimace Scale) est utilisée (voir annexe). L'échelle RGS²³⁵ permet

de déterminer le niveau de douleur d'un rat à partir de ses expressions faciales et de décider s'il doit bénéficier d'un traitement analgésique supplémentaire et/ou peut participer à une étude comportementale. L'échelle RGS est graduée de 0 à 8 ; 0 signifiant une absence totale de douleur et 8 une douleur maximale.

IV.3. INDUCTION DU MODELE PARKINSONNIEN

IV.3.1. Modèle souris MPTP

Le 1-méthyl 4-phényl 1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) est une neurotoxine spécifique des neurones dopaminergiques. De par sa liposolubilité, le MPTP peut traverser la barrière hémato-encéphalique. Directement injecté par voie intrapéritonéale, il induit une dégénérescence dopaminergique dans la substance noire des souris, de façon bilatérale.

Dans l'ensemble des protocoles décrits ici, des souris balb/c mâles de 8 semaines, lésées au MPTP reçoivent deux injections de MPTP à 24 heures d'intervalle, à raison de 25 mg/kg par injection (soit une dose globale de 50 mg/kg). Ce protocole de lésion au MPTP est bien connu, standardisé, et bien référencé dans la littérature^{146,195,199,200}.

Pour chaque groupe de souris MPTP, un groupe de souris injectées au NaCl (contrôle) est présent.

IV.3.2. Modèle unilatéral rat 6-OHDA

Contrairement à la souris, le rat est peu sensible à la toxicité du MPTP. L'utilisation d'une autre neurotoxine est alors nécessaire. Le modèle rat 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) est un des modèles les mieux connus et les plus utilisés pour induire un syndrome parkinsonien chez le rat²³⁶.

La procédure chirurgicale d'injection de la 6-OHDA est rappelée section 0. Brièvement, une seringue Hamilton (701 ASNR) avec 4 µL de solution contenant 20 µg de 6-OHDA et de l'acide ascorbique à 0,2 mg/mL dissouts dans du NaCl stérile, est mise en place à l'aide d'un micromanipulateur aux coordonnées A/P = +1 ; M/L = +3 ; D/V -6,3, en mm, par rapport au Bregma. La seringue est ensuite laissée en position pendant 5 minutes. À l'aide d'un pousse-seringue, les 4 µL de solution sont injectés à 0,5 µL/min dans le striatum des rats. Un temps de repos de 8 minutes est ensuite respecté avant la remontée de l'aiguille.

IV.4. PROTOCOLES D'ILLUMINATIONS

IV.4.1. Distance de pénétration de la lumière proche infrarouge dans les tissus cérébraux

Deux rats sont implantés *in vivo* avec 6 fibres optiques en intracérébrale. Les coordonnées d'implantation sont reprises dans le Tableau IV-1. La Figure IV-1 est une représentation schématique des implantations. La fibre optique 1 est la source émettrice de lumière à 670 nm ; elle est implantée puis laissée en position sur l'ensemble du protocole expérimental. Les fibres optiques 2 à 6 sont les fibres optiques réceptrices de la lumière émise par la fibre 1. Elles sont implantées l'une après l'autre, avec mesure de la lumière reçue par chacune d'elle à différentes profondeurs d'implantation (Tableau IV-1).

Pour le protocole chirurgical, se référer à la partie IV.2.1. Les animaux sont euthanasiés par décapitation avant leur réveil.

| mm par rapport au Bregma | Antéro-postérieur | Médio-latéral | Dorso-ventral |
|--------------------------|-------------------|---------------|---------------|
| Fibre 1 (émettrice) | - 2,7 | - 4 | - 6 |
| Fibre 2 | - 5,2 | - 4 | - 2 à - 8 |
| Fibre 3 | - 7,7 | - 4 | - 2 à - 8 |
| Fibre 4 | - 7,7 | + 4 | - 2 à - 8 |
| Fibre 5 | - 5,2 | + 4 | - 2 à - 8 |
| Fibre 6 | - 2,7 | + 4 | - 2 à - 8 |

Tableau IV-1 : Coordonnées d'implantation des fibres optiques pour la mesure de la pénétration de la lumière proche infrarouge.

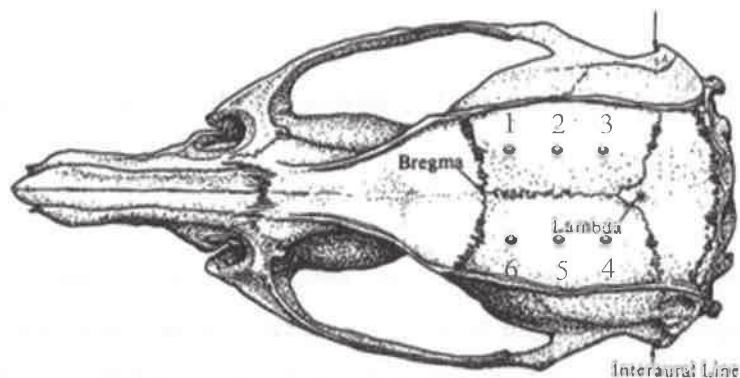


Figure IV-1 : Représentation schématique d'un crâne de rat, vue du dessus. Les points rouges correspondent aux zones d'insertions des fibres optiques dans la boîte crânienne.

IV.4.2. Illumination extra-cérébrale

IV.4.2.1. Principe général

Une illumination extra-cérébrale a été pratiquée dans les campagnes expérimentales impliquant des souris. Lors de ces campagnes, les souris sont placées sous une lampe type WARP²⁰² à 670 et/ou à 810 nm. Chaque souris bénéficie d'une illumination ou d'une fausse illumination (sham). Les animaux recevant une illumination sham sont placés dans les mêmes conditions, mais sous lampe éteinte.

La fenêtre temporelle de traitement, la durée et la puissance lumineuse d'une seule illumination seront précisées dans les sections suivantes.

IV.4.2.2. Protocole d'illumination n°1

Il s'agit dans ce protocole de se placer dans un contexte idéal pour obtenir un effet neuroprotecteur grâce à l'illumination proche infrarouge. Les illuminations sont donc réalisées juste après l'injection de MPTP (voir section IV.3.1). Elles ont une durée de 90 secondes, pour une puissance optique de 30 mW en sortie de WARP. Selon l'équation « Puissance x Durée = Energie », ceci correspond à une quantité d'énergie optique pour chaque illumination de 2,7 Joules en sortie de WARP.

Le détail du protocole est repris dans la Figure IV-2, à savoir : une illumination à 670 et/ou 810 nm juste après la première injection de MPTP (voir section IV.3.1), puis une nouvelle illumination 6 heures plus tard. Pour le second jour, le protocole d'injection de MPTP est identique. Les points T correspondent aux points d'étude comportementale, qui ont lieu 20 minutes après les illuminations (voir section IV.5.1).

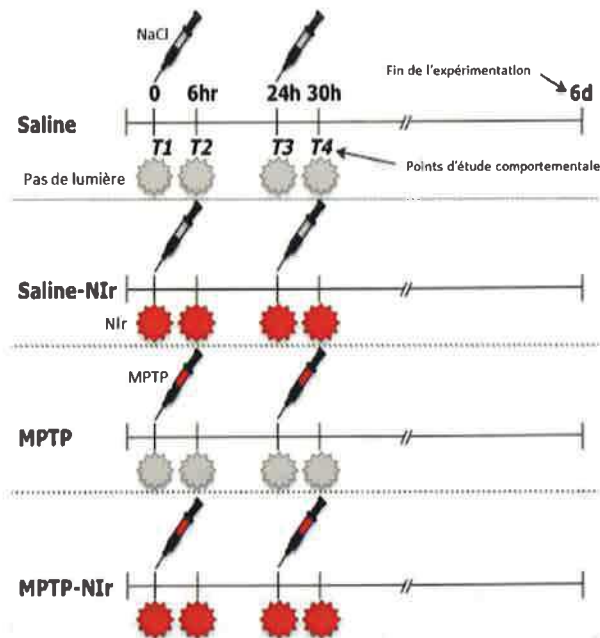


Figure IV-2 : Protocole d'illumination n°1 ; utilisé pour les campagnes expérimentales « preuve de concept illumination proche infrarouge modèle MPTP » et « influence de la longueur d'onde sur l'effet neuroprotecteur de la lumière proche infrarouge ».

Dans le détail, chaque groupe d'animaux Saline et MPTP est divisé en sous-groupes, respectivement Saline et Saline-NIr, et MPTP et MPTP-NIr. Ce protocole est utilisé pour les problématiques suivantes :

- Preuve de concept d'une illumination proche infrarouge sur le modèle MPTP, avec une illumination à 670 nm, ou à 810 nm. 12 Souris par groupe (96 souris au total)
- Influence de la longueur d'onde sur l'efficacité thérapeutique, avec une illumination à 670 nm, 810 nm, ou 670 + 810 nm. 12 souris par groupe (84 souris au total).

IV.4.2.3. Protocole d'illumination n°2

L'objectif de ce protocole est d'étudier l'effet de la quantité de lumière sur l'efficacité thérapeutique, sur le modèle souris MPTP. Ceci, à travers deux paramètres :

- 1- L'application croisée de la puissance et de la durée d'illumination d'un seul flash lumineux.
- 2- La quantité d'énergie globale de ce flash.

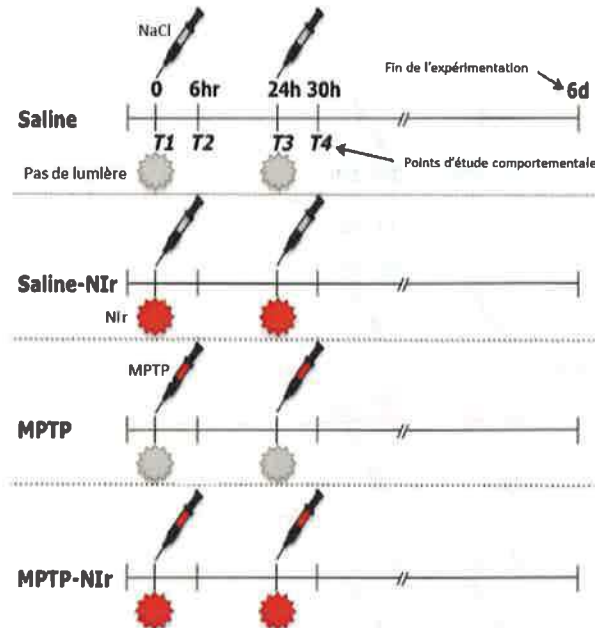


Figure IV-3 : Protocole d'illumination n°2 ; utilisé pour les campagnes expérimentales « influence de la quantité de lumière sur l'efficacité thérapeutique ».

La Figure IV-3 reprend ce protocole. En détails : les souris bénéficient d'une seule illumination par jour, juste après l'injection de MPTP. Cette illumination dure de 9 à 900 secondes, pour une puissance optique en sortie de WARP de 3 à 90 mW. L'énergie optique résultante se calcule selon l'équation suivante :

$$P \times Du = E$$

Avec la puissance P (Watts), la durée Du (secondes) et l'énergie E (Joules).

L'ensemble des puissances et durée utilisées, et des énergies délivrées résultantes, est rappelé Tableau IV-2. Chaque case du tableau correspond à un groupe de 6 souris (soit 120 souris au total).

| Dose (mJ) | Secondes | | | | |
|-----------|----------|------|------|-------|-------|
| | 9 | 45 | 90 | 180 | 900 |
| 3 | 0,027 | 135 | 270 | 540 | 2700 |
| 15 | 135 | 675 | 1350 | 2700 | 13500 |
| 30 | 270 | 1350 | 2700 | 5400 | 27000 |
| 90 | 810 | 4050 | 8100 | 16200 | 81000 |

Tableau IV-2 : Puissances optiques (mW) et durées d'illumination (s) appliquées dans les différents groupes de souris. La dose énergétique calculée est rappelée dans le présent tableau, avec un gradient de rouge. Plus le rouge est foncé, plus l'énergie appliquée est importante. Les puissances et durées encadrées en jaune correspondent aux puissances et durées « références », à savoir les valeurs utilisées dans le protocole n°1.

IV.4.2.4. Protocole d'illumination n°3

L'objectif de ce protocole est d'étudier l'influence de la fenêtre temporelle de traitement sur l'efficacité thérapeutique. Ceci, à travers deux questions :

- 1- Un prétraitement et un post-traitement présentent-ils un intérêt thérapeutique ? Comme pour le protocole n°1, les illuminations ont une durée de 90 secondes, pour une puissance optique de 30 mW en sortie de WARP. Les illuminations ont également lieu deux fois par jours, à 6 heures d'intervalles. Toutefois, ici, suivant les groupes, les souris sont illuminées soit les jours avant les injections de MPTP (prétraitement), soit les jours des injections (Simultané), soit les jours après les injections MPTP (post-traitement). Voir Figure IV-4.
- 2- Le fait d'augmenter le nombre de jours de traitement, et donc la quantité globale d'énergie reçue influence-t-il le potentiel thérapeutique ? Nous avons recensé trois groupes d'intérêt pour répondre à cette problématique (voir Figure IV-4) :
 - a. Prétraitement + traitement simultané.
 - b. Traitement simultané + post-traitement.
 - c. Prétraitement + traitement simultané + post-traitement.

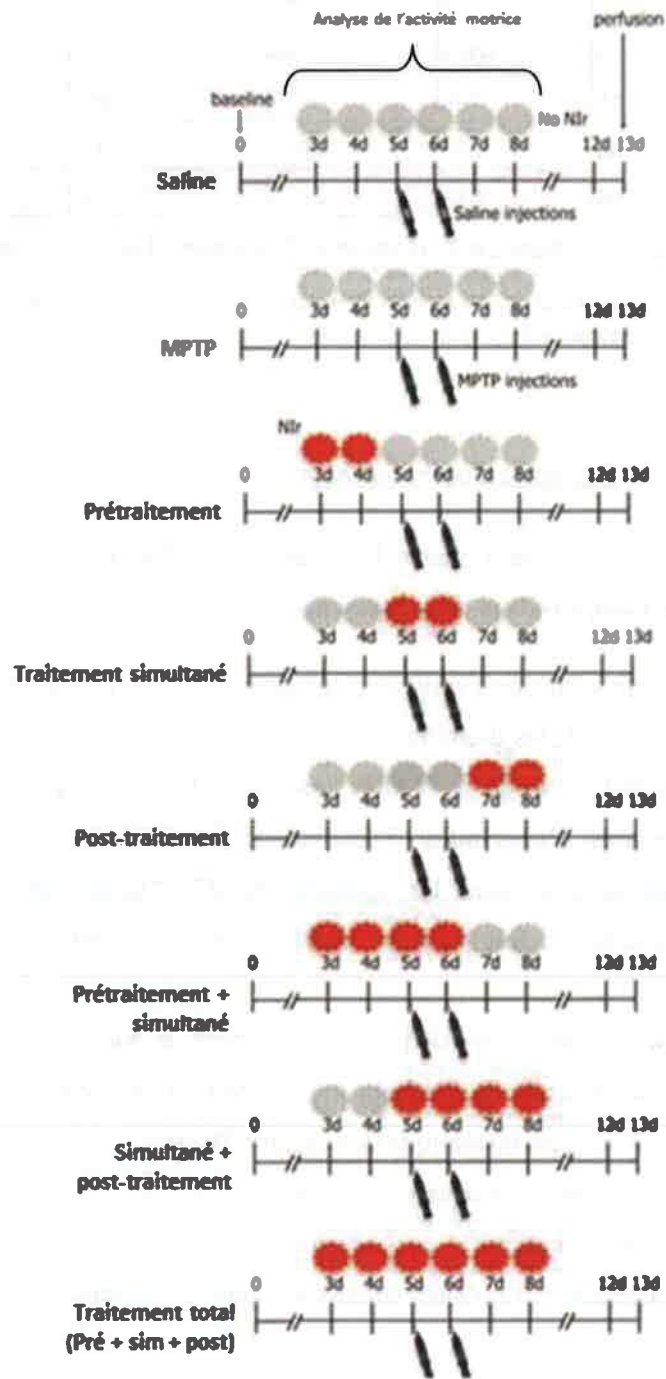


Figure IV-4 : Protocole d'illumination n°3 ; utilisé pour la campagne expérimentale « Influence de la fenêtre temporelle de traitement sur l'efficacité thérapeutique de la lumière proche infrarouge ».

IV.4.3. Illumination intracérébrale

L'implantation intracérébrale chez le rat a pour objectif de mimer le mode d'application de la lumière proche infrarouge envisagé chez l'Homme. Les développements et protocoles décrits dans cette section ont plusieurs buts distincts :

- 1- Créer et améliorer un dispositif implanté en chronique chez le rat capable de fournir des puissances optiques et des durées d'illumination modulables. Le tout en laissant l'animal parfaitement libre de ses mouvements lors des études comportementales.
- 2- Déterminer la faisabilité d'une implantation chronique d'un dispositif optique chez le rat.
- 3- Apporter, s'il y a lieu, la preuve de concept du potentiel neuroprotecteur d'une illumination proche infrarouge intracérébrale dans le modèle rat 6-OHDA de la maladie de Parkinson.

IV.4.3.1. Développement du dispositif implanté chronique

Lors d'une illumination sur 3 semaines à forte puissance optique, il n'est malheureusement pas possible d'utiliser un implant avec batterie intégrée (les batteries et piles actuelles ne permettent pas de répondre aux exigences du protocole — 160 μ W pendant 3 semaines —, sans être soit trop volumineuses, soit trop lourdes pour un rat). Le choix d'une alimentation déportée, avec une connectique traversant au niveau de la peau de l'animal a donc été conservé.

Afin d'améliorer l'implant existant, le cahier des charges suivant est établi :

- 1- Prévoir une connectique pour l'alimentation électrique de l'implant au niveau de la tête, et non plus dans le dos. Cette connectique doit être fixable dans du ciment chirurgical afin d'en permettre une manipulation aisée par l'expérimentateur et éviter l'infection pour l'animal. De plus, elle doit présenter une sécurité empêchant le rat de se détacher lui-même.
- 2- L'alimentation électrique doit pouvoir alimenter l'implant de plusieurs rats à la fois, chacun dans une cage personnelle (duplication du protocole).
- 3- Créer un portique permettant l'apport de cette alimentation électrique (fils électriques) jusqu'à l'implant fixé sur la tête du rat, sans que ce dernier ne puisse la détruire (grignotages). L'animal doit également garder toute sa liberté de mouvement, même attaché à un fil électrique pendant une durée de 3 semaines. Le rat ne doit pas pouvoir s'emmêler, ni atteindre les fils d'alimentation.

- 4- Le fait de travailler avec des rats pose des problèmes de solidité des matériels utilisés. En effet, sa force oblige à travailler avec des matériaux résistants à une éventuelle morsure.

IV.4.3.2. Tolérance de l'implantation par les rats

Afin de déterminer la tolérance de l'implant par les rats, l'échelle Rat Grimace Scale (RGS)²³⁵ a été utilisée. Son principe est basé sur l'observation des postures et des mouvements faciaux afin de déterminer le niveau de douleur ressenti par l'animal. Le score obtenu va de 0 (aucune douleur) à 8 (douleur maximale).

IV.4.3.3. Protocole d'illumination

L'objectif de ce protocole est d'apporter la preuve de principe de l'intérêt d'une illumination proche infrarouge intracérébrale dans la maladie de Parkinson. Également, il s'agit ici de comparer une illumination continue vs discontinue, en faisant varier la puissance optique délivrée (et donc la quantité globale d'énergie reçue).

Les différents groupes expérimentaux retenus sont :

- 1- Saline : animaux contrôles, non intoxiqués à la 6-OHDA, implantés, mais pas illuminés (n = 8).
- 2- 6-ODHDA, Pas d'illumination : animaux implantés, mais non illuminés (n = 15).
- 3- 6-OHDA-NIr, Animaux illuminés (n = 38), répartis en 3 sous-groupes :
 - a. NIrP : 160 μ W de puissance lumineuse en sortie de fibre, pendant 90 secondes, deux fois par jour pendant 3 semaines. Ce groupe reprend l'illumination référence de Moro et al, 2014²⁰⁰. Ceci correspond à une énergie globale délivrée sur les 23 jours du protocole de 634 mJ. n = 16.
 - b. NIrC⁺ : Illumination continue pendant 3 semaines à 160 μ W également. Cependant, dans la mesure où l'illumination a été continue, l'énergie globale délivrée a été de 304 J. n = 13.
 - c. NIrC : Illumination continue pendant 3 semaines à 333nW. La puissance optique de ce groupe a été diminuée par rapport aux deux autres. Ceci correspond à une quantité d'énergie globale délivrée de 634 mJ, soit identique au groupe NIrP. n = 9.

Un groupe Saline + NIR n'a pas été ajouté, car les précédents travaux de l'équipe ont montré qu'une illumination proche infrarouge n'avait pas d'impact sur la survie et le fonctionnement des cellules dopaminergiques d'un cerveau sain^{146,164,195,198-200}.

L'ensemble du protocole est repris Figure IV-5.

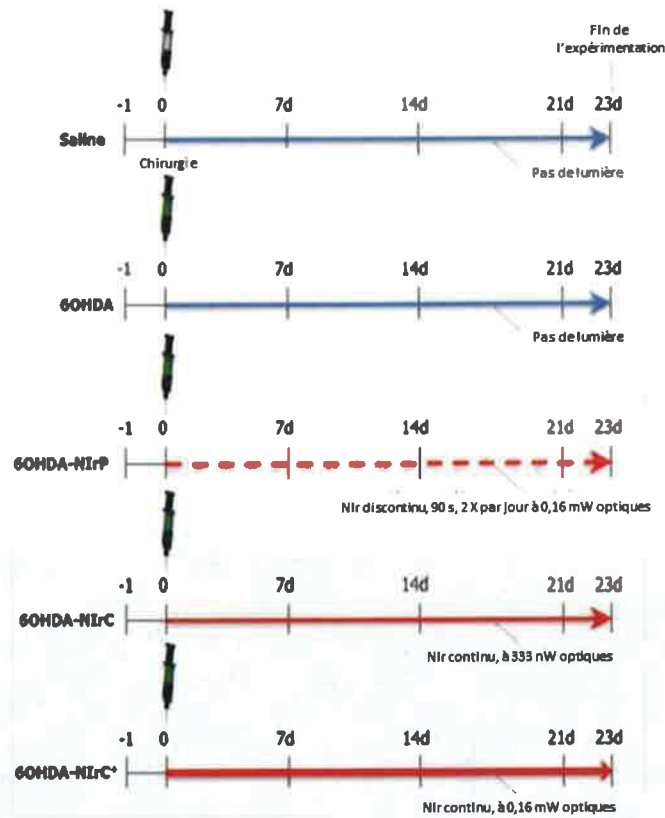


Figure IV-5: protocole d'illumination proche infrarouge intracérébrale, chez le rat 6-OHDA.

IV.5. ETUDES COMPORTEMENTALES

IV.5.1. **Activité locomotrice : modèle MPTP**

L'évaluation des performances motrices permet de déterminer l'ampleur de la lésion induite par le MPTP sur les animaux, sur la base du phénotype moteur induit par la toxine. Les souris sont filmées dans une arène carrée de 25 cm de côté pendant 10 minutes à l'aide d'une caméra HD (Ace 8/12 bits, Basler). L'analyse de l'activité motrice est ensuite réalisée avec le logiciel Ethovision XT 10 (Noldus). Celui-ci permet par analyse vidéo de mesurer la quantité de pixels modifiés entre chaque image (8 images par seconde). Dans la mesure où seul l'animal bouge dans l'arène, la quantité de pixels modifiés est directement corrélée à l'activité motrice. À son tour, l'activité motrice est le témoin des capacités motrices de l'animal.

Une illustration de l'open-field est donnée Figure IV-6.

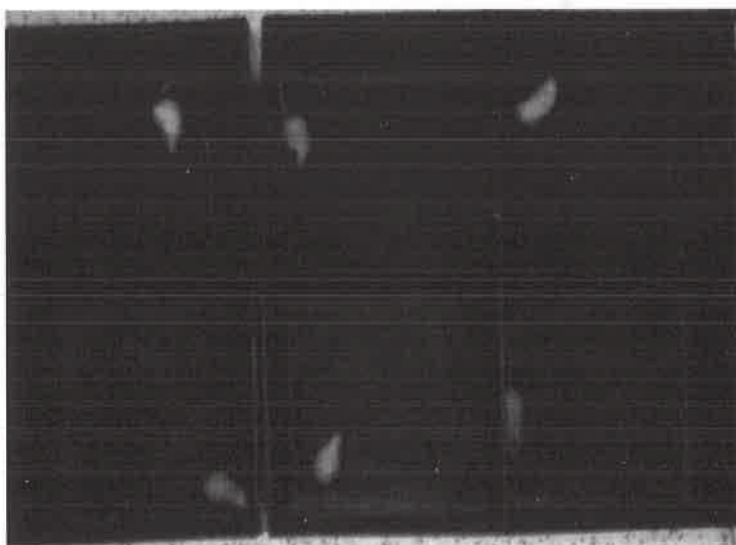


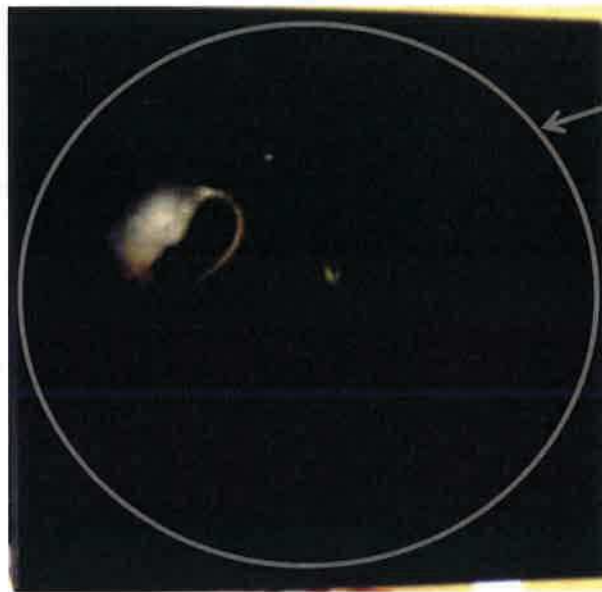
Figure IV-6 : Exemple de 6 souris placées dans des open-fields afin d'évaluer leur activité motrice.

IV.5.2. **Comportement rotatoire : modèle 6-OHDA**

Le comportement rotatoire dû à la lésion 6-OHDA est mesuré dans une arène circulaire de 50 cm de diamètre. Pour induire les rotations des rats, 0,5 mg/kg d'apomorphine sont injectés en sous-cutanée, puis les rats sont replacés dans leur cage d'hébergement. Après 15 minutes d'attente, les rats sont placés dans l'arène où ils sont filmés pendant 10 minutes. Les vidéos sont enregistrées et

retransmises en temps réel sur l'ordinateur de l'expérimentateur. Le nombre de tours dans les sens horaire et antihoraire est compté manuellement à partir de la vidéo.

Ces enregistrements sont réalisés la veille de l'implantation, puis une fois par semaine, à partir de la semaine suivant l'injection de 6-OHDA et de l'implantation par stéréotaxie, jusqu'au sacrifice 3 semaines plus tard. Les protocoles d'injection de la 6-OHDA et de l'implantation stéréotaxique sont décrits respectivement sections IV.3.2 et IV.2.1. Une illustration de l'arène circulaire est donnée Figure IV-7.



Limites de
l'arène
circulaire

Figure IV-7 : Exemple d'un rat 6-OHDA sous apomorphine placé dans une arène circulaire afin d'évaluer son comportement rotatoire. On reconnaît la position caractéristique du rat 6-OHDA en train de tourner sur lui-même (ensemble du corps incurvé + queue ramenée vers le centre de rotation de l'animal).

Le principe est le suivant : la 6-OHDA induit une lésion unilatérale de la SNc par intoxication retrograde striato-nigree à partir de l'injection dans le striatum. L'injection d'apomorphine (agoniste dopaminergique D1-D2) induit une activation préférentielle du striatum lésé du fait de l'hypersensibilité de dénervation. Ceci provoque la rotation sur lui-même du rat.

IV.6. THERMOMETRIE IRM

Les acquisitions IRM sont réalisées sur un scanner préclinique à 4.7 T (Avance III console, Bruker, Wissembourg, France) utilisant une antenne de volume en quadrature dédiée au rongeur (diam. utile 40 mm). L'anesthésie des animaux est induite avec un air à 5 % d'isoflurane et maintenue à 2 % en entretien. La température corporelle des animaux est régulée à 37/38 °C avec un dispositif de régulation thermique par flux hydrique.

Une fois le shim effectué (ajustement de l'homogénéité du champ magnétique statique), les séquences suivantes sont réalisées :

Séquence anatomique : une séquence haute résolution pondérée T2 (spin echo, RARE) est réalisée afin de repérer précisément la position de la fibre optique. Les paramètres d'acquisitions sont : 9 coupes, champ de vue = 35x35 mm, épaisseur de coupe = 0.7 mm, TE effectif = 35 ms, TR = 2200 ms, RARE factor = 8.

Thermométrie : L'imagerie de température est ensuite réalisée à l'aide d'une séquence d'écho de gradient (EPI segmenté) sensible à l'effet PRFS (proton resonance frequency shift). Deux coupes perpendiculaires sont acquises répétitivement pendant 15 à 50 minutes, l'une contenant la fibre, l'autre perpendiculaire à celle-ci, passant par la pointe de la fibre. Les images de phase sont traitées à l'aide du logiciel Matlab : les 10 premières acquisitions, réalisées sans chauffe, sont utilisées comme référence de phase (équilibre thermique) et soustraites aux acquisitions suivantes. Le résultat de la soustraction est enfin pondéré en tenant compte de la valeur de B0 pour remonter à l'information de température et est superposé à l'image de magnitude. Les paramètres principaux sont : 2 coupes entrelacées, voxel = 0.3x0.3x1.0 mm (matrice d'acquisition = 96x96), TE = 8 ms, TR = 250 ms, flip angle = 28°, 30 acquisitions moyennées.

Après les acquisitions IRM, les animaux sont sacrifiés par décapitation.

IV.7. EUTHANASIE ET PRELEVEMENTS

Pour réaliser les analyses histologiques nécessaires aux différentes études, les animaux sont anesthésiés au pentobarbital sodique (injection intrapéritonéale), puis sacrifiés par perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde (PFA : Antigenfix 4 %, DiaPath). Après dissection, les cerveaux sont post-fixés dans une solution de PFA à 4 % pendant 24 heures, puis rincés au tampon phosphate saline (PBS) avant d'être conservés à 4 °C dans une solution de sucrose à 30 % pendant 48 heures.

IV.8. HISTOLOGIE

IV.8.1. Coupes frontales de cerveaux

Les cerveaux sont inclus dans un milieu de congélation (OCT, Tissue-Tek), congelés puis coupés à une épaisseur de 30 μm , à l'aide d'un cryostat (Leica CM 3050). Les coupes sont recueillies en flottant dans du PBS 1X, ou directement sur lame de microscope (superfrost +), puis immédiatement immunomarquées.

IV.8.2. Immunomarquage de la tyrosine hydroxylase

Sauf indication contraire, l'ensemble du protocole est réalisé sous agitation douce et à température ambiante.

Juste après prélèvement des coupes dans du PBS 1X, celles-ci sont incubées 10 minutes dans de la formaline 10 %, puis rincées dans du PBS 1X pendant 5 minutes. Elles sont ensuite perméabilisées dans un bain de PBS-tritonX100 à 0,1% pendant 1 heure. Une étape de saturation des coupes au PBS/BSA 3 % de 20 minutes a ensuite lieu. Enfin, les coupes sont incubées avec un anticorps monoclonal anti TH (Millipore) dilué au 1/500 dans du PBS/BSA 0,3 % pendant 48 heures, à 4 °C.

Après incubation de l'anticorps primaire, deux lavages de 5 minutes au PBS/BSA 0,3 %/Tween 0,01 % sont réalisés, suivis d'une étape de saturation de 20 minutes dans du PBS/BSA 3 %. L'incubation de l'anticorps secondaire *Goat anti-mouse IgG1* (Invitrogen) dilué au 1/500 dans du PBS/BSA 0,3 %, couplé à du DAPI 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a lieu pendant 1 heure, à l'abri de la lumière.

Après deux lavages au PBS/BSA 0,3 %/Tween 0,01 % de 10 minutes, les coupes sont baignées dans du PBS 1X jusqu'au montage sur lames de microscopes superfrost +, et inclusion dans du milieu de montage fluorsave (VWR).

IV.8.3. Immunomarquage de iba1

Sauf indication contraire, l'ensemble du protocole est réalisé sous agitation douce et à température ambiante.

Marquage réalisé directement sur lames de verres cerclées de Dako-pen. Les lames sont incubées 15 minutes dans de la formaline 10 %, puis rincées dans du PBS 1X pendant 5 minutes. Elles sont ensuite perméabilisées dans un bain de PBS-tritonX100 à 0,1% pendant 45 minutes. Une étape de saturation des coupes au PBS/BSA 3 % de 30 minutes a ensuite lieu. Enfin, les coupes sont incubées avec un anticorps polyclonal anti Iba1 (Wako) dilué au 1/1000 dans du PBS/BSA 0,3 % pendant la nuit, à 4 °C.

Après incubation de l'anticorps primaire, deux lavages de 5 minutes au PBS/BSA 0,3 %/Tween 0,01 % sont réalisés, suivis d'une étape de saturation de 5 minutes dans du PBS/BSA 3 %. L'incubation de l'anticorps secondaire *Goat anti-rabbit IgG1* (invitrogen) dilué au 1/1000 dans du PBS/BSA 0,3 %, couplé à du DAPI 1,5 µg/mL a lieu pendant 1 heure, à l'abri de la lumière.

Après deux lavages au PBS/BSA 0,3 %/Tween 0,01 % de 10 minutes, les coupes sont enfin incluses dans du milieu de montage fluorsave (VWR).

IV.9. BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

IV.9.1. **Activité de l'enzyme MAO-B**

Dans l'objectif d'étudier l'activité de la monoamine oxydase B (MAO-B) sous une illumination à 670 nm, nous avons utilisé le kit d'analyse MAO-Glo™ Assay (Promega™). Après avoir étudié l'absorbance des différents composants du kit et de la MAO-B (Sigma-Aldrich, France), à l'aide d'un lecteur de plaques, nous avons réalisé l'étude de l'activité de l'enzyme MAO-B en présence de proche infrarouge à 670 nm comme suit :

Précisément, dans des plaques 96-puits à bords opaques, 25 µL de MAO-substrat à 40 µM sont insérés par puits. 12,5 µL de Tampon de réaction sont ajoutés, puis 25 µL d'enzyme MAO-B à 20 µg/mL. Dans les puits contrôle (sans enzyme), on remplace l'enzyme par 25 µL de tampon de réaction. Un contrôle négatif est également ajouté, à savoir ajout de sélégiline (déprényl, Orion), qui est un inhibiteur de l'enzyme MAO-B.

Les plaques sont ensuite incubées à 37 °C pendant 1 heure, soit dans l'obscurité, soit sous une illumination à 670 ou 810 nm d'une puissance optique de 160 µW.

Après incubation, 50 µL d'agent de détection de la luciférine (luciférase) sont ajoutés pendant 20 min. Le signal lumineux obtenu est stable dans le temps (2 h) et est lu à l'aide d'un lecteur de plaques.

Les différentes conditions retenues pour cette étude sont :

- 1- Contrôle négatif 1 (pas de substrat)
- 2- Contrôle négatif 2 (présence de sélégiline : inhibiteur)
- 3- Contrôle positif (réaction complète dans l'obscurité)
- 4- Condition d'intérêt (réaction complète sous 670 ou 810 nm à 160 µW)

IV.10. ANALYSES STATISTIQUES

Pour la comparaison entre les groupes lors de l'analyse histologique, un *one way ANOVA* est réalisé, couplé à un test de comparaison multiple de Tukey-Kramer. Pour l'analyse comportementale, les groupes sont comparés en fonction du temps (différents points de comportement), du traitement parkinsonien (MPTP/6-OHDA ou non) et de l'illumination (présence de proche infrarouge ou non), à l'aide d'un *three way ANOVA* avec un test Bonferroni (logiciel Prism GraphPad).

RESULTATS

V. RESULTATS

Avant d'entamer cette section, il semble important de rappeler que ce travail de thèse s'est déroulé au sein d'un projet multicentrique (CEA/Clinatoc, Grenoble ; Unité d'anatomie, Université de Sydney). Les objectifs principaux de ce projet sont :

- 1- Apporter des preuves de concept du potentiel neuroprotecteur de la LLLTpi lors d'études précliniques.
- 2- Optimiser les paramètres d'illumination.
- 3- Concevoir le dispositif médical, implanté, chronique, d'illumination proche infrarouge intracérébrale, chez l'humain

C'est avec ces objectifs à l'esprit que mes travaux de thèse ont été réalisés, et que ce manuscrit est rédigé.

V.1. THEME 1 : VALIDATION DES MODELES ANIMAUX ET D'ILLUMINATION UTILISES DANS LE TRAVAIL DE THESE

V.1.1. Validation des modèles animaux utilisés

Dans ce travail de thèse, nous cherchons à induire une protection neuronale par illumination proche infrarouge. Cette protection neuronale doit avoir une incidence fonctionnelle, à savoir sur l'activité motrice des animaux. Il est donc nécessaire que les modèles animaux que nous utilisons présentent une dégénérescence dopaminergique dans la substance noire, corrélée avec une dégradation motrice prononcée.

V.1.1.1. Modèle souris MPTP

Nous utilisons sur l'ensemble de ce travail de thèse le modèle MPTP souris à 2 injections de 25 mg/kg, à 24 heures d'intervalle. Nous montrons ici qu'un tel protocole induit une forte réduction de l'activité locomotrice des animaux injectés (Figure V-1), ainsi que du nombre de cellules dopaminergiques TH⁺ dans la substance noire (Figure V-2).

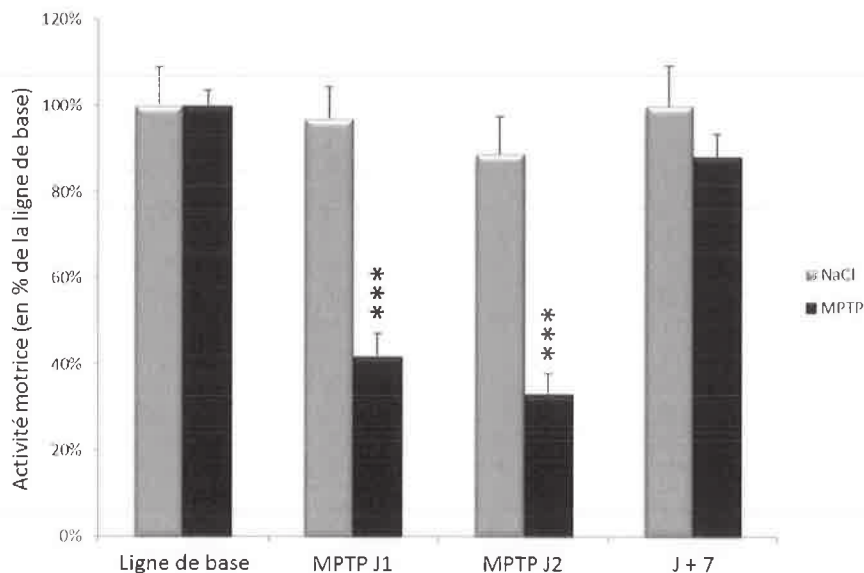


Figure V-1 : Comparaison de l'activité motrice des souris Saline et des souris MPTP. n = 12. Statistiques : *** : p < 0,001.

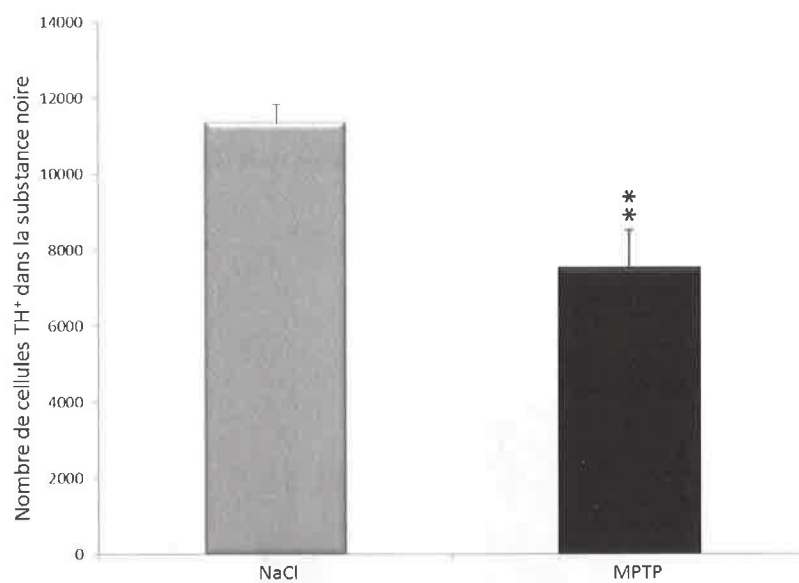


Figure V-2 : Comparaison du nombre de cellules TH⁺ dans la substance noire entre les souris Saline et MPTP. Mesuré 8 jours après l'injection de MPTP. n = 12. Statistiques : ** : p < 0,01.

V.1.1.2. Modèle rat 6-OHDA

Nous utilisons sur l'ensemble de ce travail de thèse le modèle 6-OHDA rat à 1 injection intrastriatale de 6-OHDA. Nous montrons ici qu'un tel protocole induit une forte augmentation de comportement rotatoire sous apomorphine des rats injectés (Figure V-4), ainsi qu'une diminution du nombre de cellules Nissl et TH⁺ dans la substance noire (Figure V-3).

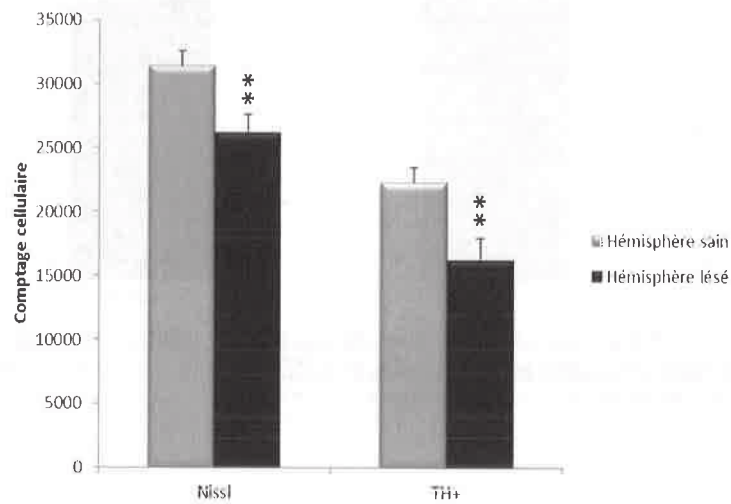


Figure V-3 : Comptage des cellules Nissl et TH⁺ de la substance noire, chez les rats 6-OHDA. Mesuré 23 jours après l'injection de 6-OHDA. n = 12. Comparaison entre l'hémisphère sain et l'hémisphère lésé. Statistiques : ** : p < 0,01 par rapport à l'hémisphère sain.

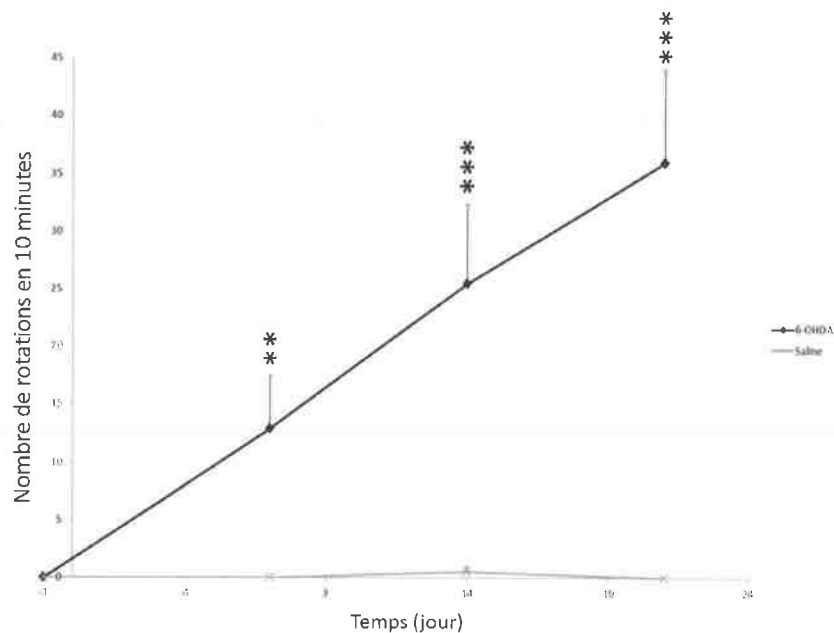


Figure V-4 : Comportement rotatoire sous apomorphine. Comparaison de l'évolution du nombre de tours en 10 minutes entre les groupes Saline et 6-OHDA, sur trois semaines. n = 12. Statistiques : ** : p < 0,01. *** : p < 0,001 par rapport aux rats NaCl.

V.1.1.3. Interactions entre lumière proche infrarouge et mécanismes d'assimilation du MPTP et de la 6-OHDA

Pour comprendre le potentiel neuroprotecteur de la lumière proche infrarouge dans la maladie de Parkinson, il est nécessaire de rappeler rapidement les mécanismes d'assimilation du MPTP par les souris, depuis son injection intrapéritonéale, jusqu'à l'intoxication des neurones dopaminergiques. Ainsi, après son injection, le MPTP entre dans la circulation sanguine, puis traverse la barrière hémato-encéphalique. Il est ensuite internalisé dans les astrocytes au sein desquels l'enzyme monoamine oxydase B (MAO-B) l'oxyde en MPP⁺. Le MPP⁺ est la forme toxique du MPTP. Après cette oxydation, le MPP⁺ est internalisé dans les cellules dopaminergiques par le transporteur de la dopamine DAT. C'est une fois dans les cellules dopaminergiques que le MPP⁺ entre dans la mitochondrie et joue son rôle toxique²³⁷ (voir section III.2.3.2.2 pour plus de détails).

Ressortent ici deux étapes critiques dans l'assimilation du MPTP par l'organisme de la souris :

- 1- Oxydation du MPTP par la MAO-B.
- 2- Internalisation du MPP⁺ par DAT.

Afin de s'assurer que les résultats obtenus et présentés précédemment sont bien des manifestations du potentiel neuroprotecteur de la lumière proche infrarouge, et pas des artefacts du modèle, il semble indispensable de s'assurer que la lumière proche infrarouge :

- 1- Ne modifie pas l'activité de l'enzyme MAO-B.
- 2- Ne modifie pas l'activité du transporteur DAT.

V.1.1.3.1. La lumière proche infrarouge ne modifie pas l'activité de la MAO-B

La Figure V-5 montre l'activité de l'enzyme MAO-B sous différentes conditions lumineuses. On remarque ici qu'il n'y pas de différence d'activité enzymatique (ANOVA ; F = 0,571 ; p = 0,577) entre les différentes conditions d'illumination (obscurité, 670 nm, 810 nm). Les conditions avec inhibiteur sont des contrôles négatifs, témoins du bon fonctionnement du kit utilisé. Dans nos conditions expérimentales, ni la lumière à 670 nm, ni celle à 810 nm ne modifient l'activité de l'enzyme MAO-B.

Activité de la MAO-B sous différentes conditions d'illumination

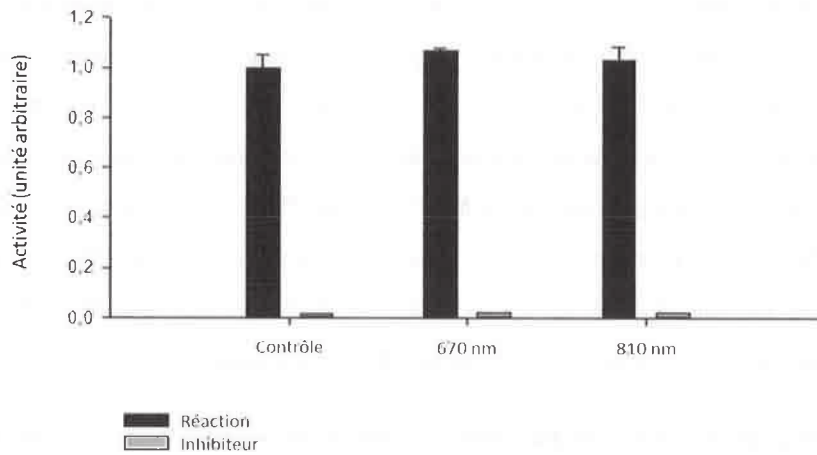


Figure V-5 : Activité *in vitro* de l'enzyme MAO-B dans l'obscurité, à 670 nm, et à 810 nm.

V.1.1.3.2. La lumière proche infrarouge ne modifie pas l'activité de hDAT

La Figure V-6 montre l'activité du transporteur DAT sous différentes conditions lumineuses. On remarque ici qu'il n'y pas de différences d'activité de DAT (ANOVA ; $F = 0,763$; $p = 0,473$) entre les différentes conditions d'illumination (obscurité, 670 nm, 810 nm). Les conditions avec inhibiteur sont des contrôles négatifs, témoins du bon fonctionnement du kit utilisé. Dans nos conditions expérimentales, ni la lumière à 670 nm, ni celle à 810 nm ne modifient l'activité de hDAT.

Activité de hDAT sous différentes conditions d'illumination

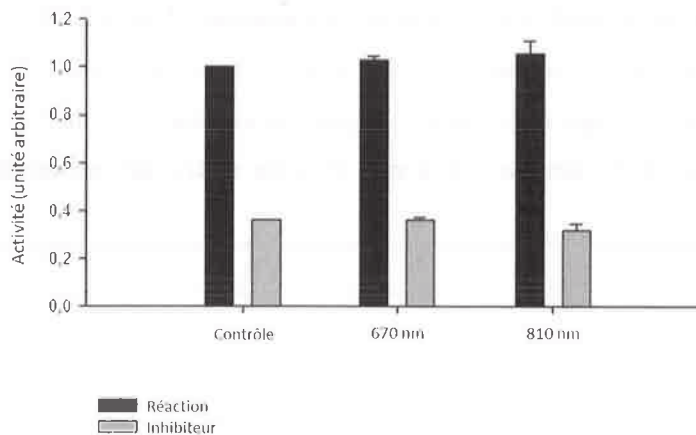


Figure V-6 : Activité *in vitro* du transporteur DAT dans l'obscurité, à 670 nm, et à 810 nm.

V.1.2. Développement et validation du modèle d'illumination intracérébrale chronique

V.1.2.1. *Optimisation du dispositif implanté chronique*

La Figure V-7 décrit le processus de réflexion ayant amené au dispositif d'illumination, implanté chez le rat (sections suivantes).

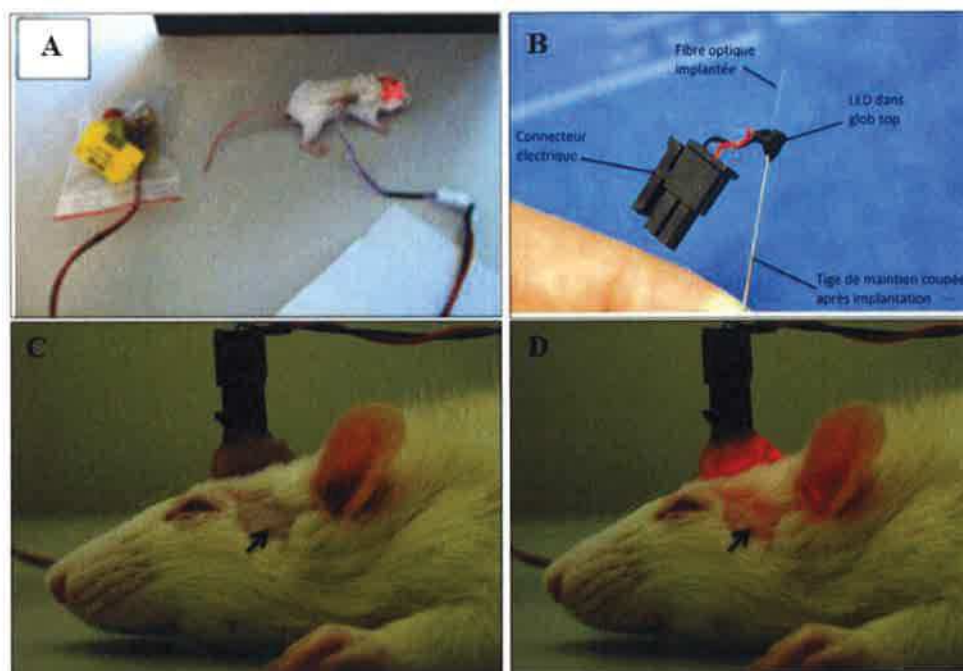


Figure V-7 : Illustrations des évolutions du dispositif d'illumination intracérébral chronique. A) Exemple de souris implantée avec l'implant historique. Adapté de Moro et al, 2014. B) Dispositif implantable d'illumination intracérébrale chronique, dimensionné pour le rat. Il présente un connecteur, positionné au niveau du crâne (voir C et D), ce qui permet des mouvements totalement libres de l'animal lorsqu'il n'est pas branché. C) et D) Rat implanté depuis 3 semaines, anesthésié pour la prise de photographies. Les flèches noires montrent une zone de peau où les poils ont commencé à repousser après la tonte préopératoire. C) Implant éteint. D) Implant allumé.

La Figure V-7A est tirée de Moro et al 2014¹⁴⁶. On voit ici le dispositif implanté original développé au laboratoire. Celui-ci a permis de mettre en évidence le potentiel neuroprotecteur d'une illumination proche infrarouge intracérébrale chez la souris MPTP. Cependant, on remarque aisément que ce dispositif est mal adapté à une étude comportementale sur l'animal.

La Figure V-7B présente le nouvel implant, optimisé et dimensionné pour le rat. Le connecteur électrique est désormais fixé directement sur le crâne de l'animal (Figure V-7C, D), et non plus dans le dos, de façon à faciliter la préhension par l'expérimentateur, augmenter le confort de l'animal, et l'empêcher de se débrancher par lui-même.

La Figure V-7D démontre le bon état de fonctionnement du dispositif, 3 semaines après l'implantation, soit à la fin de la campagne expérimentale. En complément, nous avons mesuré les puissances optiques délivrées par les implants avant implantation ($161 \mu\text{W} \pm 6$), puis lors de l'explantation, pendant le sacrifice ($159 \mu\text{W} \pm 4$). Il était prévu de retirer des campagnes expérimentales les animaux dont l'implant présentait une trop forte perte de puissance lors de l'explantation ; le cas n'a pas été observé.



V.1.2.2. Mesures physiques d'atténuation lumineuse dans le cerveau de rat

La Figure V-8 présente les mesures d'un signal lumineux à 670 nm émis par une fibre optique émettrice implantée, et reçu par différentes fibres optiques réceptrices, à distances variables (voir la section IV.4.1 pour le protocole).

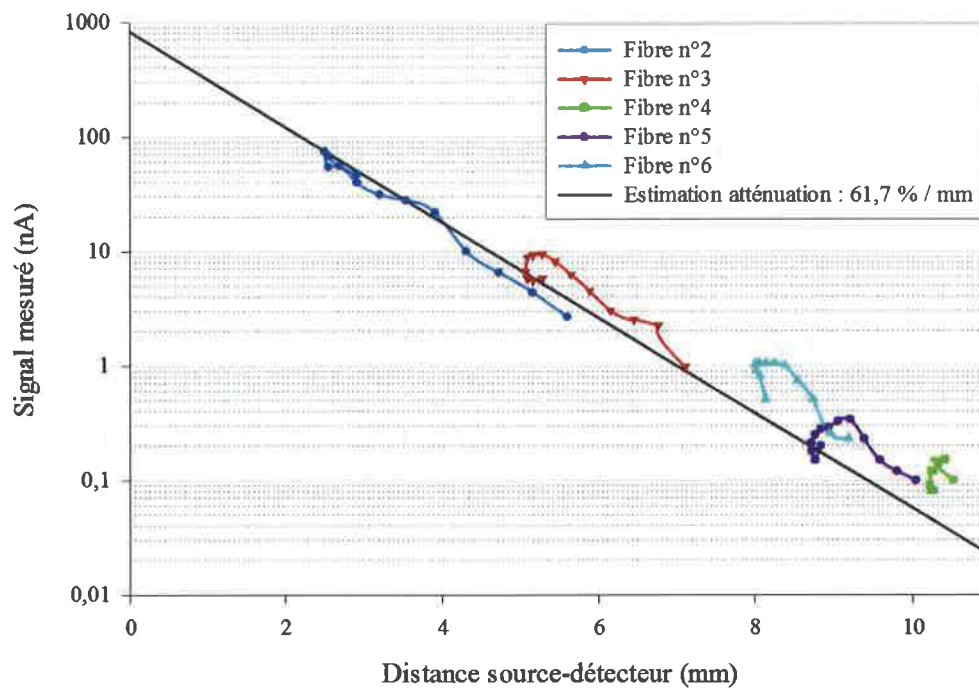


Figure V-8 : Mesure du signal lumineux perçu par les fibres réceptrices, en fonction de leur distance par rapport à la source optique.

On remarque ici que le signal mesuré diminue en fonction de la distance parcourue par la lumière avant d'atteindre le récepteur. En moyennant les pentes des courbes de tendance exponentielles pour chaque fibre (ordonnées à l'échelle log), on obtient la courbe d'estimation noire sur la Figure V-8. La pente de cette droite donne une estimation de l'atténuation du signal lumineux par millimètre traversé d'environ 61,7 %.

V.1.2.3. Sécurité thermique d'une illumination proche infrarouge intracérébrale par thermométrie IRM

Les résultats présentés dans cette section ont fait l'objet d'une présentation poster au congrès de la Society For Neuroscience 2014.

V.1.2.3.1. Évolution de la température et de sa diffusion en fonction du temps

La Figure V-9 montre l'évolution de la température intracérébrale, au point le plus chaud, dans un cerveau de rat ($n = 1$), pendant une illumination à 670 nm, *in vivo*. On note que la température augmente fortement dès le début de l'illumination (≈ 8 °C d'augmentation après 1 minute), puis se stabilise à une température plafond pendant le reste de l'illumination. Dès que l'illumination est arrêtée, la température chute brusquement pour revenir à son niveau basal en 1 minute. Ceci témoigne d'une excellente capacité de dissipation thermique de la part du tissu cérébral.

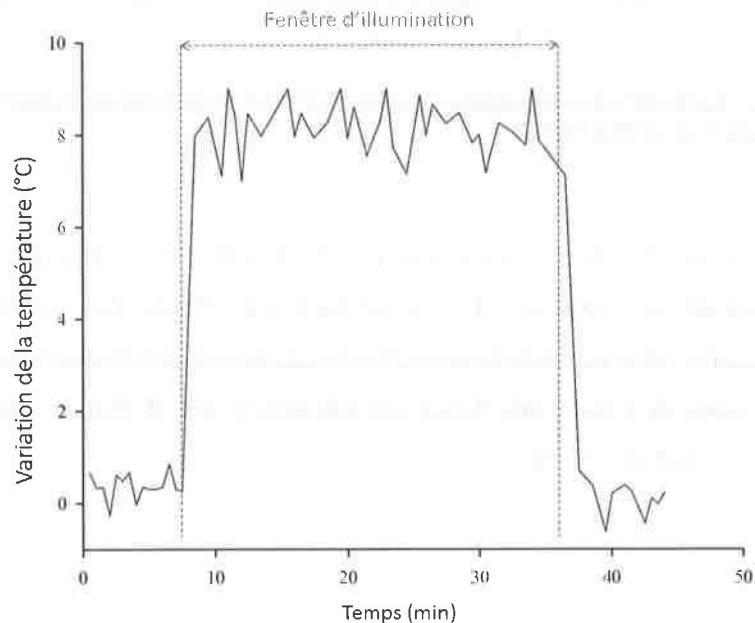


Figure V-9 : Mesure de l'évolution de la température pendant une illumination à 670 nm de 30 minutes, à une puissance optique de 115 mW, avec une fibre optique de \varnothing 200 μ m.

La Figure V-10 montre la diffusion de la température à partir du point le plus chaud ($300\ \mu\text{m}$ du bout de la fibre optique, $n = 1$). On remarque que la température diminue très rapidement dès lors que l'on s'éloigne du point le plus chaud. Ceci confirme l'excellente capacité de dissipation thermique de la part du tissu cérébral, même pendant l'illumination.

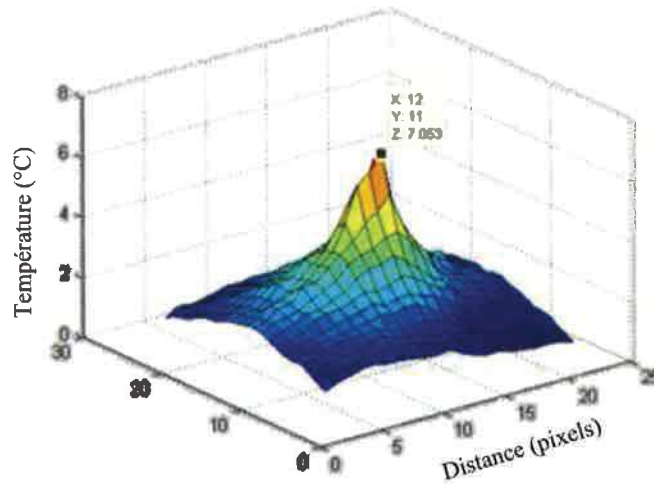


Figure V-10 : Diffusion de la température à partir du point le plus chaud (à 115 mW optiques).

La Figure V-11 montre l'évolution de la diffusion de la température dans le cerveau de rat, au cours du temps. On remarque qu'une minute après le début de l'illumination, une flaque de diffusion thermique est en place sur quasiment la moitié cerveau du rat ($n = 1$). Cette flaque est pseudo-sphérique. Une fois en place, elle n'évolue plus dans le temps, et ce, jusqu'à la fin de l'illumination ($T = 30\ \text{min}$).

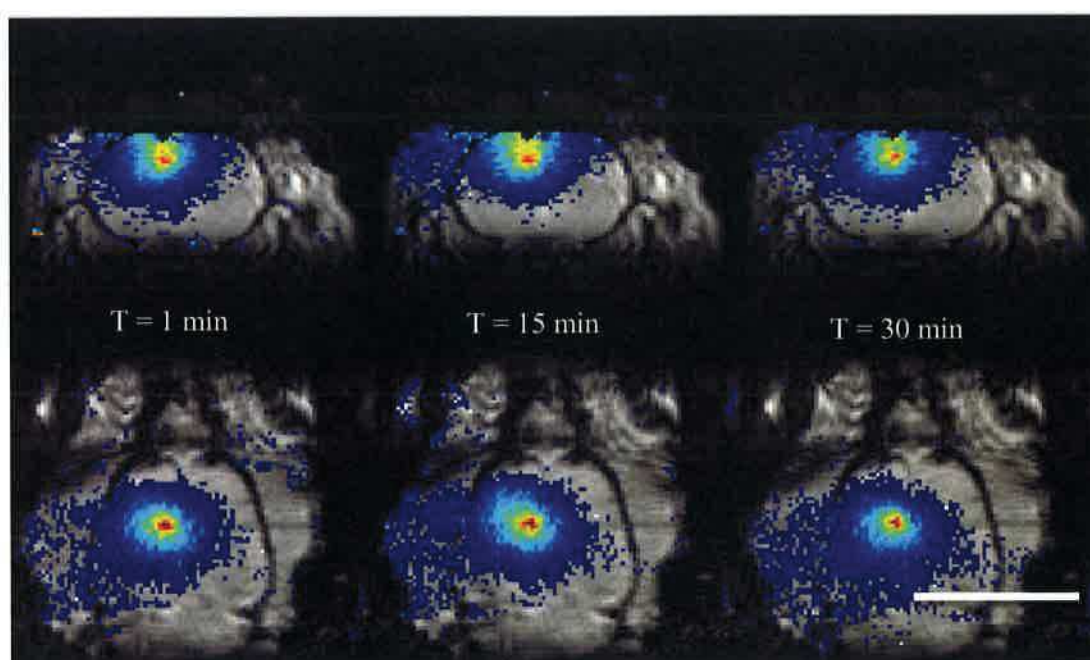


Figure V-11 : Evolution de la diffusion de la température en fonction du temps (à 115 mW d'illumination). Echelle : 1,5 cm.

En résumé, ces résultats montrent qu'une illumination à forte puissance optique (115 mW) dans le cerveau de rat *in vivo* provoque une forte augmentation de la température, avec une diffusion thermique sur un large volume. Toutefois, ces phénomènes se mettent en place en seulement quelques dizaines de secondes après le début de l'illumination, puis n'évoluent plus jusqu'à l'arrêt de l'illumination. À ce moment, la température revient très rapidement à son niveau basal.

V.1.2.3.2. Évolution de la température et de sa diffusion en fonction de la puissance optique délivrée

L'objectif principal de cette étude sur la sureté thermique d'une illumination intracérébrale à 670 nm est de déterminer jusqu'à quelle puissance optique il est possible d'illuminer sans augmenter la température locale cérébrale. La norme 45502-2-1, article 17 limite cette augmentation locale et chronique à 2 °C maximum, lors d'une implantation chez l'humain. Toutefois, puisque cette norme est basée sur des mesures effectuées sur du tissu cutané, plus facilement renouvelable par l'organisme que le tissu cérébral, il nous est apparu préférable d'abaisser le seuil tolérable à 1 °C d'augmentation.

Les Figure V-12 et Figure V-13 montrent l'augmentation de la température en fonction de la puissance optique délivrée ($n = 6$). On remarque que l'augmentation de la température est dépendante de la puissance optique appliquée, avec une augmentation linéaire en fonction de la puissance ($R^2 = 0,9958$, Figure V-13). D'autre part, on retrouve le phénomène d'évolution en plateau une fois la température maximale atteinte (Figure V-12), observé dans la section précédente. Il est à noter qu'une puissance de 5 mW ne provoque pas d'augmentation de la température égale ou supérieure à 1 °C ($p < 0,001$). D'autre part, une puissance optique de 15 mW ne provoque pas d'augmentation de la température égale ou supérieure à 2 °C ($p < 0,001$).

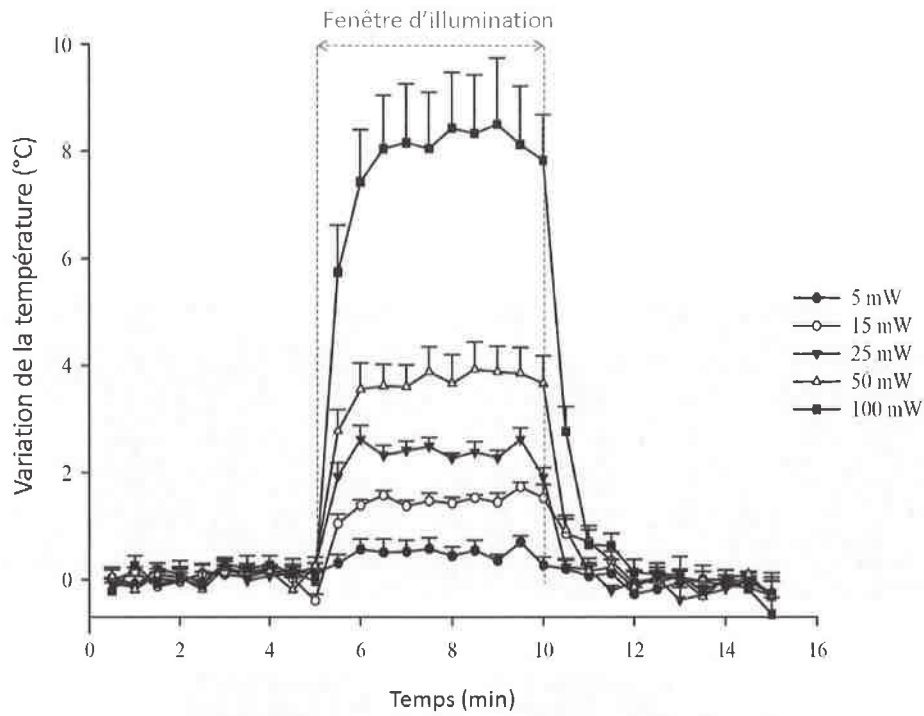


Figure V-12 : Évolution de la température en fonction de la puissance optique délivrée.

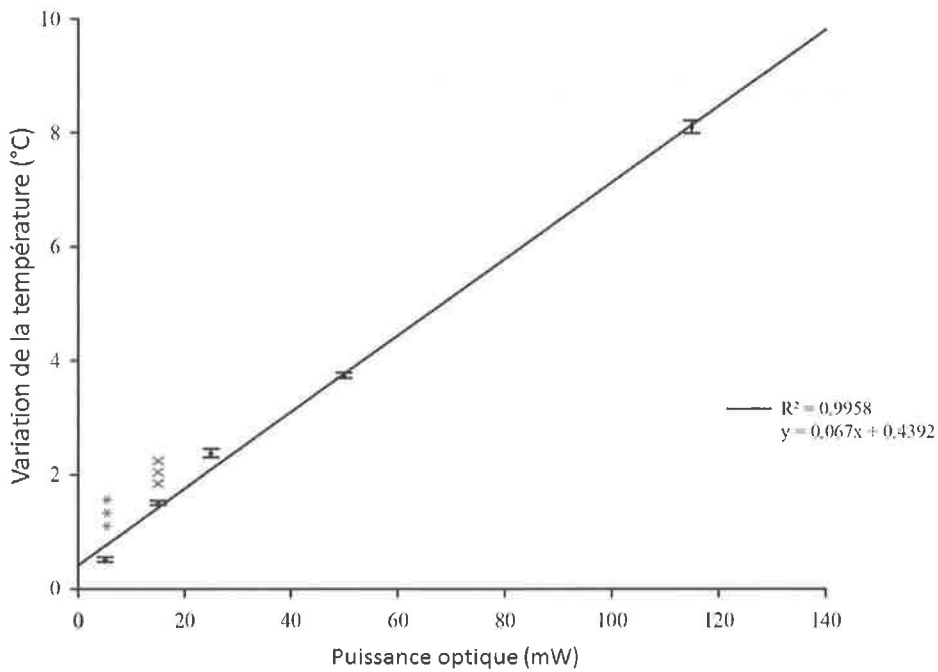


Figure V-13 : Évolution de la température en fonction de la puissance optique délivrée. n = 6. Statistiques, *** : p < 0,001 par rapport à 1 °C. xxx : p < 0,001 par rapport à 2 °C.

La Figure V-14 montre la diffusion de la température en fonction de la puissance optique délivrée ($n = 6$). À partir de 15 mW, on observe cette flaque de diffusion thermique. Celle-ci augmente en volume à mesure que la puissance optique augmente. Elle garde cependant son caractère sphérique, quelle que soit la puissance optique testée.

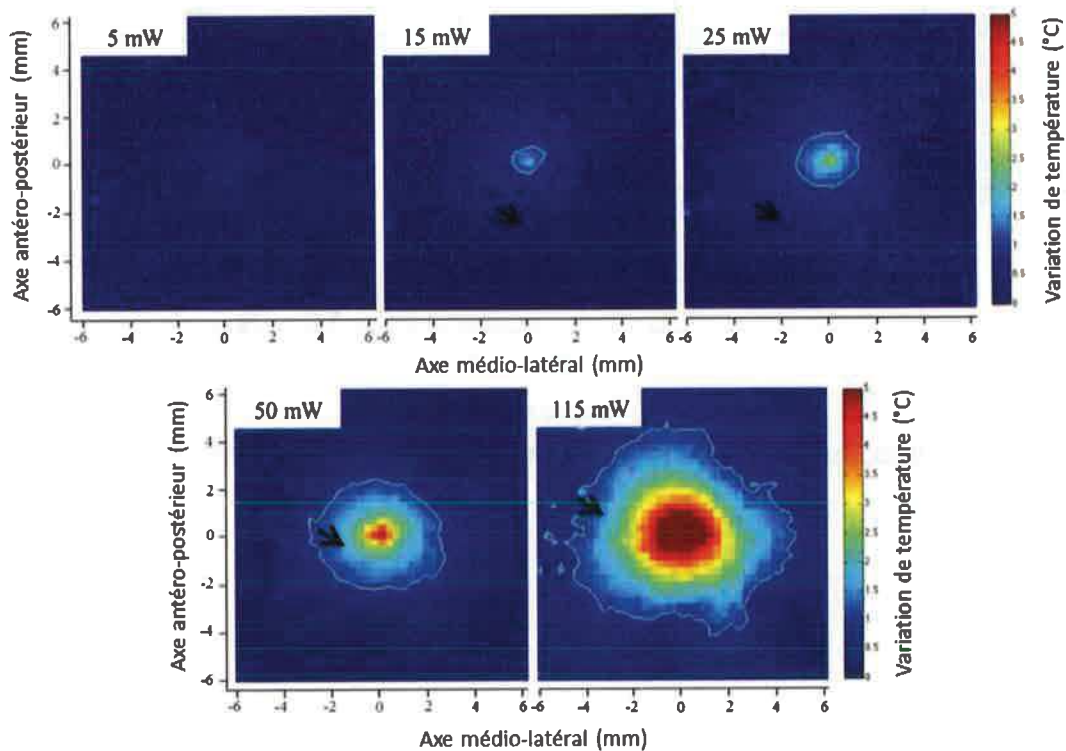


Figure V-14 : Évolution de la diffusion de la température en fonction de la puissance optique délivrée.

En résumé, il est possible, avec une fibre optique de 300 μm de diamètre, d'illuminer jusqu'à 5 mW optiques sans dépasser le seuil de 1 $^{\circ}\text{C}$ maximum d'augmentation de température.

V.1.2.4. Développement d'une cage d'hébergement permettant l'illumination chronique

La Figure V-15 présente la potence d'alimentation électrique de l'implant. Celle-ci a été développée de façon à permettre une illumination continue de l'animal, pendant 3 semaines, tout en permettant à ce dernier des mouvements libres dans son environnement de vie.

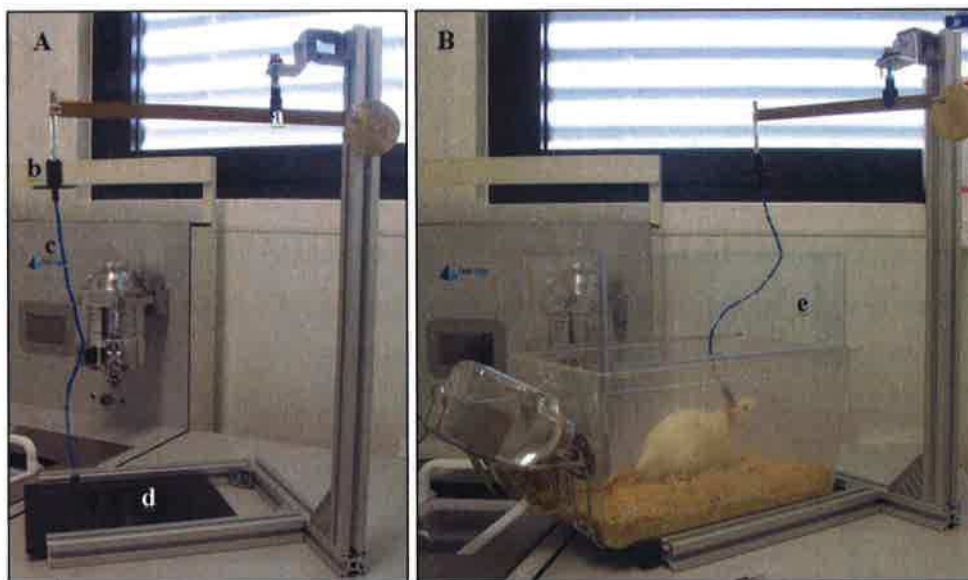


Figure V-15 : Potence d'alimentation électrique long terme de l'implant rat. A) (a) potence lestée, avec (b) connecteur tournant électrique, (c) câble blindé, (d) socle d'accueil de la cage d'hébergement. B : rat branché à la potence, avec (e) rehausse de cage. Dans ces conditions, le rat est libre de ses mouvements et ne peut pas porter atteinte à l'intégrité des câbles électriques, ni se débrancher.

Dans le détail, les câbles électriques sont blindés avec une gaine bleue (c) pour les solidifier tout en conservant leur souplesse. Ils sont reliés à un connecteur tournant (b), ce qui permet à l'animal de tourner sur lui-même sans s'emmêler. Le tout est tenu par une potence (a) lestée sur l'axe vertical de façon à permettre à (b) et (c) de s'élever à mesure que le rat se met debout. La potence (a) a également un axe de rotation horizontal de façon à optimiser la liberté de mouvement de l'animal. La grille de fermeture de la cage d'hébergement a été remplacée par une rehausse plastique (e), suffisamment haute pour empêcher le rat de s'échapper, tout en lui autorisant un maximum de liberté.

V.1.2.5. *Evaluation du bien-être animal*

L'ensemble des résultats présentés dans la section V.1.2.5. a été obtenu sur des rats implantés, non 6-OHDA.

V.1.2.5.1. Douleur post-implantatoire chez le rat

La Figure V-16 montre l'évolution de la douleur post-implantatoire sur un groupe de 5 rats implanté à J0. On remarque que la douleur ressentie par les animaux est le plus élevé le lendemain de la chirurgie (moyenne = 4,7/8). Un niveau supérieur à 3/8 sur l'échelle RGS nécessite une médication analgésique. Pour la suite des expérimentations sur rats implantés, il a donc été décidé de traiter les animaux à la Buprénorphine pendant les 72 heures post-opératoires.

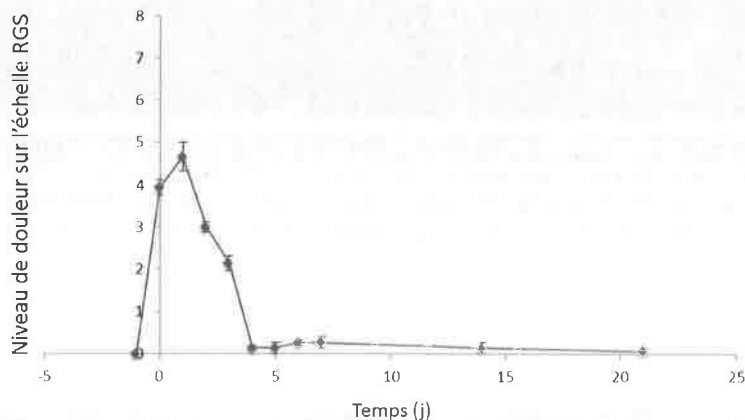


Figure V-16 : Evolution de la douleur post-implantatoire chez le rat. Implantation à J0.

V.1.2.5.2. Masse corporelle des rats

La Figure V-17 montre l'évolution de la masse corporelle des animaux sur les trois semaines d'implantation. On note que les rats témoins (non implantés, n=3) présentent une augmentation régulière de leur masse corporelle sur les trois semaines d'étude. Les animaux sains, implantés avec une fibre optique, subissent une perte de masse de l'ordre de 10 % sur les 72 heures qui suivent l'implantation. Leur masse augmente de nouveau régulièrement par la suite, jusqu'au sacrifice, selon une pente similaire à celle des animaux témoins.

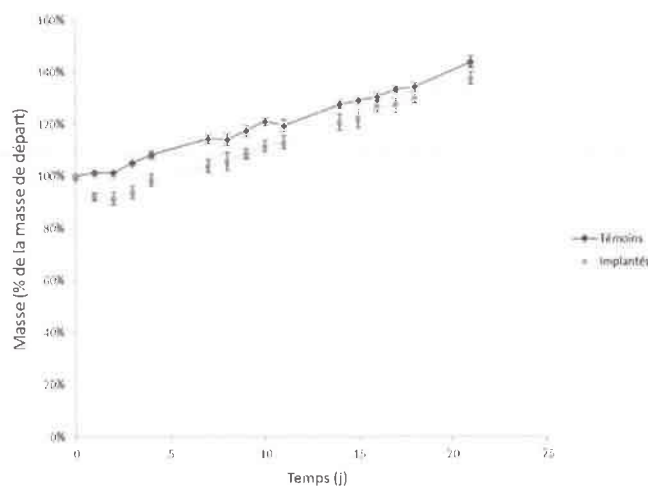


Figure V-17 : Evolution de la masse corporelle des rats au cours du temps.

V.1.2.5.3. Activité motrice des rats

La Figure V-18 montre l'évolution de l'activité motrice au cours du temps. L'activité motrice des animaux témoins reste stable autour de 100 % tout au long des trois semaines d'étude. L'activité des rats implantés diminue de 17 % la première semaine après l'implantation, toutefois, cette différence avec les rats témoins n'est pas significative ($p = 0,063$). Il n'y a pas de différence d'activité motrice entre les deux groupes sur les points comportementaux réalisés à J14 et J21.

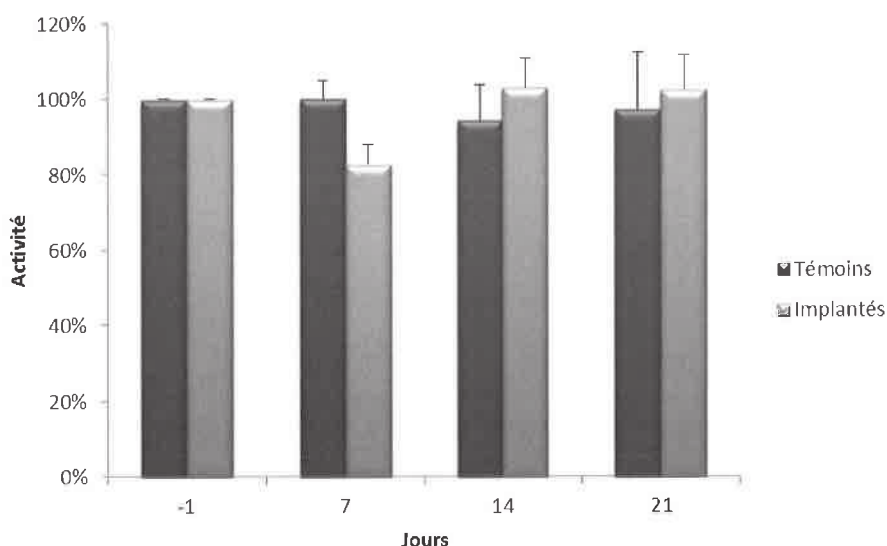


Figure V-18 : Evaluation en open-field de l'activité motrice des rats au cours du temps.

En résumé, notre étude sur la tolérance de l'implant par les rats montre que celui-ci est bien toléré par les animaux. L'induction d'une réponse douloureuse post-implantatoire reste limitée (moins de 5/8), contrôlable par des analgésiques, et de courte durée (72 h). Les animaux perdent légèrement leur masse corporelle dans les 72 h qui suivent l'implantation, puis récupèrent normalement par la suite. Ils ne présentent pas de déficit d'activité motrice sur l'ensemble des 21 jours d'étude.

V.2. THEME 2 : POTENTIEL THERAPEUTIQUE D'UNE ILLUMINATION PROCHE INFRAROUGE DANS DES MODELES RONGEURS DE LA MALADIE DE PARKINSON

Les études fondatrices du potentiel neuroprotecteur d'une illumination proche infrarouge envers la maladie de Parkinson ont montré une préservation des cellules dopaminergiques dans la substance noire compacte^{146,164,195,238}, mais également sur l'activité motrice de souris intoxiquées au MPTP, notamment à 670 nm¹⁴⁶.

L'objectif de ce deuxième thème de mon travail de doctorat est :

- 1- D'apporter la preuve de concept du potentiel neuroprotecteur d'une illumination à 810 nm sur le modèle souris MPTP.
- 2- De valider sur un second modèle (rat 6-OHDA) le potentiel neuroprotecteur de la lumière proche infrarouge.

V.2.1. Preuve de concept sur le modèle neurotoxique MPTP : illumination extra-cérébrale à 810 nm

L'objectif est ici de déterminer si une illumination à 810 nm présente un potentiel neuroprotecteur, sur notre modèle souris MPTP. Les résultats obtenus dans cette campagne expérimentale ont fait l'objet d'une publication dans « Neuroscience Research », présentée ci-après :



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neures



Rapid Communication

810 nm near-infrared light offers neuroprotection and improves locomotor activity in MPTP-treated mice



Florian Reinhart^a, Nabil El Massri^b, Fannie Darlot^a, Napoleon Torres^a, Daniel M. Johnstone^c, Claude Chabrol^a, Thomas Costecalde^a, Jonathan Stone^c, John Mitrofanis^{b,*,4}, Alim-Louis Benabid^a, Cécile Moro^a

^a CLINATEC, IJ Sfrira Centre, CEA, LETI, University of Grenoble, Alpes F38000, France

^b Department of Anatomy F13, University of Sydney, Sydney 2006, Australia

^c Department of Physiology F13, University of Sydney, Sydney 2006, Australia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 September 2014

Received in revised form 7 November 2014

Accepted 15 November 2014

Available online 25 November 2014

Keywords:

Tyrosine hydroxylase

Substantia nigra

Neuroprotection

ABSTRACT

We explored whether 810 nm near-infrared light (Nir) offered neuroprotection and/or improvement in locomotor activity in an acute 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mouse model of Parkinson's disease. Mice received MPTP and 810 nm Nir treatments, or not, and were tested for locomotive activity in an open-field test. Thereafter, brains were aldehyde-fixed and processed for tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. Our results showed that MPTP-treated mice that were irradiated with 810 nm Nir had both greater locomotor activity (~40%) and number of dopaminergic cells (~20%) than those that were not. In summary, 810 nm (as with 670 nm) Nir offered neuroprotection and improved locomotor activity in MPTP-treated mice.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd and the Japan Neuroscience Society. All rights reserved.

The current "gold standard" drug and surgical treatments for Parkinson's disease are effective at attenuating the motor signs (e.g., tremor, akinesia), at least at their onset (Bergman and Deuschl, 2002). However they do not reliably slow the progression of the disease and vulnerable cells, mainly in the substantia nigra pars compacta (SNc), continue to die during the course of treatment (Jankovic, 2008). The discovery of new therapies that offer neuroprotection against parkinsonian insult is therefore paramount. In this context, several recent studies in animal models of Parkinson's disease have reported that red to infrared light therapy ($\lambda = 600\text{--}1070\text{ nm}$) can be neuroprotective (Quirk et al., 2012; Johnstone et al., 2014a). The mechanisms that underpin this neuroprotection are not clear, but it has been shown that light stimulates mitochondrial function by activating photoacceptors, such as cytochrome oxidase, resulting in increased electron transfer in the respiratory chain and increased adenosine-5'-triphosphate

(ATP) production (DeSmet et al., 2006; Hamblin and Demidova, 2006; Rojas and Gonzalez-Lima, 2011; Chung et al., 2012).

Neuroprotection has been reported using different wavelengths within the range of 600–1070 nm, with the longer wavelengths (e.g., 810, 1070 nm) having a greater depth of penetration through body tissues than the shorter ones (e.g., 670 nm; DeSmet et al., 2006; Hamblin and Demidova, 2006; Rojas and Gonzalez-Lima, 2011; Chung et al., 2012). In our previous studies using the MPTP-treated and K369I transgenic mouse models of Parkinson's disease, we demonstrated that 670 nm near-infrared light (Nir) provided neuroprotection and improved locomotion (Shaw et al., 2010; Peoples et al., 2012; Moro et al., 2013; Purushothuman et al., 2013; Johnstone et al., 2014b). In this study, we explored whether the longer wavelength 810 nm Nir, which is known to penetrate deeper through body tissues, offered a greater degree of neuroprotection and improvement in locomotor activity in the MPTP-treated mouse model. Our results will hopefully provide key data on the feasibility and effectiveness of different wavelengths in the red to infrared range as therapeutic tools in Parkinson's disease.

Male BALB/c mice ($n = 44$; 8–10 weeks old) were housed on a 12 h light/dark cycle with unlimited access to food and water. All experiments were approved by COMETH (Grenoble). Mice received intraperitoneal injections of either MPTP or saline, combined with simultaneous 810 nm Nir treatments or not (Shaw et al., 2010; Moro

* Corresponding author. Tel.: +61 293512500.

E-mail addresses: florian.reinhart@cea.fr (F. Reinhart), nabielmassri@sydney.edu.au (N.E. Massri), fannie.darlot@cea.fr (F. Darlot), napoleon.torres-martinez@cea.fr (N. Torres), daniel.johnstone@sydney.edu.au (D.M. Johnstone), c.chabrol@cea.fr (C. Chabrol), thomas.costecalde@cea.fr (T. Costecalde), jonathan.stone@sydney.edu.au (J. Stone), john.mitrofanis@sydney.edu.au (J. Mitrofanis), alimlouis@sfr.fr (A.-L. Benabid), cecile.moro@cea.fr (C. Moro).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2014.11.005>

0168-0102/© 2014 Elsevier Ireland Ltd and the Japan Neuroscience Society. All rights reserved.

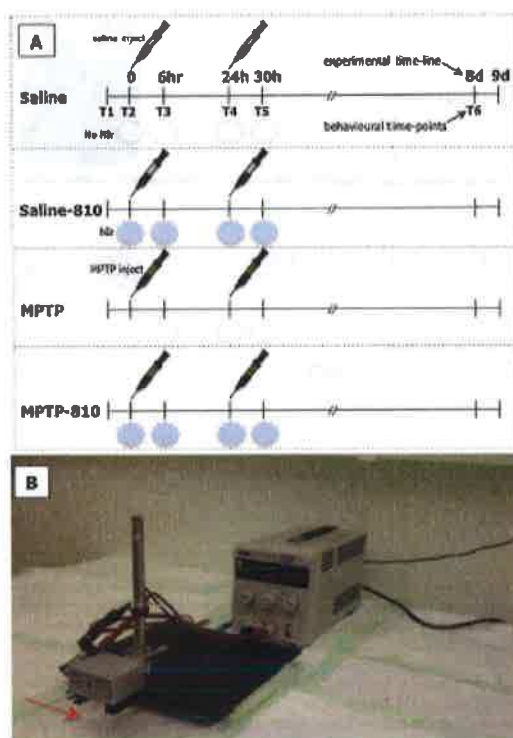


Fig. 1. (A) Schematic of the different experimental groups used in this study, namely Saline, Saline-810, MPTP, MPTP-810. The experimental time-line and behaviour time-points are shown. For the experimental time-line, there were two injections (saline or MPTP) and they occurred in the first 24 h. There were four 810 nm NIR treatments (or not) and these occurred immediately after each injection and about 6 h later on the same. After the last NIR (and fourth) treatment, mice were allowed to survive for 6 days. (B) Experimental set-up. The head of the mice was held under the light source (arrow).

et al., 2013). Thus, there were 4 experimental groups ($n = 11$ per group): (1) Saline: saline injections, (2) Saline-810: saline injections with NIR, (3) MPTP: MPTP injections, (4) MPTP-810: MPTP injections with NIR-810 (see Fig. 1A).

Our experimental paradigm of simultaneous administration of parkinsonian insult and therapeutic application was similar to that of previous studies on animal models of Parkinson's disease (Shaw et al., 2010; Peoples et al., 2012; Moro et al., 2013; Johnstone et al., 2014b; El Massri et al., 2014). This paradigm is unlike the clinical reality where there is cell loss prior to therapeutic intervention. However, in our experimental study we hoped to determine the maximum effect of NIR neuroprotection. We should note that pre and post treatment of MPTP-treated mice by NIR have yielded similar patterns of neuroprotection to the simultaneous NIR treatment (Peoples et al., 2012; unpublished observations).

We used an acute MPTP mouse model as described previously (Schober, 2004; Shaw et al., 2010; Blesa et al., 2012; Bové and Perier, 2012; Moro et al., 2013; Johnstone et al., 2014b). Briefly, we made 2 MPTP (25 mg/kg injections; total of 50 mg/kg per mouse) or saline injections over a 24 h period. Following each injection, mice in the MPTP-810 and Saline-810 groups were treated to one cycle of NIR-810 of 90 s from a LED (light emitting diode)-matrix

device (LED EPITEX SMT810, EPITEX INC.: 66-3 Minami-Kawabe Cho, Higashi-Kujyo, Minami-Ku, Kyoto, Japan; Fig. 1B). To ensure consistency of application of the 810 nm clear light, a small green light on the device switched-on automatically when the 810 nm light was delivered. Six hours after each injection and first NIR-810 treatment, mice in these groups received a second NIR-810 treatment, but no MPTP or saline injection. Hence, each mouse in these groups received 4 NIR-810 treatments, equalling a global dose of 57.6 mJ to the skull (160 μ W power). For each treatment, the mouse was placed underneath the 810 nm device (in region indicated by arrow, Fig. 1B). The 810 nm NIR generated no heat and reliable delivery of the radiation was achieved. For the Saline and MPTP groups, mice were held under the device as described above, but it was not turned on. After the last treatment, mice were allowed to survive for 6 days (Fig. 1A). We used this model and experimental design (simultaneous treatment) because we wanted to compare our results on 810 nm directly to previous ones using 670 nm, ones that used the same model and experimental design (Shaw et al., 2010; Moro et al., 2013; Johnstone et al., 2014b; El Massri et al., 2014).

During the experimental period, we performed a standard open-field test as described previously (Moro et al., 2013). Briefly, mice were placed in black boxes and locomotive activity was measured using the Noldus Ethovision (XT10) programme (Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands); a high definition camera detected changes in contrast and the programme analysed the number of pixels that changed from one picture to the next (8 pictures/sec). In this way, the movement of each mouse was analysed. Each animal was tested at 6 time points (Fig. 1A): (T1) the day before the first MPTP or saline injection (T2) immediately after first MPTP or saline injection and 810 nm NIR (or no) treatment; (T3) after second 810 nm NIR (or no) treatment; (T4) after second MPTP or saline injection and third 810 nm NIR (or no) treatment; (T5) after fourth 810 nm NIR (or no) treatment; (T6) 6 days after the last injection/treatment. Mice were tested for 10 min at each time point. We tested locomotive activity at these points, particularly T2 and T4, because we wanted to explore the effects of NIR during a time when the MPTP was most effective (e.g., immediately after injections), when the mice were most immobile and "sick" (Moro et al., 2013). For comparisons between groups, a one-way ANOVA test was performed, in conjunction with a Tukey-Kramer post hoc multiple comparison test (GraphPad Prism v6).

At the end of the experimental period, mice were anaesthetised with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (60 mg/kg) and their brains processed for immunohistochemistry as described previously (Shaw et al., 2010; Moro et al., 2013; Johnstone et al., 2014b). Briefly, brains were aldehyde-fixed, cryoprotected and sectioned coronally with a freezing microtome. Sections were incubated in anti-tyrosine hydroxylase (TH), followed by biotinylated anti-rabbit IgG and then extravidin-peroxidase complex. Finally, sections were reacted in a 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride solution and coverslipped. All reagents were purchased from Sigma. For negative controls, sections were processed as described above but without primary antibody. These sections were immunonegative.

The number of TH⁺ cells within the SNC (main body of the nucleus, i.e., ventral tier; Rinne, 1993) was estimated using the optical fractionator method (Stereoinvestigator, MBF Science), as outlined previously (Shaw et al., 2010; Peoples et al., 2012; Moro et al., 2013; Johnstone et al., 2014b). Briefly, systematic random sampling of sites – with an unbiased counting frame – within defined boundaries of SNC was undertaken. For comparisons between groups, a one-way ANOVA test with post hoc multiple comparison test was performed as before.

Fig. 2A shows recorded values of locomotor activity of mice in the different experimental groups at the 6 time points examined. The activity of mice in both the Saline (ANOVA: $F = 1.1$; $p > 0.05$)

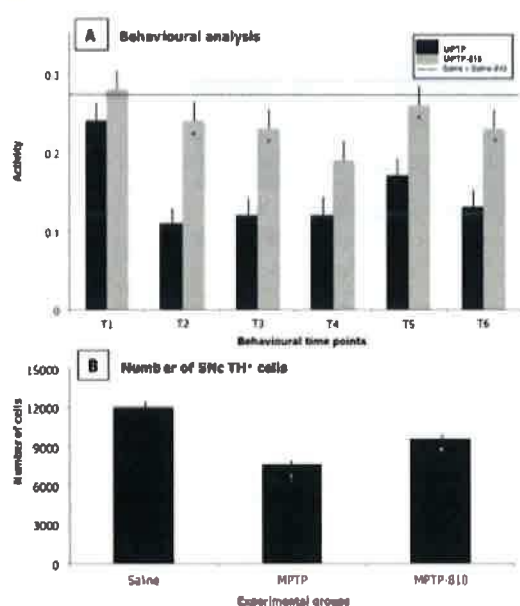


Fig. 2. (A) Mouse activity as assessed by an open-field test. Black columns show results for the MPTP group, while grey columns show results for the MPTP-810 group. Saline and Saline-810 groups were pooled and are shown as a dotted line. Each animal was tested at 6 time points, as described in the text. (B) TH⁺ cell number in the SNc. In both (A) and (B), columns show the mean \pm standard error of the total number in each group. The symbols in the MPTP groups represent levels of significant difference from the Saline groups (B), while symbols in the MPTP-810 groups represent differences from the MPTP groups (A and B); † represents $p < 0.0001$ and * represents $p < 0.05$.

and Saline-810 (ANOVA: $F = 1.6$; $p > 0.05$) groups did not change substantially across the different time points, from T1 to T6. Further, at each individual time point, there were no major differences in the activity of mice in the Saline and Saline-810 groups (Tukey test; $p > 0.05$). Hence, for clarity of presentation, the values of activity of mice in these groups were pooled and are represented as a dotted line across the graph in Fig. 2A. By contrast, clear differences were evident in the activity of mice in the MPTP and MPTP-810 groups; their values are hence represented as individual columns at each time point (Fig. 2A).

The locomotor activity of mice in the MPTP group, unlike those in the Saline and Saline-810 groups, changed substantially across the different time points (ANOVA: $F = 4.6$; $p < 0.001$). There was a clear reduction in activity after the first MPTP injection (T2), and this low level of activity was maintained up until the last time point (T6; Fig. 2A). By contrast, the locomotor activity of mice in the MPTP-810 group – as with those in the Saline groups – did not change considerably across the different points (ANOVA: $F = 1.3$; $p > 0.05$). In the MPTP-810 group, unlike the MPTP group, there was no clear and consistent reduction in activity after the first MPTP injection, nor at any time point thereafter (Fig. 2A). Indeed, the activity of mice in the MPTP-810 group was generally much higher, almost to saline control group levels, than those in the MPTP group from after the first MPTP injection and 810 nm Nlr treatment (T2; Tukey test; $p < 0.05$), up until the last time point examined (T6; Tukey test; $p < 0.05$), 7 days later. Overall, the mice in the MPTP-810 group had ~40% greater locomotor activity than the mice in the MPTP group over the experimental period.

Fig. 2B shows the estimated number of TH⁺ cells in the SNc of the Saline, MPTP and MPTP-810 groups. As with the behavioural analysis, our cell analysis did not reveal any major differences in number or morphology between the Saline and Saline-810 groups (Tukey test; $p > 0.05$); hence, for clarity, values and images for the Saline-810 group are not shown. Overall, the variations in TH⁺ cell number between the different groups were significant for TH⁺ cells (ANOVA: $F = 27$; $p < 0.0001$). The number of TH⁺ cells in the MPTP group was ~35% lower than in the Saline group (Tukey test; $p < 0.0001$) and moreover, ~20% lower than in the MPTP-810 group (Tukey test; $p < 0.01$; Fig. 2B).

Fig. 3 shows photomicrographs of TH⁺ cells of the SNc in the Saline (Fig. 3A), MPTP (Fig. 3B) and MPTP-810 (Fig. 3C) groups. Although there were fewer TH⁺ somata in the MPTP group (Fig. 3B), those remaining were similar in overall appearance to those seen in the Saline (Fig. 3A) and MPTP-810 (Fig. 3C) groups. The bulk of cells had round or oval-shaped somata with one to two labelled dendrites.

In this study, we used TH immunocytochemistry to describe patterns of cell death and protection. As with many previous studies, we interpreted a change in TH⁺ cell number after experimental manipulation as an index of cell survival (Pallat et al., 1996; Shaw et al., 2010; Peoples et al., 2012; Moro et al., 2013; Johnstone et al., 2014b). If cells lose TH expression, then they are likely to undergo death subsequently (Javoy-Agid et al., 1990; Jackson-Lewis et al., 1995; Björklund et al., 1997), that then leads to a reduction in Nissl-stained (and TH⁺) cell number (Wallace et al., 2007). Notwithstanding a small number of cells that may have transient loss of TH expression (Moro et al., 2013), a key aspect of our study was whether 810 nm Nlr treatment saved TH expression during a period when MPTP treatment alone would have abolished it (Shaw et al., 2010; Peoples et al., 2012; Moro et al., 2013; Johnstone et al., 2014b).

The vast majority of previous studies reporting Nlr-induced neuroprotection after parkinsonian insult have used 670 nm light (Liang et al., 2006; Ying et al., 2008; Shaw et al., 2010; Peoples et al., 2012; Moro et al., 2013; Purushothuman et al., 2013; Johnstone et al., 2014b), although a few have used other wavelengths in the Nlr range. For example, mitochondrial movement along axons in hybrid cells, bearing mitochondrial DNA from Parkinson's disease patients, has been shown to improve substantially after 810 nm Nlr application (Trimmer et al., 2009). There is also evidence that 810 nm treatment rescues flight and mitochondrial defects, together with promoting complex IV-dependent respiration, in pink1 mutant flies (Vos et al., 2013). The results of our study extend these previous findings by reporting neuroprotection and improved locomotion by 810 nm Nlr in an animal model of Parkinson's disease.

Our results draw a noteworthy comparison to those using 670 nm Nlr in the same acute MPTP-treated mouse model (Moro et al., 2013). When comparing neuroprotective effects, Moro et al. (2013) revealed an ~30% increase in TH⁺ cell number in the SNc of the MPTP-Nlr compared to the MPTP group using 670 nm Nlr, a value in the same range as our ~20% increase using 810 nm Nlr. Thus, the 2 wavelengths offered a similar degree of neuroprotection, with one not substantially better than the other. The same mechanism for neuroprotection was presumably at work for 670 nm and 810 nm Nlr: that is, they both increased ATP production in the dopaminergic cells, triggering a cascade of secondary effects that helped protect the cells against the toxic insult (Quirk et al., 2012; Johnstone et al., 2014a). However, when comparing behavioural effects, some clearer differences between the 2 wavelengths were evident. While improvements in locomotor activity following 670 nm Nlr were only seen after the second MPTP injection and third Nlr treatment (Moro et al., 2013), improvements following 810 nm Nlr were evident, and indeed were more striking,

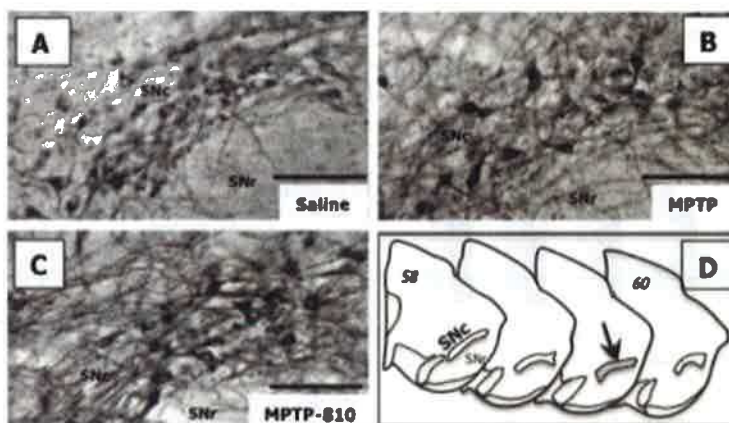


Fig. 1. Representative photomicrographs of TH⁺ cells in the SNc of the Saline (A), MPTP (B) and MPTP-810 (C) groups. There were fewer TH⁺ somata in the MPTP group (B) compared to other groups. All images are of coronal sections: dorsal to top and lateral to right. Scale bar = 100 μm. (D) Schematic diagrams of coronal sections, across the rostrocaudal axis from left to right: plates 58–60 of mouse atlas (Paxinos and Franklin, 2001), from where the photomicrographs were taken (arrow: lateral regions, shaded).

after the first MPTP injection and NIR treatment (present study). The mechanism responsible for this greater “symptomatic” effect – that is, improvement in locomotion – is not clear. Possibilities include a stronger effect of 810 nm NIR than 670 nm NIR in stimulating either dopaminergic cell transmission through the striatum or, alternatively, the activity of non-dopaminergic cell groups in the brain, such as those involved in generating movement (e.g., motor cortex, pedunculopontine tegmental nucleus (Parent, 1996)). The differential effects of distinct NIR wavelengths on the activity of brain cells is not known. Future studies may explore these issues further.

In conclusion, our results indicated that 810 nm NIR offered a comparable degree of neuroprotection and a more immediate improvement in locomotor activity in MPTP-treated mice, compared to 670 nm NIR. Thus, together with penetrating deeper into body tissues, the 810 nm may have a greater symptomatic (i.e., locomotive) effect than 670 nm in parkinsonian cases, one that would need to be considered further in future therapeutic endeavours in humans.

Authors’ contribution

All authors contributed to the analysis of the data and the writing of the manuscript. FR, CM, CC, FD, NEM and JM contributed to the experimental work.

Conflict of interest

There was no conflict of interest for any of the authors: CM, FD, TC, NT, CC, DMJ, JS, ALB and JM are members of staff at their respective institutions, while FR and NEM are undergraduate students.

Acknowledgements

We are forever grateful to Tenix corp, Salteri family, Fondation Philanthropique Edmond J Safra, Michael J Fox Foundation, France Parkinson and the French National Research Agency (ANR Carnot Institute) for funding this work. DMJ is an Early Career Research Fellow of the NHMRC (Australia). We thank Sharon Spana, Diane Agay, Guillaume Barboux, Mylène D’Orchymont, Clément Perrin and Cyril Zenga for excellent technical assistance.

References

Bergman, H., Deuschl, G., 2002. Pathophysiology of Parkinson’s disease: from clinical neurology to basic neuroscience and back. *Mov. Disord.* 17 (3), S28–S40.

Björklund, A., Rosenblad, C., Winkler, C., Kirik, D., 1997. Studies on neuroprotective and regenerative effects of GDNF in a partial lesion model of Parkinson’s disease. *Neurobiol. Dis.* 4, 186–200. <http://dx.doi.org/10.1006/mbdi.1997.D151>.

Blesa, J., Phani, S., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S., 2012. Classic and new animal models of Parkinson’s disease. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 845618. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/845618>.

Bové, J., Perier, C., 2012. Neurotoxin-based models of Parkinson’s disease. *Neuroscience* 211, 51–76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.057>.

Chung, H., Dai, T., Sharma, S.K., Huang, Y.-Y., Carroll, J.D., Hamblin, M.R., 2012. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann. Biomed. Eng.* 40, 516–533. <http://dx.doi.org/10.1007/s10439-011-0454-7>.

DeSmet, K.D., Paz, D.A., Corry, J.J., Ellis, J.T., Wong-Riley, M.T.T., Henry, M.M., Buchmann, E.V., Connelly, M.P., Dovi, J.V., Liang, H.L., Henshel, D.S., Yeager, R.L., Millsap, D.S., Lim, J., Gould, L.J., Das, R., Jett, M., Hodgson, B.D., Margolis, D., Whelan, H.T., 2006. Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation. *Photomed. Laser Surg.* 24, 121–128. <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2006.24.121>.

El Massri, N., Johnstone, D.M., Peoples, C.L., Moro, C., Reinhart, F., Torres, N., Stone, J., Benabid, A.L., Mitrofanis, J., 2014. The effect of different doses of near-infrared light on dopaminergic cell survival and gliosis in MPTP-treated mice. *Int. J. Neurosci.* <http://dx.doi.org/10.3109/00207454.2014.994063> (in press). ID: 994063.

Hamblin, M.R., Demidova, T.M., 2006. Mechanisms of low level light therapy. In: *Mechanisms for Low-Light Therapy*, Proc. of SPIE.

Jackson-Lewis, V., Jakowec, M., Burke, R.E., Przedborski, S., 1995. Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegener.* 4, 257–269.

Jankovic, J., 2008. Parkinson’s disease: clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79, 368–376. <http://dx.doi.org/10.1136/jnnp.2007.131045>.

Javoy-Agid, F., Hirsch, E.C., Dumas, S., Duyckaerts, C., Mallet, J., Agid, Y., 1990. Decreased tyrosine hydroxylase messenger RNA in the surviving dopaminergic neurons of the substantia nigra in Parkinson’s disease: an in situ hybridization study. *Neuroscience* 38, 245–253. [http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90389-L](http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(90)90389-L).

Johnstone, D., Coleman, K., Moro, C., Torres, N., Ellis, J., Baker, G.E., Ashkan, K., Stone, J., Benabid, A.-L., Mitrofanis, J., 2014a. The potential of light therapy in Parkinson’s disease. *ChronoPhysiol. Ther.* 4, 1–14. <http://dx.doi.org/10.2147/CPT.S57180>.

Johnstone, D.M., Massri, N.E., Moro, C., Spana, S., Wang, X.S., Torres, N., Chabrol, C., De Jaeger, X., Reinhart, F., Purushothaman, S., Benabid, A.-L., Stone, J., Mitrofanis, J., 2014b. Indirect application of near infrared light induces neuroprotection in a mouse model of parkinsonism – an abscopal neuroprotective effect. *Neuroscience*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.023>.

Liang, H.L., Whelan, H.T., Ellis, J.T., Meng, H., Buchmann, E., Lerch-Gaggl, A., Wong-Riley, M., 2006. Photobiomodulation partially rescues visual cortical neurons from cyanide-induced apoptosis. *Neuroscience* 139, 639–649. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.12.047>.

Moro, C., Torres, N., El Massri, N., Ratzel, D., Johnstone, D.M., Stone, J., Mitrofanis, J., Benabid, A.-L., 2013. Photobiomodulation preserves behaviour and midbrain

- dopaminergic cells from MPTP toxicity: evidence from two mouse strains. *BMC Neurosci.* 14, 40. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2202-14-40>.
- Parent, A., 1996. *Carpenter's Human Neuroanatomy*, 9th ed. Williams and Wilkins, PA, USA.
- Paxinos, G., Franklin, K., 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd ed. Academic Press, CA, USA.
- Peoples, C., Spaná, S., Ashkan, K., Benabid, A.-L., Stone, J., Baker, G.E., Mitrofanis, J., 2012. Photobiomodulation enhances nigral dopaminergic cell survival in a chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 18, 469–476. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreidis.2012.01.005>.
- Palmiter, R., Benazzouz, A., Benabid, A.L., 1996. Subthalamic nucleus lesion in rats prevents dopaminergic nigral neuron degeneration after striatal 6-OHDA injection: behavioural and immunohistochemical studies. *Eur. J. Neurosci.* 8, 1408–1414.
- Punshothaman, S., Nandasena, C., Johnstone, D.M., Stone, J., Mitrofanis, J., 2013. The impact of near-infrared light on dopaminergic cell survival in a transgenic mouse model of parkinsonism. *Brain Res.* 1535, 61–70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.08.047>.
- Quirk, E.J., Desmet, K.D., Henry, M., Buchmann, E., Wong-Riley, M., Ellis, J.T., Whelan, H.T., 2012. Therapeutic effect of near infrared (NIR) light on Parkinson's disease models. *Front. Biosci. (Elite Ed.)* 4, 818–823.
- Rinne, J.O., 1993. Nigral degeneration in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 8 (1), S31–S35.
- Rojas, J.C., Gonzalez-Lima, F., 2011. Low-level light therapy of the Eye and Brain. *Eye Brain* 3, 49–57.
- Schober, A., 2004. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* 318, 215–224. <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-004-0938-y>.
- Shaw, V.E., Spaná, S., Ashkan, K., Benabid, A.-L., Stone, J., Baker, G.E., Mitrofanis, J., 2010. Neuroprotection of midbrain dopaminergic cells in MPTP-treated mice after near-infrared light treatment. *J. Comp. Neurol.* 518, 25–40. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.22207>.
- Trimmer, P.A., Schwarz, K.M., Borland, M.J., De Taboada, L., Streeter, J., Oron, U., 2009. Reduced axonal transport in Parkinson's disease cybrid neurites is restored by light therapy. *Mol. Neurodegener.* 4, 26. <http://dx.doi.org/10.1186/1750-1326-4-26>.
- Vos, M., Lovisa, B., Geerts, A., Morais, V.A., Wagnières, G., van den Bergh, H., Gingen, A., De Strooper, B., Tardy, Y., Verstreken, P., 2013. Near-infrared 808 nm light boosts complex IV-dependent respiration and rescues a Parkinson-related pink1 model. *PLoS ONE* 8, e78562. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0078562>.
- Wallace, B.A., Ashkan, K., Heise, C.E., Foote, K.D., Torres, M., Mitrofanis, J., Benabid, A.-L., 2007. Survival of midbrain dopaminergic cells after lesion or deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in MPTP-treated monkeys. *Brain J. Neurol.* 130, 2129–2145. <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awm137>.
- Ying, R., Liang, H.L., Whelan, H.T., Ellis, J.T., Wong-Riley, M.T.T., 2008. Pretreatment with near-infrared light via light-emitting diode provides added benefit against rotenone- and MPP+ induced neurotoxicity. *Brain Res.* 1243, 167–173. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2008.09.057>.

En conclusions, cette étude a permis de démontrer le potentiel neuroprotecteur de la lumière à 810 nm contre la maladie de Parkinson, à travers :

- 1- Une préservation de l'activité locomotrice des souris illuminées à 810 nm sur toute la durée de l'intoxication au MPTP.
- 2- une protection des neurones dopaminergiques de la substance noire des animaux.

V.2.1. Preuve de concept sur le modèle neurotoxique 6-OHDA : illumination intracérébrale à 670 nm

L'objectif de cette étude est de déterminer le potentiel neuroprotecteur d'une illumination à 670 nm, intracérébrale, dans un modèle 6-OHDA rat de la maladie de Parkinson. Cette étude fait l'objet d'une publication dans la revue *Journal of Neurosurgery*, présentée ci-dessous.

Intracranial application of near-infrared light in a hemi-parkinsonian rat model: the impact on behavior and cell survival

Florian Reinhart, BSc,¹ Nabil El Massri, BSc,² Claude Chabrol, BEng,¹ Celine Cretallaz, PhD,¹ Daniel M. Johnstone, PhD,³ Napoleon Torres, MD, PhD,¹ Fannie Darlot, PhD,¹ Thomas Costecalde, PhD,¹ Jonathan Stone, PhD, DSc,³ John Mitrofanis, PhD,² Alim-Louis Benabid, MD, PhD,¹ and Cécile Moro, PhD¹

¹CEA, Leti, and Clinatoc Departments, University Grenoble Alpes, Minatec Campus, Grenoble, France; and Departments of ²Anatomy and ³Physiology, University of Sydney, New South Wales, Australia

OBJECT The authors of this study used a newly developed intracranial optical fiber device to deliver near-infrared light (Nir) to the midbrain of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned rats, a model of Parkinson's disease. The authors explored whether Nir had any impact on apomorphine-induced turning behavior and whether it was neuroprotective.

METHODS Two Nir powers (333 nW and 0.16 mW), modes of delivery (pulse and continuous), and total doses (634 mJ and 304 J) were tested, together with the feasibility of a midbrain implant site, one considered for later use in primates. Following a striatal 6-OHDA injection, the Nir optical fiber device was implanted surgically into the midline midbrain area of Wistar rats. Animals were tested for apomorphine-induced rotations, and then, 23 days later, their brains were aldehyde fixed for routine immunohistochemical analysis.

RESULTS The results showed that there was no evidence of tissue toxicity by Nir in the midbrain. After 6-OHDA lesion, regardless of mode of delivery or total dose, Nir reduced apomorphine-induced rotations at the stronger, but not at the weaker, power. The authors found that neuroprotection, as assessed by tyrosine hydroxylase expression in midbrain dopaminergic cells, could account for some, but not all, of the observed behavioral improvements; the groups that were associated with fewer rotations did not all necessarily have a greater number of surviving cells. There may have been other "symptomatic" elements contributing to behavioral improvements in these rats.

CONCLUSIONS In summary, when delivered at the appropriate power, delivery mode, and dosage, Nir treatment provided both improved behavior and neuroprotection in 6-OHDA-lesioned rats.

<http://thejns.org/doi/abs/10.3171/2015.5.JNS15735>

KEY WORDS functional neurosurgery; neuroprotection; Parkinson's disease; photobiomodulation; substantia nigra; 6-hydroxydopamine

PARKINSON'S disease is a progressive disorder with distinct cardinal signs of resting tremor, lead-pipe rigidity, akinesia, bradykinesia, or all of these.^{2,3,4} The current treatment options of drug therapy and surgery treat the motor signs of the disease very well, at least initially, but they do not stop the progression of the disease. The dopa-

minergic cells in the substantia nigra pars compacta (SNc) continue to die throughout the treatment period.^{3,34,35,49} In essence, these treatments do not offer neuroprotection.

Many recent studies, from the culture dish to various animal models, provide promising evidence that near-infrared light (NIR) treatment is an effective neuroprotective

ABBREVIATIONS ATP = adenosine-5'-triphosphate; CPu = caudate-putamen complex; GFAP = glial fibrillary acidic protein; IBA1 = ionized calcium binding adaptor molecule 1; LED = light-emitting diode; MPTP = 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; Nir = near-infrared light; NirC = continuous Nir at weaker power; NirC+ = continuous Nir at stronger power; NirP = pulse Nir; PBS = phosphate-buffered saline; RHS = right-hand side; SNc = substantia nigra pars compacta; SNr = substantia nigra pars reticulata; TH = tyrosine hydroxylase; VTA = ventral tegmental area; 6-OHDA = 6-hydroxydopamine.

SUBMITTED April 1, 2015. **ACCEPTED** May 21, 2015.

INCLUDE WHEN CITING Published online November 27, 2015; DOI: 10.3171/2015.5.JNS15735.

F. Reinhart et al.

agent.^{8,9,27,39} NIR treatment has been shown to increase cell survival among dopaminergic cells after various types of parkinsonian insult, for example rotenone,^{29,35} 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP),^{12,28,32,33,40,45,52} and the K3691 transgenic mutation.⁴² The precise mechanism involved is not clear, but NIR is believed to repair mitochondrial damage and increase adenosine-5'-triphosphate (ATP) production, as well as decrease oxidative stress and activate various transcription factors.^{7,15,16,47} In addition to this structural evidence of neuroprotection, NIR treatment has been reported to improve locomotor activity in MPTP-treated mice.^{33,45,54}

The neuroprotective effects of NIR have been reported in cases where there have been no (e.g., culture dish) or few tissue barriers (e.g., retina or small mouse brain). In fact, the farthest distance that NIR has been traced from the source is approximately 30 mm, a distance well short of the 80–100 mm required to reach the SNc from the surface of the brain in humans.²⁷ This makes NIR directed transcranially unlikely to be useful for treating midbrain lesions in humans. To overcome this, we have been developing an optical fiber device that can be implanted accurately within the brain, to deliver NIR with minimal attenuation to regions near the SNc. Our recent results in MPTP-treated mice show that intracranially applied NIR does not cause toxic damage to surrounding brain tissue when applied in the region of the lateral ventricle, and that when applied in this fashion and location, it is neuroprotective to dopaminergic SNc cells.³²

In this study, we used the intracranial optical fiber device to deliver NIR to the SNc in another model of Parkinson's disease, the 6-hydroxydopamine (6-OHDA) hemiparkinsonian rat. Because there is no ideal animal model of Parkinson's disease, exploring the neuroprotective and behavioral effects of NIR in a number of models strengthens the case for translation to humans. We have explored 2 main issues in this study. First, we analyzed whether the midbrain is a feasible implant site. Our previous study in mice, for species-specific technical reasons, used the lateral ventricle as a target site,³² but for our planned monkey and human work, we will target a region closer to the SNc, namely the midline midbrain at a point midway between the left and right SNc. Second, we analyzed whether NIR had any impact on apomorphine-induced rotational behavior or was neuroprotective, or both, in 6-OHDA-lesioned rats. We tested the impact of different NIR applications, using 2 powers (333 nW and 0.16 mW), modes of delivery (pulse and continuous), and total doses (634 mJ and 304 J). We have evidence regarding some of these issues in the MPTP-treated mouse model using the intracranial device,³² but no evidence is available in the 6-OHDA-lesioned rat model or on behavioral outcomes. Overall, our findings will indicate whether NIR improves behavior and offers neuroprotection in another model of the disease, as well as whether the midline of the midbrain is a feasible optical fiber implant site.

Methods

Animals

Male Wistar rats (approximately 8 weeks old; n = 61)

were used for these experiments. Animals were housed on a 12-hr light/dark cycle with unlimited access to food and water. All experiments were approved by the Animal Ethics Committee COMETH (Grenoble) and by the French Ministry for Research.

Experimental Design

We set up 5 experimental groups (Fig. 1). All groups received intrastriatal injections of either 6-OHDA or saline, combined with light-emitting diode (LED)-optical fiber implants delivering NIR, or not. The different groups were saline (saline injections, no NIR; n = 8), 6-OHDA (6-OHDA injections, no NIR; n = 15), and 6-OHDA-NIR (6-OHDA injections, with NIR; n = 38) groups. There were 3 6-OHDA-NIR groups, each of which received different doses of NIR during the course of the survival period. These were the 6-OHDA-NIRp (NIR delivered in pulses at 0.16 mW power; n = 16), 6-OHDA-NIRc+ (NIR delivered continuously at 0.16 mW power; n = 13), and 6-OHDA-NIRc (NIR delivered continuously but at 333 nW power; n = 9) groups. A saline group exposed to NIR was not included, because we have previously published that NIR has no impact on the survival and function of cells in normal brains.^{12,28,32,33,40,45,52} Given the consistency of these previous results, and the complexity of our surgical protocol, we believed that the extra control group was redundant.

Our experimental paradigm of simultaneous administration of parkinsonian insult and therapeutic application was similar to that of previous studies of animal models of Parkinson's disease.^{12,28,32,33,40,41,45,52,53} This paradigm is unlike the clinical reality in which there is cell loss prior to therapeutic intervention. However, in our experimental study, we hoped to determine the maximum effect of any NIR neuroprotection by the LED-optical fiber implant.

6-OHDA Injections

Following protocols used in many previous studies,^{13,18,31,41} rats were anesthetized after an intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg; Imalgène 1000; Merial) and xylazine (10 mg/kg; Rompun; Bayer Animal Health), and they had 6-OHDA (7.5 µg/µl saline with addition of 0.2% ascorbic acid; approximately 4 µl injected over 8 minutes) or saline (plus 0.2% ascorbic acid) injected stereotactically into the caudate-putamen complex (CPu; coordinates: anteroposterior +1 mm, lateral +3 mm, dorsal-ventral -6.3 mm to skull)³⁹ of the right-hand side (RHS). We injected the CPu, rather than the medial forebrain bundle, because we wanted a smaller lesion in the SNc (20%–30%); medial forebrain bundle injections are known to generate larger lesions and massive SNc cell death (> 70%), a situation not ideal for neuroprotection studies.^{13,18,31,41}

Optical Fiber NIR Implants

After the 6-OHDA injection, we implanted the LED-optical fiber device, as described previously in mice.³² Briefly, a small 670-nm LED (SMT 670; Epitex) was attached to an optical fiber (FT300EMT; Thorlabs) with a tip diameter of 300 µm (Fig. 2A). The step index optical fiber was plastic coated, as to limit leakage of NIR along the

Near-infrared light treatment in 6-OHDA-lesioned rats

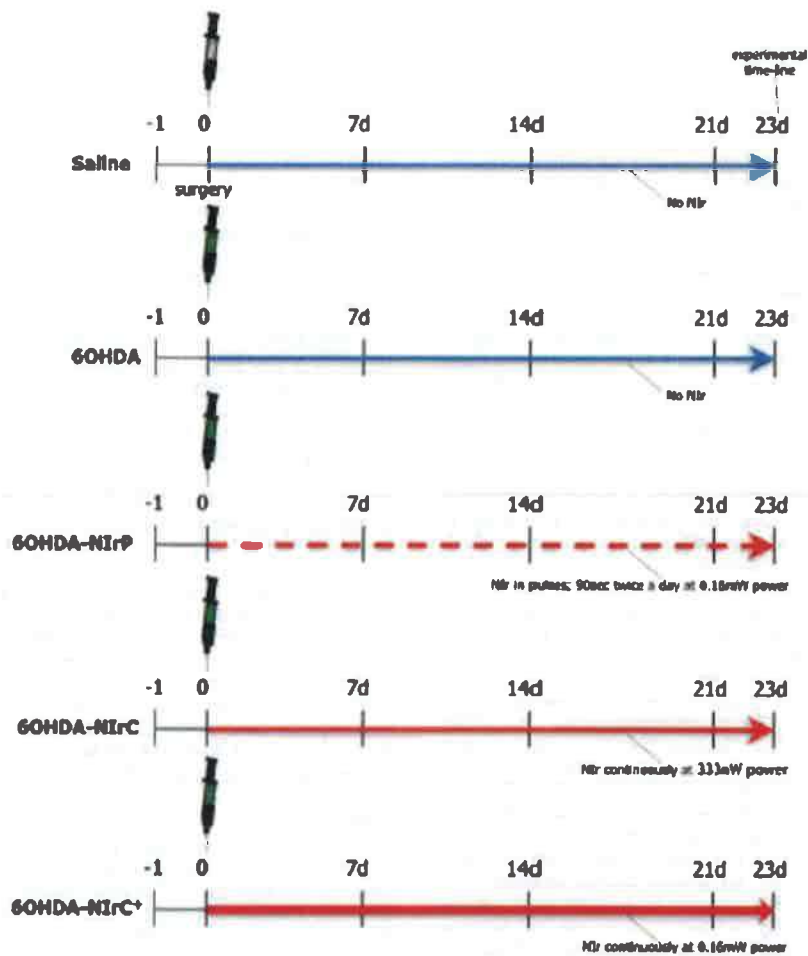


FIG. 1. Outline of the experimental design of this study. Surgery on rats, namely 6-OHDA or saline injection and implantation of optical fiber, was performed on Day 0. Animals were allowed to survive for 23 days thereafter. In the 6-OHDA-NIrP group, Nir was applied for 90 seconds twice a day, while in the 6-OHDA-NIrC groups, Nir was applied continuously during the survival period; in the 6-OHDA-NIrC+ group, Nir was emitted at a higher power than in the other Nir groups. Rats were tested for apomorphine-induced turning behavior on Day -1 (day before surgery) as well as Day 7, Day 14, and Day 21 after surgery. Figure is available in color online only.

length of the fiber and focus to the tip. The LED was attached with electrical cables that would be connected subsequently to a current regulator circuit and battery source (Fig. 2A). All LED-optical fibers were tested for power output using a calibrated light sensor (Optical power meter, Anritsu ML9002A). We found that the LED emitted no heat and was satisfactory for use over longer periods. The optical fiber was implanted stereotactically into a region near the SNc, incorporating the red nucleus and ventral tegmental area (VTA), toward the midline (Fig. 2B; coordinates to bregma: anteroposterior -5.6 mm, lateral

+2.9 mm, dorsal-ventral -8.5 mm to skull, at an angle of 20°).³⁹ We chose this site because it is close to the SNc of both sides. After implantation, biological cement was used to attach the device to the cranium, and the proximal ends of the battery cables were attached to the device, while the distal ends were attached to a battery source placed on top of the rat cage (Fig. 2C-E).³² Immediately following the surgery, rats in the 6-OHDA-NIrP group had 0.16 mW power (the same power as used previously for neuroprotection in MPTP-treated mice)³² delivered in pulses, twice a day for 90 sec (approximately 6 hours apart)

F. Reinhart et al.

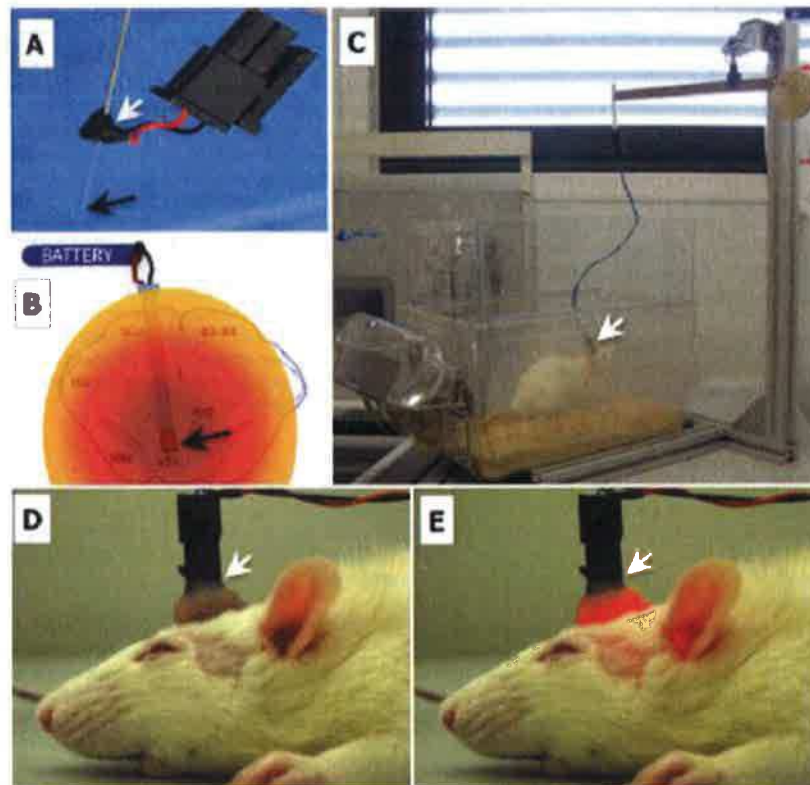


FIG. 2. A: Image of the LED-optical fiber device; white arrow indicates the LED, while the black arrow indicates the optical fiber (these arrows indicate corresponding structures in B–E). B: Schematic diagram of optical fiber located within our target region near the SNc. C: Image of rat, soon after surgery, with cable attached to battery source on top of the cage. This setup allowed the rat to move freely around the cage, eating and drinking at will. D and E: Images of a rat soon after surgery with the implanted LED-optical fiber device turned off (D) and on (E). This animal was still anesthetized following surgery. Note that the NIR was visible through the biological cement surrounding the device, the skin, and auricles, and although not obvious in this image, the eyes. The black arrows indicate the tip of the optical fiber, while the white arrows indicate the LED device. Red = red nucleus. Figure is available in color online only.

over the 23-day survival period, resulting in a total dose of 634 mJ (Table 1). Rats in the 6-OHDA-NIRc+ group also had 0.16 mW power, but this was delivered continuously over the 23-day survival period, resulting in a much higher total dose of 304 J. These 2 groups thus allowed us to compare the effectiveness of 2 NIR doses delivered at the same power. Finally, the rats in the 6-OHDA-NIRc group had a weaker 333 nW power delivered continuously over the survival period, resulting in the same total dose as the 6-OHDA-NIRp group of 634 mJ. Hence, the 6-OHDA-NIRp and 6-OHDA-NIRc groups allowed us to compare the effectiveness of the same dose, but delivered by 2 different NIR powers (Table 1).

For several reasons, we are confident that any neuroprotective or behavioral improvement after NIR treatment would not be related to a direct deactivation or degradation of the toxin by NIR. First, NIR offers beneficial effects

to diseased or damaged neurons in a broad range of neurological conditions and animal models of disease. For example, NIR is neuroprotective after 1) insult by a number of different toxins (e.g., MPTP, rotenone, methanol)^{1,29,53} 2) traumatic brain injury,^{37,44} 3) stroke,³⁶ 4) macular degeneration,²¹ and 5) transgenic mutation in mouse models

TABLE 1. The modes of NIR delivery, power, and total doses used in the different groups of this study

| Group | Mode of NIR Delivery | Power | Total Dose |
|--------------|---------------------------|---------|------------|
| Saline | None | None | None |
| 6-OHDA | None | None | None |
| 6-OHDA-NIRp | Pulse, 90 sec twice a day | 0.16 mW | 634 mJ |
| 6-OHDA-NIRc | Continuous | 333 nW | 634 mJ |
| 6-OHDA-NIRc+ | Continuous | 0.16 mW | 304 J |

of multiple sclerosis,³⁴ Alzheimer's disease,¹⁰ and parkinsonism.⁴² Second, NIR is equally effective when applied either before or after toxic insult; pre- or posttreatment of NIR, either *in vitro*³⁵ or *in vivo*,⁴⁰ mitigates MPTP-induced cell damage. Third, our measurements using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry indicate that NIR does not directly degrade MPTP (unpublished observations). Finally, NIR has been shown to have a direct influence on intrinsic cellular activity,^{7,15,16,47} as well as being directly effective in reducing cell death induced by apoptosis.⁴⁴ Taken together, these findings all strongly support the idea that NIR provides genuine cellular interaction and neuroprotection.

Apomorphine-Induced Rotational Behavior

Rats were given an intraperitoneal injection of apomorphine (Apokimon, dopaminergic agonist; 0.5 mg/kg; Aguetant), and they were monitored for any rotational behavior postsurgery.^{14,51} A measure of the extent of the 6-OHDA lesion is the number of contralateral rotations a rat may make soon after each injection. The number of rotations of each rat was counted for 10 minutes postinjection^{14,51} the day before surgery (Day -1) and Day 7, Day 14, and Day 21 postsurgery.

Immunohistochemical Analysis

At the end of the experimental period, rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (40 mg/kg). They were then perfused transcardially with phosphate-buffered saline (PBS) followed by 4% buffered paraformaldehyde. The brains were removed and postfixed overnight in the same solution. Next, brains were placed in PBS with the addition of 30% sucrose until the block sank. The forebrain was then sectioned coronally and serially (at 50 μ m) using a freezing microtome. All sections were collected in PBS, then immersed in a solution of PBS and 10% normal mouse serum (M5905 Sigma), and then in PBS and 1% Triton (X100 Sigma) each for approximately 1 hour at room temperature. Sections were then incubated in either anti-tyrosine hydroxylase (TH; 1:500; T8700 Sigma), anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP; 1:500; Z033429-2 Dako), or anti-ionized calcium binding adaptor molecule 1 (IBA1; 1:500; 019-19741 Wako) for 48 hours (at 4°C), followed by biotinylated anti-rabbit IgG for 4 hours and then Extravidin-peroxidase complex for 2 hours (both at room temperature; 1:20; EXTRA3-1KT Sigma). To visualize the bound antibody, sections were reacted in a 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride solution (D3939 Sigma). Sections were mounted onto gelatinized slides, air-dried overnight, dehydrated in ascending alcohols, cleared in Histo-Clear (Sigma), and coverslipped using DPX mounting medium (Sigma). As a rule, forebrain sections (including CPU) were immunostained for TH, while midbrain (including implant site) sections were immunostained for TH, GFAP, or IBA1 or were Nissl-stained with cresyl violet. For controls, sections were processed as described above, except that no primary antibody was used. These control sections were immunonegative.

Statistical Analysis

The number of TH+ cells within the SNc (main body of the nucleus, i.e., ventral tier)^{13,46} was estimated using the optical fractionator method (StereoInvestigator, MBF Science), as outlined previously.^{17,28,32,33,46,47,48,52,53} Briefly, systematic random sampling of sites—with an unbiased counting frame—within defined boundaries of the SNc was undertaken. All cells that came into focus within the frame were counted and at least 7 sites were sampled per section in the SNc. Cell counts were made on the RHS of the brain, the side injected with either 6-OHDA or saline, because most nigral pathways are ipsilateral.³⁸ For group comparisons of cell number, a 1-way ANOVA test was performed (overall comparison of means between groups; F and p values), in conjunction with a post hoc multiple comparison test (comparison of means between pairs of groups; p value) that was incorporated within the software (GraphPad Prism v6).

Results

In the section that follows, the results relating to the apomorphine-induced rotational behavior, the 6-OHDA injection and optical fiber implant sites, together with the number and morphology of SNc cells, will be considered separately.

Apomorphine-Induced Rotational Behavior

No major adverse effects were observed in the rats after surgery for either the implantation of the optical fiber devices or the 6-OHDA lesion. All rats resumed normal activity (eating and grooming) within a few hours after surgery and were never in any visible discomfort during the entire survival period.^{13,16,31,32} There was no obvious impact of NIR on the normal activity of the rats; the activity of NIR-treated rats was not any different from that of untreated rats. In the NIR-treated rats, the NIR filled the cranial cavity, being evident through the biological cement surrounding the LED device, through the skin and hair over the cranium, the auricles, and through the orbit and eyes (Fig. 2D and E). Hence, as with our previous results in mice,³² the intracranially applied NIR was well tolerated by the rats, with no clear deleterious signs.

Figure 3 shows the apomorphine-induced rotational behavior in rats of the different experimental groups. On the day before surgery (Day -1), all the rats in the different groups displayed no rotational behavior after apomorphine injection. In some cases, there was hyperkinetic movement after apomorphine injection, but it soon settled. In the saline group, there was never any apomorphine-induced rotational behavior throughout the 3-week period. In the 6-OHDA group, by contrast, a steady increase in the number of apomorphine-induced rotations, from Day 7 to Day 21, was evident. This indicated the development of a clear functional lesion. In all 6-OHDA-NIR groups, evidence was present of rotational behavior also, but in the 6-OHDA-NIRP and 6-OHDA-NIRC+ groups, it was considerably less than in the 6-OHDA group. This was clearly the case at Day 21, when the differences between the 6-OHDA group and both the 6-OHDA-NIRP ($p < 0.05$) and, in particular, the 6-OHDA-NIRC+ ($p < 0.001$) groups

F. Reinhart et al.

were significant. The fewer rotations in these groups suggested that NIR had reduced the functional lesion generated by 6-OHDA. Similar patterns were not evident for the 6-OHDA-NiRc group, however, that received NIR at a weaker power (Table 1). In this NIR-treated group, the development and number of apomorphine-induced rotations from Day 7 to Day 21 largely followed that apparent in the 6-OHDA group (Fig. 3). Overall, the differences between the 6-OHDA and 6-OHDA-NiR groups did not reach significance at Day 7 (ANOVA: $F = 1.4$, $p = 0.3$) and Day 14 (ANOVA: $F = 2.0$, $p = 1.2$), but did so at Day 21 (ANOVA: $F = 4.1$, $p < 0.01$).

6-OHDA CPU Injection Sites

Figure 4 shows TH-immunostained sections of the CPU on the injected RHS of the saline (Fig. 4A), 6-OHDA (Fig. 4B), and 6-OHDA-NiR (Fig. 4C; 6-OHDA-NiRP) groups. In the saline group, injection sites were characterized by a central core of gliosis, indicating the pipette tract; in the regions immediately surrounding the tract, there was no clear loss of TH immunoreactivity (Fig. 4A). In the 6-OHDA and 6-OHDA-NiR groups (all 6-OHDA-NiR groups showed similar patterns), a comparable arrangement of gliosis indicating pipette tract was also seen, but in these cases, the tract was surrounded by a region devoid of dense TH+ terminations; in this region, there were only a few TH+ axons and terminals seen (Fig. 4B and C). This largely barren, TH- region was due to 6-OHDA toxicity and was similar in the 6-OHDA and 6-OHDA-NiR groups (Fig. 4B and C).

Optical Fiber Midbrain Implant Sites

Figure 5 shows schematic diagrams (Fig. 5A) and a photomicrograph montage (Fig. 5B) of an optical fiber tract through the midbrain. This particular fiber trace was from a rat in the 6-OHDA-NiRP group, but it is typical of the traces we saw in other groups. The implant site in

each rat was close to the midline in the midbrain, traversing the red nucleus and lying close to or within the VTA. The distinct square shape of the optical fiber tip was often identifiable (Fig. 5B).

Figure 6 shows photomicrographs comparing Nissl-stained (Fig. 6A and B), GFAP-immunostained (Fig. 6C and D), and IBA1-immunostained (Fig. 6E and F) cells in regions immediately adjacent to the implant site in saline-sham (Fig. 6A, C, and E) and NiR-treated (Fig. 6B, D, and F) rats. In general, no major differences were found in the organization and morphology of neurons and glial cells near the implant sites in the different rats. Each of the optical fiber tracts and implant sites generated localized gliosis and some neuronal degeneration, but these patterns were the same in all of the rats, regardless of whether there was NiR treatment or not. The only cellular damage evident appeared mechanical, being caused after tissue displacement by the optical fiber itself. In addition, we never saw localized zones of necrosis near the tip of the optical fiber, where the NiR was most intense (Fig. 5B). Finally, there appeared to be no impact of NiR on the cytoarchitecture in regions near the implant site, most notably, the SNc (Fig. 5B).

Number and Morphology of SNc Cells

In this study, we used TH immunocytochemistry to assess patterns of neuroprotection in the SNc. As with many previous studies, we interpreted TH+ cell number after experimental manipulation as an index of cell survival.^{12,28,32,33,40,42,45,52,53} If cells lose TH expression, then they are likely to undergo death subsequently.^{4,22,25} Notwithstanding a small number of cells that may have transient loss of TH expression, a key outcome measure for our study was whether NiR treatment mitigated the loss of TH+ cells caused by the 6-OHDA.^{12,28,32,33,40,42,45,52,53}

Figure 7 shows a graph of the estimated total number of TH+ cells in the SNc of the 5 experimental groups. A

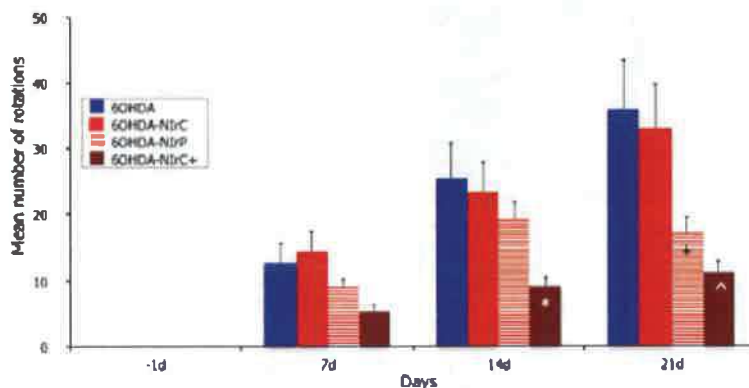


FIG. 3. Graph showing the mean number of apomorphine-induced turns of rats (in 10 mins) in the 6-OHDA, 6-OHDA-NiRP, 6-OHDA-NiRc, and 6-OHDA-NiRc+ groups at 4 time points, 1 day before surgery (Day -1) and Day 7, Day 14, and Day 21 postsurgery. The saline group had no rotational behavior throughout the experimental period (not shown). Symbols adjacent to particular markers represent the level of significant difference from the 6-OHDA group on that day of testing. * $p < 0.001$, * $p < 0.05$. All columns show the mean \pm standard error in each group. Figure is available in color online only.

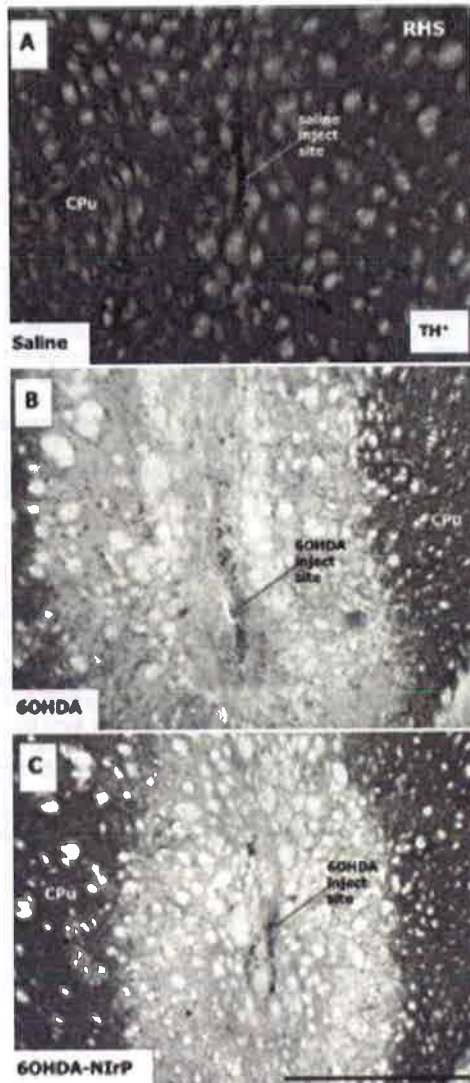


FIG. 4. Photomicrographs of saline and 6-OHDA injection sites on the RHS CPU in the saline (A), 6-OHDA (B), and 6-OHDA-NIrP (C) groups (labeling patterns were similar in the other 6-OHDA-NIr groups, hence not shown). Sections were immunostained for TH, and the saline (A) or 6-OHDA (B and C) injection sites are indicated by arrows. In each 6-OHDA injection site, there was a central core of gliosis indicating the pipette tract, surrounded by a striatal region devoid of rich TH immunostaining (B and C). This non-TH immunostained region was as a result of the 6-OHDA toxicity to the dopaminergic terminals. The injection sites in the 6-OHDA and all 6-OHDA-NIr groups were very similar. In each saline injection site, there was a central core of gliosis and pipette tract, but no surrounding region of non-TH immunostaining (A). All figures are of coronal sections; dorsal to top and lateral to right for RHS images and lateral to left for LHS image. Bar = 1 mm.

clear reduction occurred in the number of TH+ cells in the 6-OHDA group compared with the saline group (approximately 25%; $p < 0.05$). In the 6-OHDA-NIrP group, TH+ cell number was considerably higher than that in the 6-OHDA group (approximately 25%; $p < 0.001$), equivalent to that in the saline group, i.e., pulse delivery of NIR appeared to mitigate the cell loss caused by 6-OHDA toxicity. A comparable mitigation was not, however, evident in the other 6-OHDA-NIr groups; the number of TH+ cells in the 6-OHDA-NIrC and 6-OHDA-NIrC+ groups was similar to that in the 6-OHDA group ($p > 0.05$; Fig. 7). Thus, NIR treatment mitigated TH+ cell loss after 6-OHDA lesion, but only under certain conditions. It was far more effective after pulse delivery (6-OHDA-NIrP group) than after continuous delivery either at the same (6-OHDA-NIrC+ group) or weaker (6-OHDA-NIrC group) NIR power. Overall, when comparing all the groups together, the overall differences in the number of TH+ cells were significant (ANOVA: $F = 3.2$, $p = 0.02$).

Figure 8 shows photomicrographs of TH+ cells in the SNc of the saline (Fig. 8A), 6-OHDA (Fig. 8B; similar patterns were seen in the 6-OHDA-NIrC and 6-OHDA-NIrC+ groups), and 6-OHDA-NIrP (Fig. 8C) groups. Although the morphology of TH+ cells was similar in all the groups, the 6-OHDA (and 6-OHDA-NIrC and 6-OHDA-NIrC+) group had fewer cells and more degenerating axonal profiles (Fig. 8B arrow) than the saline and 6-OHDA-NIrP groups had.

Discussion

We have shown that intracranially delivered NIR mitigated behavioral deterioration and the loss of midbrain dopaminergic cells in 6-OHDA-lesioned rats. Quite strikingly, NIR-induced mitigation of dopaminergic cell loss did not account for all the behavioral improvements; the NIR applications that reduced apomorphine-induced rotations did not all necessarily generate a greater number of surviving dopaminergic cells. This discrepancy will be the major focus of the discussion below. First, we will consider the feasibility of the midbrain as a target for optical fiber implants.

Feasibility of a Midbrain Target Site for Intracranial Delivery of NIR

One of our major aims was to explore the feasibility of the midbrain as an implant site. Our previous study in mice targeted the lateral ventricle,³² but for our planned primate endeavors, we hope to target a midline region of the midbrain. This region was chosen because it is near the SNc, and it provides equal doses of NIR to the nucleus of the left and right side. Our results show that, after 23 days of pulse or continuous NIR treatment of the midbrain, there were no adverse effects on the well-being of the rats that, once they recovered from surgery, were never observed to be in any discomfort. Furthermore, our immunohistochemical and histological results revealed little evidence of tissue necrosis or gliosis caused by the intracranially delivered NIR. In each case, the tissue damage observed appeared mechanical, being caused by the optical fiber itself. Taken together, these data indicated that the midbrain is indeed

F. Reinhart et al.

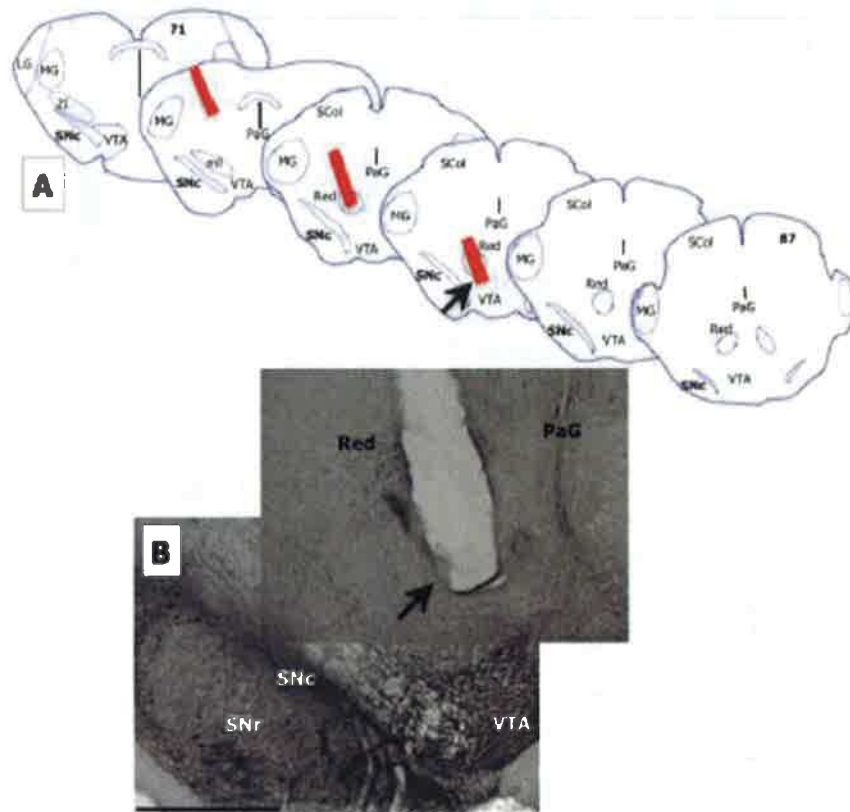


FIG. 5. A: Schematic diagrams of coronal sections, across the rostrocaudal axis (from left to right; plates 71–87 of rat atlas),³⁸ from where our stereological analysis was undertaken. The red rectangles indicate the typical extent and location of the majority of our implant sites within the midbrain. This case was from the 6-OHDA–NirP group; implant sites from the other groups were similar. B: Photomicrograph montage of a typical implant site from TH+ immunostained sections. This case was from the 6-OHDA–NirP group and is the same animal as depicted in (A). The arrows in both A and B indicate the approximate region where the photomicrographs in Fig. 6 were taken. Sections are of coronal sections; in B, lateral to left, dorsal to top. MG = medial geniculate nucleus; LG = lateral geniculate nucleus; PaG = periaqueductal gray matter; SCol = superior colliculus. Bar = 1 mm. Figure is available in color online only.

a feasible implant site, and when applied at the therapeutic doses we used (i.e., 0.16 mW power), the intracranially delivered NIR generated no adverse effect on brain tissue or well-being of the rats. Previous studies have reported that adverse effects may be detected if power output is in a range well over what is needed for neuroprotection, perhaps 10 times more.^{20,25}

Impact of Nir Treatment on Behavior and Cell Survival in 6-OHDA-Lesioned Rats

Many previous studies have used apomorphine-induced turning behavior as a means of assessing the extent of unilateral 6-OHDA lesions in either the striatum or medial forebrain bundle; the larger the lesion, the more turning behavior is evident.^{5,6,13,14,20,21,41,50,51} In this context, several studies have used this behavioral test to measure the de-

gree of neuroprotection, whether a given neuroprotective agent reduces the number of apomorphine-induced turns in 6-OHDA-lesioned rats.^{1,19,26,30} In this study, we tested various NIR applications in 6-OHDA-lesioned rats, using 2 modes of NIR delivery (pulse and continuous), powers (333 nW and 0.16 mW), and total doses (634 mJ or 304 J). We found that the stronger NIR power, regardless of delivery mode or total dose, generated a clear reduction in apomorphine-induced rotations in 6-OHDA-lesioned rats (6-OHDA–NirP and 6-OHDA–NirC+ groups); by contrast, no reduction was evident with the weaker power (6-OHDA–NirC group). It is likely that the NIR signal issued by the weaker power did not penetrate the short distance to the SNc and elicit a functional response, while the stronger power did.

The most reasonable explanation for these behavioral

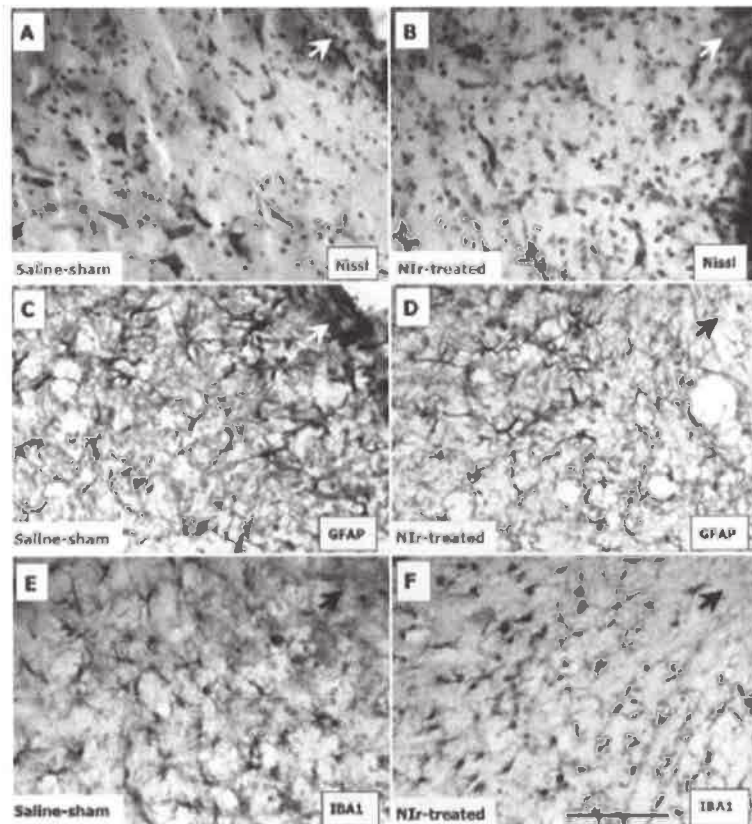


FIG. 6. Nissl-stained (A and B), GFAP+ (C and D), and IBA+ (E and F) cells in regions adjacent to optical fiber implant sites in the midbrain of rats in the saline (A, C, and E) and NIR-treated (B, D, and F) cases. The region from which these photomicrographs were taken is indicated by arrows in Fig. 5. The white arrows indicate the edge of the implant site. Each optical fiber implant site was associated with gliosis; there were no obvious differences between the saline-sham (non-NIR) and the NIR-treated cases. The gliosis around the implant site appeared due to mechanical damage caused by the optical fiber itself, with no clear signs of NIR toxicity; gliosis was evident along the length of the optical fiber, well away from the fiber tip, where the NIR was most intense. The NIR-treated case shown here was from a rat in the 6-OHDA-NIR+ group, representative of all other 6-OHDA-NIR groups. All figures are of coronal sections, dorsal to top and medial to left. Bar = 100 μ m.

improvements at the stronger NIR power would be that they reflected a neuroprotection of dopaminergic cells, manifesting in a preservation of functional activity and dopaminergic transmission through the striatum.²⁷ This neuroprotection would have addressed the asymmetry of striatal transmission after a 6-OHDA lesion and contributed to the reduction in turning behavior.^{1,17,24,30} Following this thinking, neuroprotection would have been expected in the groups that had improvements in behavior, namely the 6-OHDA-NIRP and 6-OHDA-NIRC+ groups, but not in the 6-OHDA-NIRC group, the group that had no behavioral improvement. Somewhat surprisingly, however, this was not entirely the case. Although neuroprotection was evident in the 6-OHDA-NIRP group, and not in the 6-OHDA-NIRC group, it was not evident in the 6-OHDA-NIRC+

group, the group that displayed the clearest improvement in behavior (Fig. 3). Hence, NIR-induced neuroprotection could not account for all the observed behavioral improvements; there may have been other "symptomatic" elements contributing to the improvements in these cases, not just an increase in cell survival. In essence, these results indicated that patterns of cell survival might not necessarily be the most important element of all behavioral changes. The sources of these symptomatic elements are not known, but there are several possibilities. NIR treatment may have stimulated the activity of the dopaminergic cells, in an attempt to maintain dopaminergic transmission through the striatum and to mask the cellular deficit. This effect may have been heightened in the remaining cells in the 6-OHDA-NIRC+ group to compensate for the smaller size of the

F. Reinhart et al.

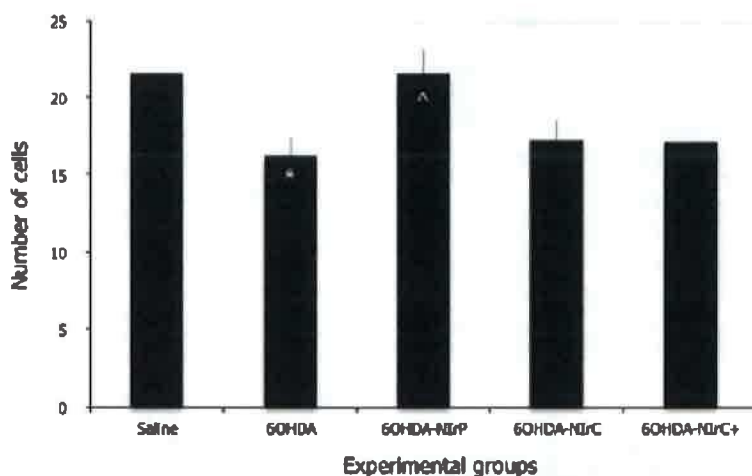


FIG. 7. Graphs showing the number of TH+ cells in each of the experimental groups. Numbers represent counts from the RHS 6-OHDA-lesioned side. The symbols within the columns of the 6-OHDA group represent levels of significant difference from the saline group, while symbols within the columns of any of the 6-OHDA-NiR groups represent significant differences in the 6-OHDA group. [^] p < 0.001, * p < 0.05. All columns show the mean ± standard error in each group.

surviving dopaminergic cell population. Alternatively, NiR treatment may have stimulated the activity of nondopaminergic cell groups in the brain, such as those involved in generating movement (e.g., motor cortex, pedunculopontine tegmental nucleus).³⁸ These structures are certainly close enough to the rat midbrain to be influenced by the NiR signal issued from the optical fiber device; previous studies have reported that the NiR signal can be measured approximately 30 mm from the source (see above), and the rat motor cortex (5–10 mm) and pedunculopontine tegmental nucleus (approximately 1 mm) are well within that distance from the midbrain.³⁹ A clear challenge for future studies would be to reveal the source of these symptomatic elements, whether dopaminergic or nondopaminergic, and if they are sustainable, in the longer-term, without any underlying neuroprotection (i.e., in the 6-OHDA-NiR/C+ group).

Previous studies have reported that NiR stimulates mitochondria by increasing ATP content and electron transfer in the respiratory chain through activation of photoacceptors (e.g., cytochrome oxidase), together with modulating reactive oxygen species and the induction of various transcription factors.^{24,11,15,16,19,20,47,55} In this study, NiR may have induced such factors to 1) protect cells against toxic insult, leading to a greater cell survival, or 2) stimulate the functional activity of cells, leading subsequently to improvements in behavior, or both 1 and 2. We showed that the pulse mode was more effective in generating both neuroprotection and improved behavior (6-OHDA-NiR/P group), while the continuous mode was effective in improving behavior only (6-OHDA-NiR/C+ group). The reason why the continuous mode did not induce neuroprotection is not known, but we suggest that it was related to the high total dose of NiR delivered in this group (304 J); this higher dose may have been within the range for inducing an increase

in functional activity but not for inducing neuroprotection, while the lower dose (634 mJ) may have been within the range to induce both beneficial effects. NiR has been shown to be most effective in intermediate doses, but not at very low or extremely high doses, the so-called "hormetic effect."^{17,19,47} This effect may help explain some of our results here. There may be different hormetic dose-response curves for neuroprotection and functional activity; the curve-inducing cell repair mechanisms and neuroprotection may drop off more quickly with increasing NiR dosage than the curve for activating functional activity, hence contributing to the differences in beneficial effects.⁴⁸ This issue of different biological effects by the same agent at different doses is worthy of further study.

In summary, if given at sufficient power to penetrate brain tissue and reach the SNc (0.16 mW), a pulse delivery of NiR that did not result in a very high total dose (e.g., 634 mJ), generated both neuroprotection and behavioral (functional) improvements. If the NiR power delivered was very weak (e.g., 333 nW) or if it manifested in too high a dose (e.g., 304 J), then not all the beneficial effects (neuroprotection and behavior) were evident.

Conclusions

We have shown that, as in the MPTP-treated mouse model,²² intracranially delivered NiR was well tolerated by the animals, did not cause tissue toxicity, improved behavior, and was neuroprotective in the 6-OHDA-lesioned rat model. These positive findings in a second animal model of Parkinson's disease provide further encouragement for a positive outcome in humans. Our results show that protection of dopaminergic cells did not account for all the observed behavioral improvements, and that different applications of NiR generated different beneficial out-

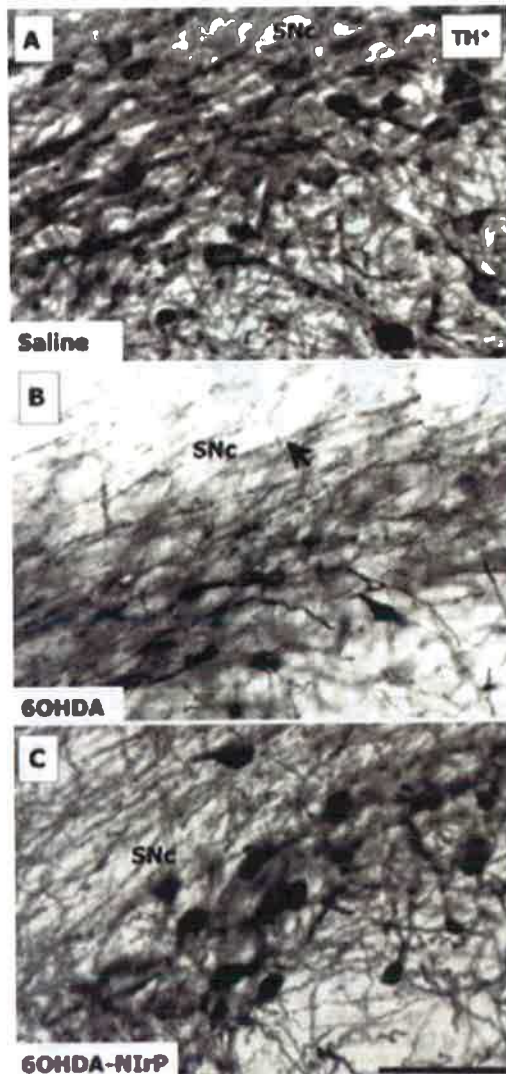


FIG. 8. Photomicrographs of TH+ cells in the saline (A), 6-OHDA (B), and 6-OHDA-NirP (C) groups on the RHS (6-OHDA- or saline-injected sides). Labeling patterns on the LHS for the 6-OHDA and all 6-OHDA-Nir groups were similar to those in the saline group, while patterns on the RHS in the 6-OHDA group were similar to those observed in the 6-OHDA-NirC+ and 6-OHDA-NirC groups (not shown). Arrow in (B) indicates degenerating axons. All figures are of coronal sections; dorsal to top and lateral to right (B, D, and F) and to left (A, C, and E). Bar = 100 μ m.

comes. A careful titration of Nir application would hence be essential when considering use in humans, establishing a power, mode of delivery, and total dose that generates improvements both in behavior and neuroprotection.

These early findings provide much encouragement for the future.

Acknowledgments

We are forever grateful to the Michael J. Fox Foundation, Fondation Philanthropique Edmond J. Safra, France Parkinson and the French National Research Agency (ANR Carnot Institute), Tenix Corp., and the Saltin family for funding this work. D.M.J. is an Early Career Fellow of the NHMRC (Australia). We thank Sharon Spana, Guillaume Barboux, Clément Perrin, Cyril Zenga, Diane Agay, and Myliène D'Orchymont for excellent technical assistance.

References

- Baluchnejadmojarad T, Roghani M, Nadoushan MRJ, Bagheri M. Neuroprotective effect of genistein in 6-hydroxydopamine hemi-parkinsonian rat model. *Phytother Res* 23:132-135, 2009
- Bergman H, Deuschl G. Pathophysiology of Parkinson's disease: from clinical neurology to basic neuroscience and back. *Mov Disord* 17 (Suppl 3):S28-S40, 2002
- Bezdard E, Yue Z, Kirik D, Spillantini MG. Animal models of Parkinson's disease: limits and relevance to neuroprotection studies. *Mov Disord* 28:61-70, 2013
- Bjorklund A, Rosenblad C, Winkler C, Kirik D. Studies on neuroprotective and regenerative effects of GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 4:186-200, 1997
- Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V, Przedborski S. Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J Biomed Biotechnol* 2012:845618, 2012
- Bové J, Perier C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience* 211:51-76, 2012
- Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng* 40:516-533, 2012
- DeSmet K, Buchmann E, Henry M, Wong-Riley M, Eells J, Verhoeve J, et al. Near-infrared light as a possible treatment option for Parkinson's disease and laser eye injury. *Proc SPIE* 7165:716503, 2009
- DeSmet KD, Paz DA, Corry JJ, Eells JT, Wong-Riley MTT, Henry MM, et al. Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation. *Photomed Laser Surg* 24:121-128, 2006
- De Taboada L, Yu J, El-Amouri S, Gattoni-Celli S, Richieri S, McCarthy T, et al. Transcranial laser therapy attenuates amyloid- β peptide neuropathology in amyloid- β protein precursor transgenic mice. *J Alzheimers Dis* 23:521-535, 2011
- Eells JT, Wong-Riley MTT, Verhoeve J, Henry M, Buchman EV, Kane MP, et al. Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. *Mitochondrion* 4:559-567, 2004
- El Massri N, Johnstone DM, Peoples CL, Moro C, Reinhart F, Torres N, et al. The effect of different doses of near infrared light on dopaminergic cell survival and gliosis in MPTP-treated mice. *Int J Neurosci* [epub ahead of print], 2015
- Fitzpatrick E, Ashkan K, Wallace BA, Benabid A-L, Mitrofanis J. Differential survival patterns among midbrain dopaminergic cells of MPTP-treated monkeys and 6-OHDA-lesioned rats. *Anat Embryol (Berl)* 210:101-123, 2005
- Fujita M, Nishino H, Kumazaki M, Shimada S, Tohyama M, Nishimura T. Expression of dopamine transporter mRNA and its binding site in fetal nigral cells transplanted into the striatum of 6-OHDA lesioned rat. *Brain Res Mol Brain Res* 39:127-136, 1996
- Gonzalez-Lima F, Barrett DW. Augmentation of cognitive brain functions with transcranial lasers. *Front Syst Neurosci* 8:36, 2014

F. Reinhart et al.

16. Hamblin MR, Demidova TN: Mechanisms of low level light therapy. *Proc SPIE* 6140:614001, 2006
17. Han B, Hu J, Shen J, Gao Y, Lu Y, Wang T: Neuroprotective effect of hydroxysafflor yellow A on 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease in rats. *Eur J Pharmacol* 714:83–88, 2013
18. Heise CE, Mitrofanis J: Reduction in parvalbumin expression in the zona incerta after 6-OHDA lesion in rats. *J Neurocytol* 34:421–434, 2005
19. Huang YY, Chen ACH, Carroll JD, Hamblin MR: Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose Response* 7:358–383, 2009
20. Ilic S, Leichter S, Streeter J, Oron A, DeTaboada L, Oron U: Effects of power densities, continuous and pulse frequencies, and number of sessions of low-level laser therapy on intact rat brain. *Photomed Laser Surg* 24:458–466, 2006
21. Ivandic BT, Ivandic T: Low-level laser therapy improves vision in patients with age-related macular degeneration. *Photomed Laser Surg* 26:241–245, 2008
22. Jackson-Lewis V, Jakowec M, Burke RE, Przedborski S: Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegeneration* 4:257–269, 1995
23. Jankovic J: Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79:368–376, 2008
24. Jankovic J, Poewe W: Therapies in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 25:433–447, 2012
25. Javoy-Agid F, Hirsch EC, Dumas S, Duyckaerts C, Mallet J, Agid Y: Decreased tyrosine hydroxylase messenger RNA in the surviving dopamine neurons of the substantia nigra in Parkinson's disease: an in situ hybridization study. *Neuroscience* 38:245–253, 1990
26. Joghataie MT, Roghani M, Negahdar F, Hashemi L: Protective effect of caffeine against neurodegeneration in a model of Parkinson's disease in rat: behavioral and histochemical evidence. *Parkinsonism Relat Disord* 10:465–468, 2004
27. Johnstone D, Coleman K, Moro C, Torres N, Eells J, Baker GE, et al: The potential of light therapy in Parkinson's disease. *ChronoPhysiology Therapy* 4:1–14, 2014
28. Johnstone DM, el Massri N, Moro C, Spana S, Wang XS, Torres N, et al: Indirect application of near infrared light induces neuroprotection in a mouse model of parkinsonism—an abscopal neuroprotective effect. *Neuroscience* 274:93–101, 2014
29. Liang HL, Whelan HT, Eells JT, Wong-Riley MTT: Near-infrared light via light-emitting diode treatment is therapeutic against rotenone- and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity. *Neuroscience* 153:963–974, 2008
30. Liu X, Shao R, Li M, Yang G: Edaravone protects neurons in the rat substantia nigra against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress damage. *Cell Biochem Biophys* 70:1247–1254, 2014
31. Luquin N, Mitrofanis J: Does the cerebral cortex exacerbate dopaminergic cell death in the substantia nigra of 6-OHDA-lesioned rats? *Parkinsonism Relat Disord* 14:213–223, 2008
32. Moro C, Massri NE, Torres N, Ratel D, De Jaeger X, Chabrol C, et al: Photobiomodulation inside the brain: a novel method of applying near-infrared light intracranially and its impact on dopaminergic cell survival in MPTP-treated mice. *J Neurosurg* 120:670–683, 2014
33. Moro C, Torres N, El Massri N, Ratel D, Johnstone DM, Stone J, et al: Photobiomodulation preserves behaviour and midbrain dopaminergic cells from MPTP toxicity: evidence from two mouse strains. *BMC Neurosci* 14:40, 2013
34. Muli KA, Gopalakrishnan S, Meyer SL, Eells JT, Lyons JA: Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice by photobiomodulation induced by 670 nm light. *PLoS One* 7:e30655, 2012
35. Olanow CW, Kiebertz K, Schapira AHV: Why have we failed to achieve neuroprotection in Parkinson's disease? *Ann Neurol* 64 (Suppl 2):S101–S110, 2008
36. Oron A, Oron U, Chen J, Eilam A, Zhang C, Sadeh M, et al: Low-level laser therapy applied transcranially to rats after induction of stroke significantly reduces long-term neurological deficits. *Stroke* 37:2620–2624, 2006
37. Oron A, Oron U, Streeter J, de Taboada L, Alexandrovich A, Trembovler V, et al: low-level laser therapy applied transcranially to mice following traumatic brain injury significantly reduces long-term neurological deficits. *J Neurotrauma* 24:651–656, 2007
38. Parent A. *Carpenter's Human Neuroanatomy*, ed 9. Philadelphia: Williams and Wilkins, 1996
39. Paxinos G, Watson CR: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, ed 5. Amsterdam: Elsevier, 2005
40. Peoples C, Spana S, Ashkan K, Benabid AL, Stone J, Baker GE, et al: Photobiomodulation enhances nigral dopaminergic cell survival in a chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 18:469–476, 2012
41. Pfaller B, Benazzouz A, Benabid AL: Subthalamic nucleus lesion in rats prevents dopaminergic nigral neuron degeneration after striatal 6-OHDA injection: behavioural and immunohistochemical studies. *Eur J Neurosci* 8:1408–1414, 1996
42. Purushothuman S, Nandasena C, Johnstone DM, Stone J, Mitrofanis J: The impact of near-infrared light on dopaminergic cell survival in a transgenic mouse model of parkinsonism. *Brain Res* 1838:61–70, 2013
43. Quirk BJ, DeSmet KD, Henry M, Buchmann E, Wong-Riley M, Eells JT, et al: Therapeutic effect of near infrared (NIR) light on Parkinson's disease models. *Front Biosci (Elite Ed)* 4:818–823, 2012
44. Quirk BJ, Torbey M, Buchmann E, Verma S, Whelan HT: Near-infrared photobiomodulation in an animal model of traumatic brain injury: improvements at the behavioral and biochemical levels. *Photomed Laser Surg* 30:523–529, 2012
45. Reinhart F, Massri NE, Darlot F, Torres N, Johnstone DM, Chabrol C, et al: 810 nm near-infrared light offers neuroprotection and improves locomotor activity in MPTP-treated mice. *Neurosci Res* 92:86–90, 2015
46. Rinne JO: Nigral degeneration in Parkinson's disease. *Mov Disord* 8 (Suppl 1):S31–S35, 1993
47. Rojas J, Gonzalez-Lima F: Low-level light therapy of the eye and brain. *Eye Brain* 3:49–67, 2011
48. Romeo S, Viaggi C, Di Camillo D, Willis AW, Lozzi L, Rocchi C, et al: Bright light exposure reduces TH-positive dopamine neurons: implications of light pollution in Parkinson's disease epidemiology. *Sci Rep* 3:1395, 2013
49. Sano M: Cardioprotection by hormetic responses to aldehyde. *Circ J* 74:1787–1793, 2010
50. Schober A: Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res* 318:215–224, 2004
51. Schwarting RKW, Huston JP: The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol* 50:275–331, 1996
52. Shaw VE, Spana S, Ashkan K, Benabid A-L, Stone J, Baker GE, et al: Neuroprotection of midbrain dopaminergic cells in MPTP-treated mice after near-infrared light treatment. *J Comp Neurol* 518:25–40, 2010
53. Wallace BA, Ashkan K, Heise CE, Foote KD, Torres N, Mitrofanis J, et al: Survival of midbrain dopaminergic cells after lesion or deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in MPTP-treated monkeys. *Brain* 130:2129–2145, 2007
54. Whelan H, DeSmet K, Buchmann E, Henry M, Wong-Riley M, Eells J, et al: Harnessing the cell's own ability to repair and prevent neurodegenerative disease. *SPIE Newsroom* 2008:1–3, 2008

55. Ying R, Liang HL, Whelan HT, Ellis JT, Wong-Riley MTT. Pretreatment with near-infrared light via light-emitting diode provides added benefit against rotenone- and MPP+-induced neurotoxicity. *Brain Res* 1243:167-173, 2008

Disclosures

Dr. Stone has ownership of CSCM Pty Ltd.

Author Contributions

Conception and design: Mitrofanis, Reinhart, Chabrol, Benabid,

Moro. Acquisition of data: Mitrofanis, Reinhart, El Massri, Chabrol, Cretallaz, Torres, Darlot, Costecalde, Moro. Analysis and interpretation of data: Mitrofanis, Reinhart, El Massri, Chabrol, Benabid, Moro. Drafting the article: Mitrofanis. Critically revising the article: Mitrofanis, Reinhart, Cretallaz, Johnstone, Stone, Benabid, Moro. Reviewed submitted version of manuscript: all authors. Approved the final version of the manuscript on behalf of all authors: Mitrofanis. Statistical analysis: Mitrofanis. Study supervision: Mitrofanis, Benabid, Moro.

Correspondence

John Mitrofanis, Department of Anatomy, Anderson-Stuart Bldg. F13, University of Sydney, Sydney, NSW 2006, Australia. email: john.mitrofanis@sydney.edu.au

En résumé, notre étude montre que :

- 1- Une illumination intracérébrale à 670 nm réduit le comportement rotatoire sous apomorphine de rats 6-OHDA.
- 2- Une illumination intracérébrale à 670 nm induit une protection des neurones dopaminergiques de la substance noire.
- 3- Une illumination discontinue (90 s, 2 fois par jour) semble plus efficace qu'une illumination continue (voir discussion générale).
- 4- Une puissance optique de 333 nW en sortie d'implant ne semble pas suffisante pour induire un effet thérapeutique, tandis que la quantité globale d'énergie délivrée ne semble pas avoir d'impact sur l'efficacité du traitement, dans la gamme testée.

V.3. THEME 3 : OPTIMISATION DU POTENTIEL NEUROPROTECTEUR DE LA LUMIERE PROCHE INFRAROUGE DANS LA MALADIE DE PARKINSON

Le nombre croissant d'études démontrant sur modèles animaux le potentiel neuroprotecteur de la lumière proche infrarouge contre la maladie de Parkinson^{146,191,191,195,198-200,238,239}, couplé à nos propres résultats présentés section V.2 sont des arguments forts en faveur d'un transfert du projet chez l'humain. Toutefois, avant d'envisager un essai clinique, il est essentiel de :

- 1- Mieux connaître les paramètres d'illumination qui influent sur l'efficacité thérapeutique de notre stratégie neuroprotectrice.
- 2- Comprendre *comment* ces paramètres influent sur cette efficacité thérapeutique.

Nous avons identifié 3 paramètres majeurs pouvant influencer le potentiel thérapeutique :

- 1- La longueur d'onde utilisée.
- 2- La fenêtre temporelle de traitement.
- 3- La quantité d'énergie délivrée.

Nous avons abordé ces paramètres à travers la question de travail suivante :

Comment optimiser l'illumination proche infrarouge de sorte à obtenir le meilleur potentiel neuroprotecteur possible ?

C'est avec cette question à l'esprit que les sections suivantes sont à considérer.

Notons enfin que toutes les valeurs d'efficacité thérapeutique annoncées dans les sections suivantes ont été calculées de la façon suivante :

$$\frac{\text{Perf groupe d'intérêt} - \text{Perf groupe MPTP}}{\text{Perf groupe contrôle} - \text{Perf groupe MPTP}}$$

Avec Perf = Activité motrice (étude comportementale), ou nombre de cellules TH⁺ (étude histologique). Perf groupe MPTP = Efficacité 0 (pas de traitement). Perf groupe contrôle = Efficacité 100 % (animaux non malades).

V.3.1. Influence de la longueur d'onde : comparaison et association entre 670 et 810 nm

Dans la section V.2, nous avons démontré le potentiel neuroprotecteur d'une illumination à 670 nm, ou à 810 nm. Toutefois, dans l'objectif d'apporter une thérapeutique la plus efficace possible aux patients, il nous semble nécessaire d'effectuer une comparaison entre ces deux longueurs d'onde. Aucune étude, à notre connaissance, ne les compare sur un modèle *in vivo* de la maladie. La présente campagne expérimentale a pour questions de travail :

- 1- Une des deux longueurs d'ondes est-elle à favoriser ?
- 2- L'association des deux peut-elle avoir un effet bénéfique sur la neuroprotection.

V.3.1.1. Analyse comportementale

La Figure V-19 montre l'activité motrice des souris MPTP, en fonction des traitements lumineux reçus (n = 12 par groupe).

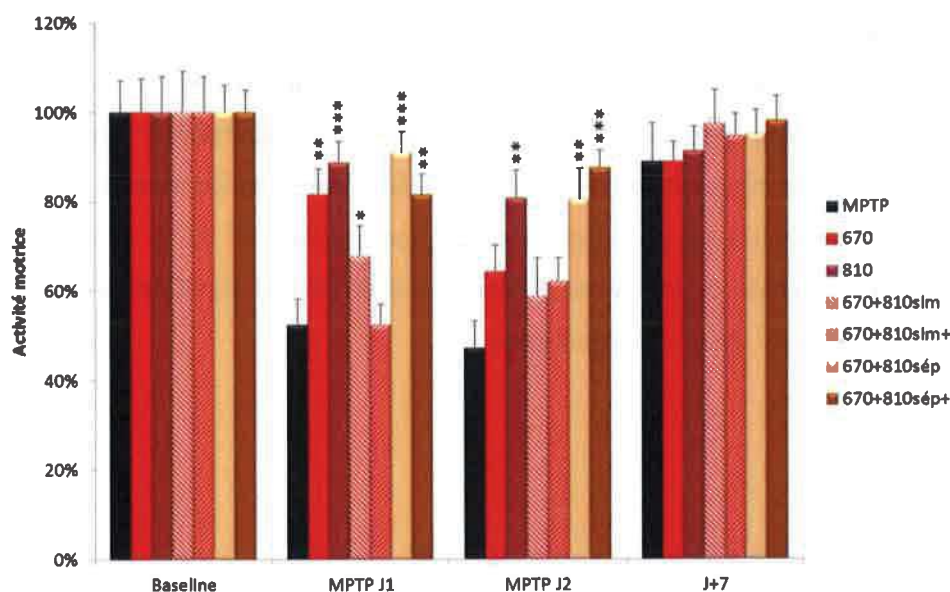


Figure V-19 : Comparaison de l'activité motrice des souris MPTP, en fonction du traitement lumineux reçu. Groupes 670+810sim et sim⁺ : illumination simultanée aux deux longueurs d'onde. Groupes 670+810sep et sep⁺ : illumination à une longueur d'onde, puis à l'autre. Statistiques : * = p < 0,05 ; ** = p < 0,01. *** = p < 0,001 par rapport au MPTP.

Le groupe MPTP (pas d'illumination), présente une forte diminution de l'activité motrice après la première injection de MPTP (47 % de perte) ; cette activité reste basse après la seconde injection de MPTP (53 % de perte par rapport à la ligne de base), puis, une semaine plus tard, revient à +/- 100 %. Cette dynamique de perte motrice après injection de MPTP, puis de récupération spontanée, progressive en une semaine est classique du modèle MPTP que nous utilisons.

Nous avons considéré deux premiers groupes d'intérêt : 670 et 810 nm (puissance optique délivrée pour chaque groupe $P = 30$ mW, durée de l'illumination $D_u = 90$ s). Par rapport au groupe MPTP contrôle, les deux groupes 670 nm et 810 nm présentent une activité motrice préservée, respectivement de 61 % ($p < 0,01$) et 76 % ($p < 0,001$) après la première injection, et de 32 % ($p : NS$) et 63 % ($p < 0,01$) après la seconde. Toutefois, nos conditions expérimentales ne permettent pas de mettre en évidence une différence d'effet entre les groupes 670 et 810.

Les groupes 670+810sim et 670+810sim⁺ reçoivent chacun une double illumination à 670 et 810 nm ; 670+810sim : puissance optique globale délivrée = P , 670+810sim⁺ : puissance optique globale délivrée = $2P$. L'illumination simultanée à 670 et 810 nm n'améliore pas significativement l'activité motrice des souris, sauf dans le groupe 670+810sim, après la première injection de MPTP (amélioration ; 32 %, $p = 0,044$). L'augmentation de la puissance optique délivrée (670+810sim⁺) n'induit pas d'amélioration motrice par rapport au groupe MPTP.

Les groupes 670+810sép et 670+810sép⁺ correspondent à une illumination à 670 nm et 810 nm, en décalé (d'abord l'une, puis l'autre) ; 670+810sép : durée globale d'illumination = D_u , 670+810sép⁺ : durée globale d'illumination = $2D_u$. Durée d'espacement : 0 s. Les groupes 670+810sép et 670+810sép⁺ présentent une activité motrice significativement supérieure au groupe MPTP, respectivement 81 % ($p < 0,001$) et 61 % ($p < 0,01$) d'amélioration après la première injection de MPTP, ainsi qu'après la seconde injection avec respectivement 63 % ($p < 0,01$) et 76 % ($p < 0,001$). Il n'est pas possible de mettre en évidence une différence significative entre les groupes 670+810sép et 670+810sép⁺ dans cette expérience.

V.3.1.2. Analyse histologique

La Figure V-20 montre un comptage des cellules dopaminergiques TH⁺ dans la SNc des différents groupes de notre étude.

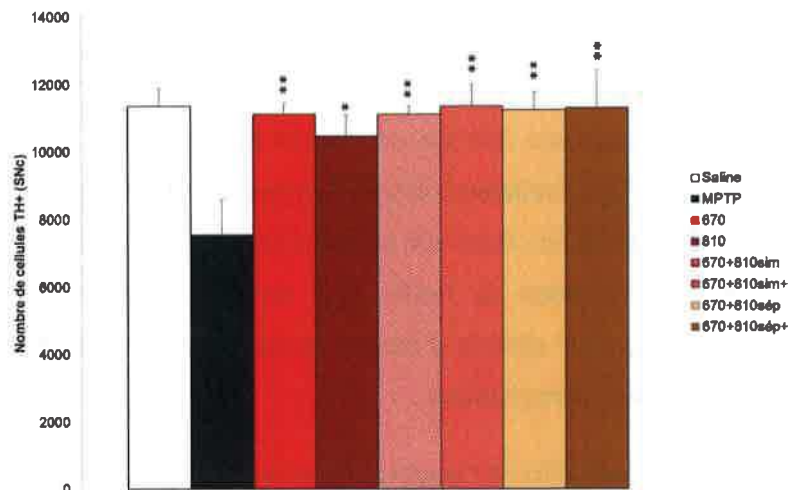


Figure V-20 : Comparaison du nombre de cellules TH⁺, en fonction du traitement lumineux reçu. Groupes 670+810sim et sim⁺ : illumination simultanée aux deux longueurs d'onde. Groupes 670+810sep et sep⁺ : illumination à une longueur d'onde, puis à l'autre. Statistiques : * = p < 0,05 ; ** = p < 0,01 par rapport au MPTP.

En premier lieu, on note une diminution significative du nombre de cellules TH⁺ dans le groupe MPTP par rapport au groupe Saline (44 % de perte, p<0,01). D'autre part, il n'existe aucune différence entre les différents groupes illuminés, quels que soient les paramètres d'illumination utilisés. On note, pour chacun d'eux, une amélioration d'environ 47 % (p<0,01, sauf pour 810 nm, p<0,05) du nombre de cellules TH⁺ présentes dans la substance noire.

En résumé, nous n'avons pas pu déterminer si l'une des deux longueurs d'onde 670 ou 810 nm présentait un avantage thérapeutique par rapport à l'autre. Nous n'avons pas pu, dans nos conditions expérimentales, et avec le modèle MPTP utilisé, démontrer la pertinence d'un cumul des deux longueurs d'onde.

V.3.2. Influence de la fenêtre temporelle de traitement sur l'efficacité thérapeutique : pré-/post-traitement

Les objectifs de cette étude sont les suivants :

- 1- Déterminer si une illumination appliquée avant l'intoxication au MPTP (prétraitement) peut présenter un potentiel neuroprotecteur dans notre modèle. Il est également question d'entamer la caractérisation de la durée d'action de la lumière proche infrarouge, appliquée selon notre paradigme de 2 illuminations par jour.
- 2- Confirmer les résultats obtenus par Peoples et al¹⁶⁴ sur le potentiel thérapeutique d'une traitement tardif, mais cette fois sur un modèle aigu de la maladie. Indirectement, les résultats obtenus en post-traitement éclairciront nos connaissances sur la vitesse d'action d'une illumination à 670 nm, et sur son potentiel symptomatique.
- 3- Continuer la caractérisation de l'effet dose entamé sur le rat 6-OHDA, avec une modulation de la quantité globale d'énergie optique reçue par les animaux, et l'effet de celle-ci sur le potentiel thérapeutique.

Le présent manuscrit est actuellement soumis à la revue BMC Neuroscience.

The behavioural and neuroprotective effects of near infrared light (670nm) when applied at different stages in relation to MPTP insult

| | | |
|--------------------|--|--|
| Florian Reinhart | florian.reinhart@cea.fr | CLINATEC, EJ Safra Centre, CEA, LETI, University of Grenoble Alpes F38000 France |
| Nabil El Massri | nabil.elmassri@sydney.edu.au | Dept of Anatomy F13, University of Sydney, 2006, Australia |
| Daniel M Johnstone | daniel.johnstone@sydney.edu.au | Dept of Physiology F13, University of Sydney, 2006, Australia |
| Jonathan Stone | jonathan.stone@sydney.edu.au | Dept of Physiology F13, University of Sydney, 2006, Australia |
| John Mitrofanis | john.mitrofanis@sydney.edu.au | Dept of Anatomy F13, University of Sydney, 2006, Australia |
| Alim-Louis Benabid | alimlouis@sfr.fr | CLINATEC, EJ Safra Centre, CEA, LETI, University of Grenoble Alpes F38000 France |
| Cécile Moro | cecile.moro@cea.fr | CLINATEC, EJ Safra Centre, CEA, LETI, University of Grenoble Alpes F38000 France |
| Manuscript | ? text words, ? pages, 5 figures | |
| Running Head | Near-infrared light treatment in MPTP-treated mice | |
| Key Words | Parkinson's disease, photobiomodulation, substantia nigra, open-field test | |
| Correspondence | Mitrofanis | |

ABSTRACT

We examined the patterns of behaviour and neuroprotection when near-infrared light (NIR) was applied either before (pre-), at the same time (simultaneous-) or after (post-treatment) 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) insult. Mice received MPTP injections (total of 50mg/kg) and, at various stages in relation to these injections, extracranial application of NIR. Locomotor activity was tested with an open-field test and brains were processed for immunohistochemistry and dopaminergic cell number was estimated using stereology. Our results showed that regardless of when NIR was applied, either before, at the same time or after MPTP insult, clinical impairment was reduced by a similar magnitude. The beneficial effect of NIR was fast-acting (within minutes) and long-lasting (for several days). Our cellular analysis revealed a substrate for these behavioural patterns. The NIR-treated MPTP groups had more dopaminergic cells than the MPTP group; further, there was no indication that a particular combination of NIR treatment and MPTP injection resulted in a higher number of cells. In summary, our results revealed a broad therapeutic window of NIR application in relation to the stage of toxic insult, that NIR was fast-acting and long-lasting.

INTRODUCTION

There is an ever increasing need to develop neuroprotective approaches that help slow, or even stop, the degeneration of brain cells in a number of conditions, from Parkinson's to Alzheimer's disease and from macular degeneration to motor neurone disease. In Parkinson's disease for example, although there are very good treatments that offer symptomatic relief (eg, dopamine drug therapy), none arrest the pathology effectively; the key midbrain dopaminergic cells continue to die during the course of treatment (Olanow et al 2008; Bezdard et al 2012; Jankovic and Poewe 2012; Schapira et al 2014). Hence, when an agent is reported to offer neuroprotection to these vulnerable cells, particularly across a number of animal models of the disease, one has a sense of encouragement. Near infrared light (NIR) therapy is one such agent (λ=600-1070nm; KeSmet et al 2009; Quirk et al 2012; Johnstone et al 2012a).

Several *in vitro* explorations have reported that NIR protects cells from toxic insult and/or degenerative process by stimulating mitochondrial activity, increasing adenosine triphosphate (ATP) content and decreasing levels of oxidative stress (Liang et al 2008; Ying et al 2008; Trimmer et al 2009; Quirk et al 2012). Further, *in vivo* studies have shown that NIR treatment neuroprotects many dopaminergic cells in the well-known MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) mouse model (Shaw et al 2010; Peoples et al 2012; Moro et al 2013,2014; Johnstone et al 2014b; Reinhart et al 2014; El Massri et al 2015). In the K3691 transgenic mouse model of frontotemporal dementia, which also shows a chronic and progressive degeneration of dopaminergic cells in the SNc and parkinsonian signs, NIR treatment decreases oxidative stress and hyperphosphorylated tau and increases dopaminergic cell survival in the SNc (Purushothuman et al 2013). Together with preserving dopaminergic cell survival, NIR has been shown to correct, at least partially, the abnormal neuronal activity generated by MPTP toxicity (Shaw et al 2012), as well as improving various parameters of locomotive behaviour, for example mobility and velocity (Whelan et al 2008; Moro et al 2013; Reinhart et al 2014). Finally, NIR treatment offers neuroprotection to dopaminergic cells and reduces apomorphine-induced rotational behaviour in 6 hydroxydopamine (6OHDA)-lesioned rats, a hemiparkinsonian model of the disease (Reinhart et al 2015).

In all but one of these previous studies in animal models of Parkinson's disease, NIR therapy was applied at the same time as the toxic insult (ie, simultaneous-treatment). This paradigm is unlike the clinical reality where there is much cell loss prior to therapeutic intervention. However, these studies aimed to determine the maximum neuroprotective effect NIR therapy and this was measured more efficiently without any prior cell loss (Shaw et al 2010; Peoples et al 2012; Moro et al 2013,2014; Johnstone et al 2014b; Reinhart et al 2014; El Massri et al 2015). Peoples and colleagues (2012) is the sole exception to this paradigm; these authors, in addition to having a simultaneous-treatment series, had a post-treatment series, where they applied the NIR therapy well after MPTP insult. They reported similar patterns of neuroprotection in both their series.

In this study, we explored the patterns of behaviour and neuroprotection when NIR was applied either before (pre-), at the same time (simultaneous-) or after (post-treatment) MPTP insult. From these experiments, we hoped to determine whether the timing of treatment in relation to insult was crucial; there was therapeutic window for NIR effectiveness, and; NIR was fast-acting and long-lasting after application. Overall, our findings will hopefully provide further insights into the period when NIR therapy is most effective in relation to insult.

MATERIALS & METHODS

Subjects

Male BALB/c (n=147) mice were housed on a 12hr light/dark cycle with unlimited access to food and water. Animals were 8-10 weeks old. All experiments were approved by the Animal Ethics Committee of COMETH (Grenoble).

Experimental design

Groups of mice received intraperitoneal injections of either MPTP or saline, in conjunction with different combinations of NIR treatments or not (see Fig 1). The different groups were: (1) Saline: saline injections with no NIR treatment (n=9) (2) MPTP: MPTP injections with no NIR treatment (n=26) (3) NIR-MPTP: MPTP injections with NIR pre-treatment (n=7) (4) MPTP=NIR: MPTP injections with NIR simultaneous treatment (n=24) (5) MPTP-NIR: MPTP injections with NIR post-treatment (n=15) (6) NIR-MPTP=NIR: MPTP injections with NIR pre- and simultaneous treatment (n=10) (7) MPTP=NIR-NIR: MPTP injections with NIR post- and simultaneous treatment (n=10) (8) NIR-MPTP=NIR-NIR: MPTP injections with NIR pre-, post- and simultaneous treatment (n=10). For each of the NIR-treated MPTP groups, there was a corresponding NIR-treated saline group, that had the same patterns of NIR treatments and time-lines, except that saline injections were made instead of MPTP injections (n=36).

Following our previous work, we used an acute MPTP mouse model (Shaw et al 2010; Moro et al 2013,2014; Johnstone et al 2014b; Reinhart et al 2014; El Massri et al 2015). The acute model is a well-accepted model of the disease (Schober 2004; Blesa et al 2012; Bovè and Pèrier 2012) and has revealed many aspects of the mechanisms of Parkinson's disease over the years. Although it does not provide information on the chronic progressive nature of the disease, it does generate mitochondrial dysfunction, dopaminergic cell death and a reduction in locomotive activity (Schober 2004; Blesa et al 2012; Bovè and Pèrier 2012; Moro et al 2013; Reinhart et al 2014). The latter two issues were central in this study, making the acute model most appropriate for our use.

Briefly, we made two MPTP (25mg/kg injections) total of 50mg/kg per mouse) or saline injections over a 24 hour period. For the NIR treatment, mice were exposed to NIR (670nm) from a light-emitting device (LED; Quantum Devices WARP 10; Fig 2A). Each exposure was approximately 90 seconds and equated to ~0.5J/cm² to the brain (Shaw et al 2010). The different combinations and exposures of NIR for each experimental group are shown in Fig 1. As a rule, mice had two exposures on any given day, approximately six hours apart (1J/cm² per day). Hence, we had single (four NIR exposures over two days; NIR-MPTP, MPTP=NIR and MPTP-NIR groups), double (eight treatments over four days; NIR-MPTP=NIR and MPTP=NIR-NIR groups) and triple (twelve treatments over six days; NIR-MPTP=NIR-NIR group) sets of treatments. For each treatment, the mouse was restrained by hand and the LED was held directly against the head (Shaw et al 2010; Moro et al 2013; Johnstone et al 2014b; El Massri et al 2015; Fig 2A). The LED generated no heat and reliable delivery of the radiation was achieved. For the Saline and MPTP groups, mice were held under the LED as described above, but the device was not turned on. After the last treatment, the majority of mice were allowed to survive until 13d before perfusion (Fig 1). Some mice were perfused at earlier stages, on 5.5d and 7.5d; these shorter survival periods were used to compare SNc cell number at different stages, in particular in relation to the initial behavioural changes after MPTP injection (see below). The mice with the shorter survival periods had the same combinations of MPTP and NIR treatments as the corresponding groups with the longer 13d survival (eg MPTP, MPTP=NIR and MPTP-NIR), up until the time of perfusion on 5.5d and 7.5d (Fig 1). For example, the mice in the MPTP=NIR group perfused on 5.5d, had only a single MPTP injection and NIR treatment and were perfused six hours later (Fig 1).

Open-field behavioural testing

From 0d to 12d, we performed a standard open-field test as described previously (Moro et al 2013; Reinhart et al 2014). Briefly, mice were placed in black boxes and locomotive activity was measured using the Noldus Ethovision (XT10) programme (Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands); a high definition camera detected changes in contrast and the programme analysed the number of pixels that changed from one picture to the next (8 pictures/sec). In this way, the movement (ie levels of locomotor activity) of each mouse was analysed. The changes in locomotor activity are expressed as a percentage value compared to the baseline for each group, with the baseline being 100%. Each animal was tested at fourteen time points, twice on 3d to 8d (the individual values of both tests were similar for each animal and hence pooled) and once on 0d (baseline) and 12d. Mice were tested for 10 minutes at each time point. We tested locomotive activity at these points, particularly on 5d and 6d, because we wanted to explore the effects of NIR during a time when the MPTP was most effective (eg, immediately after injections), when the mice were most immobile and "sick" (Moro et al 2013; Reinhart et al 2014). For comparisons between groups in the behavioural analysis, a one-way ANOVA test was performed (F and p values; GraphPad Prism programme).

Immunocytochemistry and stereology

On either 5.5d, 7.5d or 13d, mice were anaesthetised with an intraperitoneal injection of chloral hydrate (4%; 1ml/100g). They were then perfused transcardially with 4% buffered paraformaldehyde. The brains were removed and post-fixed overnight in the same solution. Next, brains were placed in phosphate-buffered saline (PBS) with the addition of 30% sucrose until the block sank. The midbrain was then sectioned coronally and serially (at 50µm) using a freezing microtome. All sections were collected in PBS and then immersed in a solution of PBS and 10% normal mouse serum (M5905 Sigma) and then PBS and 1% Triton (X100 Sigma) each for ~1 hour at room temperature. Sections were then incubated in anti-tyrosine hydroxylase (TH; 1:500; T8700 Sigma) for 48 hours (at 4°C), followed by biotinylated anti-rabbit IgG for four hours and then Extravidin-peroxidase complex for two hours (both at room temperature; 1:20 EXTRA3-1KT Sigma). To visualise the bound antibody, sections were reacted in a 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride solution (D3939 Sigma). Sections were mounted onto gelatinised slides, air dried overnight, dehydrated in ascending alcohols, cleared in Histoclear and coverslipped using DPX. All antibodies and chemicals were purchased from Sigma. In order to test the specificity of the primary antibody, some sections were processed as described above, except that there was no primary antibody used. These control sections were immunonegative.

The number of TH⁺ cells within the SNc was estimated using the optical fractionator method (StereoInvestigator, MBF Science), as outlined previously (Shaw et al 2010; Peoples et al 2012; Moro et al 2013,2014; Purushothuman et al 2013; Johnstone et al 2014b; Reinhart et al 2014; El Massri et al 2015). Briefly, systematic random sampling of sites - with an unbiased counting frame (100x100µm) - within defined boundaries of SNc was undertaken. Counts were made from every second section, and for consistency, the right hand side of the brain was counted in all cases. All cells (nucleated only) that came into focus within the frame were counted and at least five sites were sampled per section. For comparisons between groups in the cell analysis, a one-way ANOVA test was performed as above.

Correlation coefficients

In order to explore the relationship between behaviour and the extent of SNc lesion in the different experimental groups, we used the GraphPad Prism programme to calculate correlation coefficients (Pearson's test). Locomotor activity was expressed by averaging the

percentage activity values (as described above) of all the mice in each group. The extent of SNc lesion for the MPTP and each of the NiR-treated MPTP groups on 13d was expressed as a percentage change of TH⁺ cell number in the SNc from mean values attained from the saline controls. The Pearson's test generates a correlation factor (*r* value) that indicates whether the correlation is significant. A measure of goodness-of-fit of linear regression is *r*², and the closer the value to 1, then the better X (eg extent of SNc lesion) predicts Y (eg, locomotor activity).

RESULTS

In the section that follows, the behavioural, cellular and correlation analyses will be considered separately.

Behavioural analysis

Fig 3 shows the locomotor activity of mice, expressed as a percentage of the baseline value, in the different experimental groups on each day of testing. The activity of mice in the Saline and all the NiR-treated saline groups were similar across the survival period (ANOVA: $F=0.5$, $p=0.7$), hence their values were pooled (saline controls, Fig 3).

On the days before the first MPTP injection (3d and 4d), the locomotor activity of mice in all groups was similar, being near the baseline values (ie 100%; ANOVA: $F=1.0$, $p=0.4$; Fig 3). During the days of the MPTP injections (5d and 6d) however, clear differences between some of the groups emerged (ANOVA: $F=9.0$, $p<0.0001$; Fig 3A). While the activity of mice in the saline controls remained close to baseline values, the activity of mice in the MPTP group declined dramatically (60-70%; Fig 3). All the mice in the NiR-treated MPTP groups that had either pre-treatment or simultaneous-treatments (in any combination), had a reduction in activity during this period also (40-50%), but it was not as severe as the mice in the MPTP group (Fig 3). The exception to this pattern was the mice in the MPTP-NiR (post-treatment) group, those that had yet to receive NiR treatment; the activity of these mice mirrored those in the MPTP group (Fig 3). The day after the last MPTP injection (7d), the activity of mice in all the NiR-treated MPTP groups - in particular, those in the MPTP-NiR (post-treatment) group - returned to baseline values and remained there up until the last day of testing (12d; Fig 3). It should be noted that in the MPTP-NiR (post-treatment) group, the locomotor activity of mice returned to baseline almost immediately after the first NiR treatment on 7d; in fact, these animals were moving more freely around their box within only 20 minutes after their NiR treatment. The activity of the mice in the MPTP group by contrast, was still much lower than baseline over the two days post-MPTP injections (45-55%), but by the last of testing, had returned close to baseline as with all the other groups (ANOVA: $F=0.3$, $p=1.0$; Fig 3). Finally, there were no major differences in the locomotor activity of MPTP-treated mice that received either single (NiR-MPTP, MPTP=NiR, MPTP-NiR), double (NiR-MPTP=NiR, MPTP=NiR-NiR) or triple (NiR-MPTP=NiR-NiR) sets of NiR treatments; they all had similar degrees of clinical impairment and patterns of activity during the experimental period (Fig 3).

In summary, when mice were exposed to NiR either before (pre-treatment), at the same time (simultaneous-treatment) or after (post-treatment) MPTP injections, their degree of clinical impairment was reduced substantially. In the post-treatment cases, locomotor activity returned to baseline levels almost immediately, within minutes, after NiR treatment. Overall, the activity of mice in the NiR-treated MPTP groups returned to baseline levels well before those in the MPTP group. We showed also that mice with either single, double or triple sets of NiR treatments, regardless of stage of application, all displayed the same patterns of locomotor activity.

Cellular analysis

In this study, we used TH immunocytochemistry to describe patterns of cell morphology and number in the SNc after MPTP and/or NiR treatment. For the morphology, Fig 2C-F shows photomicrographs of TH⁺ cells in the SNc of the Saline (Fig 2C), MPTP (Fig 2D), NiR-MPTP (Fig 2E; pre-treatment) and MPTP=NiR (Fig 2F; simultaneous-treatment) groups. The cellular morphology in the other NiR-treated MPTP groups were similar to those shown in Fig 2E and F, and hence not shown. Although there were fewer TH⁺ somata in the MPTP group (Fig 2D; see below), those remaining were similar in overall appearance to those seen in the other groups. The bulk of cells had round or oval-shaped somata with one to two labelled dendrites. There were also more degenerating axonal profiles (arrow Fig 2D) in the MPTP group compared to the others.

For the numerical analysis, we interpreted a change in TH⁺ cell number after experimental manipulation as an index of cell survival (Shaw et al 2010; Peoples et al 2012; Moro et al 2013,2014; Purushothuman et al 2013; Johnstone et al 2014b; Reinhart et al 2014; El Massri et al 2015). If cells lose TH expression, then they are likely to undergo death subsequently (Javoy-Agid et al 1990; Jackson-Lewis et al 1995; Björklund et al 1997), which then leads to a reduction in Nissl-stained (and TH⁺) cell number (Wallace et al 2007; Ma et al 2009). Notwithstanding a small number of cells that may have transient loss of TH expression, a key aspect of our study was whether NiR treatment saved TH expression during a period when MPTP treatment alone would have abolished it (Shaw et al 2010; Peoples et al 2012; Moro et al 2013,2014; Purushothuman et al 2013; Johnstone et al 2014b; Reinhart et al 2014; El Massri et al 2015).

Fig 4 shows the estimated number of TH⁺ cells in the SNc of the different experimental groups with different survival periods; on 13d (black columns), a day after the last behavioural test and, on 7.5d (blue columns) and 5.5d (green columns), two days when the mice treated with MPTP had the least locomotor activity recorded during the experimental period (see Fig 3).

In the Saline and all the NiR-treated saline groups, the number of TH⁺ cells were similar (ANOVA: $F=0.4$, $p=0.8$), hence their data were pooled (saline controls, Fig 4). On 13d, although the locomotor activity of mice in all groups was similar (Fig 3), there were clear differences in the number of TH⁺ cells between the saline controls and the MPTP group, and between the MPTP group and the NiR-treated MPTP groups (Fig 4; ANOVA: $F=3.4$; $p<0.001$). In fact, the number of TH⁺ cells in the NiR-treated MPTP groups averaged ~20% (range 11-27%) higher than in the MPTP group, indicating NiR-induced neuroprotection. There was no clear and consistent evidence indicating that the groups that had double (NiR-MPTP=NiR, MPTP=NiR-NiR) or triple (NiR-MPTP=NiR-NiR) sets of NiR treatments, resulted in a greater protection of SNc TH⁺ cells than in the groups that had a single set of treatments (NiR-MPTP, MPTP=NiR, MPTP-NiR); TH⁺ cell number was similar in all the different NiR-treated MPTP groups (Fig 4; ANOVA: $F=1.6$; $p=0.2$).

For the shorter survival periods of 5.5d and 7.5d - during stages when mice treated with MPTP showed the least locomotor activity - the number of TH⁺ cells was already lower than the saline controls. On 5.5d in particular, TH⁺ cell number in the MPTP group was very much lower than controls (33%); by 7.5d, number had increased to levels evident on 13d (Fig 4). Even at these early stages, TH⁺ cell number averaged ~20% higher in the NiR-treated MPTP (MPTP=NiR and MPTP-NiR) groups than in the MPTP group on these days (range 10-25%), similar to the value on 13d (Fig 4).

In summary, the NiR-treated MPTP groups averaged ~20% more TH⁺ cells in the SNc than the MPTP group; this pattern was evident from very early stages (5.5d and 7.5d), after the first behavioural signs of MPTP insult were apparent, up until the end of the experimental period (13d). We found no evidence indicating that any particular combination of NiR treatment and MPTP injection, nor indeed the total number of NiR treatments, resulted in a higher number of TH⁺ cells in the SNc; the number of cells was similar in all the different NiR-treated MPTP groups.

Correlation between behaviour and anatomical lesion

In order to explore any correlation between behaviour and anatomical lesion, we compared locomotor activity to the extent of SNc lesion in the different experimental groups (Fig 5). Locomotor activity was expressed as an average percentage of the activity of all the mice in each group over the entire experimental period, while the extent of lesion was expressed as a percentage change of TH⁺ cell number in the SNc from mean values attained in the saline controls.

There was a clear tendency for the MPTP group to have less locomotor activity and a larger SNc lesion (blue squares; Fig 5). The mice with more locomotor activity were more likely to have smaller SNc lesions, and these mice formed the NIR-treated MPTP groups (red triangles and diamonds; Fig 5). Overall, we found a significant correlation between locomotor activity and the extent of SNc lesion in the different experimental groups ($r = -0.7$, $r^2 = 0.6$; $p < 0.05$).

In summary, the patterns of locomotor activity in each group was a good indicator of whether or not there was an extensive SNc lesion.

DISCUSSION

Our results have confirmed and extended previous studies showing neuroprotection and reduced clinical impairment in MPTP-treated mice after NIR treatment (Whelan et al 2008; Shaw et al 2010; Peoples et al 2012; Moro et al 2013,2014; Johnstone et al 2014b; Reinhart et al 2014; El Massri et al 2015). We extended previous findings by reporting on the behavioural patterns, together with the magnitude of neuroprotection, when NIR therapy was applied at different time periods in relation to MPTP insult.

Our main finding was that NIR treatment was just as effective in reducing clinical impairment and offering neuroprotection when applied either before (pre-treatment), at same time (simultaneous-treatment) or after (post-treatment) MPTP insult. From these different combinations of treatment and insult, we found a broad therapeutic window for NIR effectiveness and that NIR was fast-acting and long-lasting, that behavioural improvements were almost immediate and lasted for several days thereafter. These issues will form the main points of discussion below.

The behavioural results were striking. Although mice in all groups had similar locomotor activity at the end-point of the experimental period (see below), the central feature of our results was that during earlier stages - when MPTP insult alone generated severe clinical impairment - NIR treatment mitigated this impairment (Fig 3). Further, that single, double and triple sets of NIR treatments - regardless of stage of application - all resulted in similar patterns of behavioural improvements. When mice were NIR-treated either before or at the same time as the MPTP insult, their clinical impairment reduced substantially; further, their activity returned to control levels well before those in the MPTP group (Fig 3). Hence, pre- and simultaneous-treatment of NIR not only offset the most debilitating effects of MPTP insult during the injection period, but these treatments continued to provide benefit for several days thereafter. Our behavioural results from the series involving the post-treatment of NIR were even more striking. In these cases, when mice were NIR-treated well after the MPTP insult, their clinical impairment dissipated almost immediately; within minutes after treatment, activity returned to control levels. Overall, these results indicated that NIR was fast-acting and long-lasting (see further below).

During the earlier stages of the experimental period, when clear behavioural differences were evident between some of the groups, our cellular analysis indicated a substrate for these differences. In particular, the MPTP group - with the greatest clinical impairment - had the least number of dopaminergic cells, while all the NIR-treated MPTP groups - with overall reduced clinical impairment - showed evidence of neuroprotection, having more dopaminergic cells than the MPTP group. There was no indication that any particular combination of NIR treatment and MPTP insult resulted in a greater magnitude of neuroprotection, with all NIR-treated MPTP groups, whether single, double and triple, each having similar numbers of surviving cells (Fig 4).

It is likely that the neuroprotection underpinned the reductions in clinical impairment during these early stages. The greater number of surviving cells in mice of the NIR-treated MPTP groups presumably resulted in greater dopaminergic transmission through the striatum, leading to their reduced clinical impairment (Moro et al 2013; Reinhart et al 2014). We showed that NIR treatment was able to "protect" cells and limit clinical impairment against a toxic insult either when applied in the immediate (within minutes; ie, simultaneous-treatment) or when applied up to two days beforehand (ie, pre-treatment); further, NIR was also able to "rescue" cells and restore locomotor activity to control levels up to two days after the insult (ie, post-treatment; Wallace et al 2007; Peoples et al 2012). There appeared a relatively broad therapeutic window for NIR effectiveness; in our acute MPTP model, this window was evident for up to two days on either side of the insult. Building on this finding in rodents, it will be a challenge for future studies to determine how long this window remains open, particularly in humans, thereby providing insights into the stages of therapeutic effectiveness of the treatment in relation to the disease progression.

The precise mechanisms of protection and rescue used by NIR are not known, but several previous studies have reported that NIR stimulates mitochondria by increasing ATP content and electron transfer in the respiratory chain through activation of photoacceptors (eg, cytochrome oxidase), together with modulating reactive oxygen species and the induction of various transcription factors (Hamblin and Demidova 2006; Liang et al 2008; Ying et al 2008; Rojas and Gonzalez-Lima 2011; Chung et al 2012; Gonzalez-Lima and Barrett, 2014). In this study, such factors were likely to have protected and rescued cells against toxic insult, leading to greater cell survival, dopaminergic striatal transmission and reductions in clinical impairment.

With regard to the recovery in locomotor activity in the MPTP group towards the end of the experimental period, notwithstanding a lower number of dopaminergic cells compared to the others (Fig 3,4), we suggest that there were compensatory neural mechanisms at play. In response to the lower number of dopaminergic cells in the SNc in this group, the remaining cells may have been stimulated - for example by motor cortex or pedunculopontine tegmental nucleus (Aravamuthan et al 2008; Valencia et al 2014) - to increase dopaminergic transmission through the striatum, thereby leading to the improvement in locomotor activity. A future, more functional analysis may explore this issue further.

In conclusion, within the limitations of an acute MPTP mouse model of Parkinson's disease, our results provide some key insights into the effectiveness of NIR therapy, laying groundwork for future endeavours on humans. We revealed a relatively broad therapeutic window for NIR, with comparable benefits - namely, reductions in clinical impairment and magnitudes of neuroprotection - being evident when NIR was applied either several days before, at the same time or several days after the MPTP insult. We showed also that NIR was fast-acting and long-lasting, with clinical improvements being evident almost immediately after application and lasting for several days thereafter.

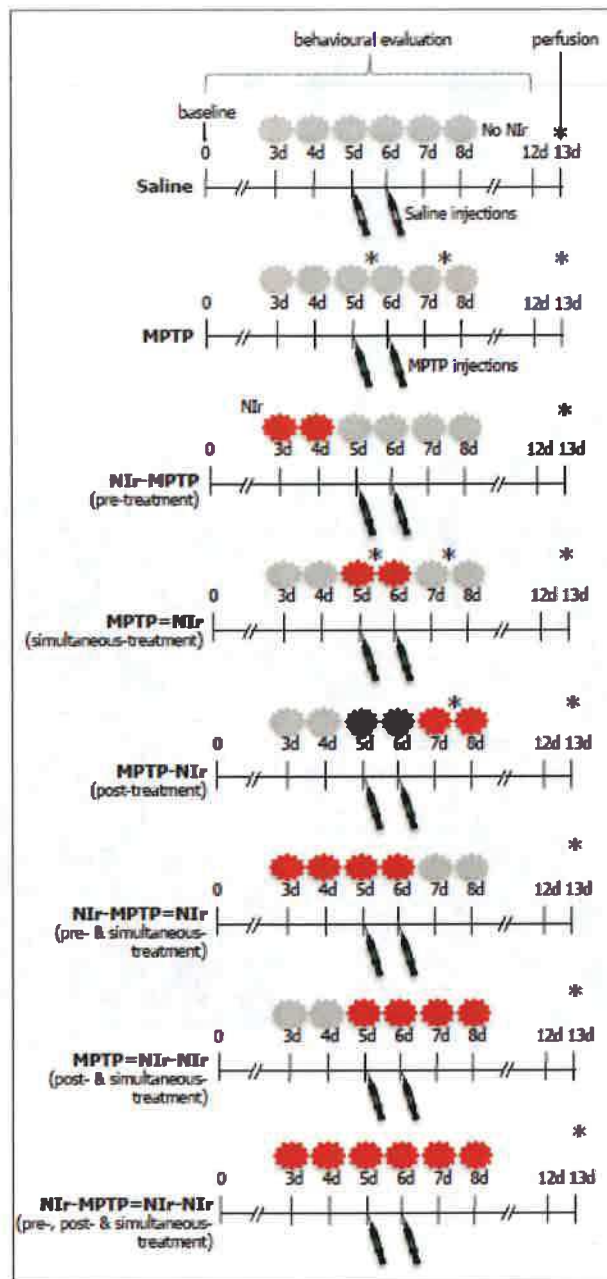


Fig 1. Outline of the different experimental groups. Mice were administered single MPTP (or saline) injections (25mg/kg each) on 5d and 6d and on the particular days that they were NiR-treated, two exposures were given, approximately six hours apart, each lasting 90sec using a WARP-LED. For each MPTP-NiR groups, there was a corresponding Saline-NiR group, that had the same patterns of NiR treatments and time lines, except that saline injections were made instead of MPTP injections. Note that the majority of groups were perfused on 13d, while some groups (MPTP, MPTP-NiR ad MPTP-NiR) had mice that were perfused on either 5.5d or 7.5d as well. These shorter survival periods were used to compare cell number at different stages of the experimental period. The asterisk* designates the days of perfusion in each of the different groups.

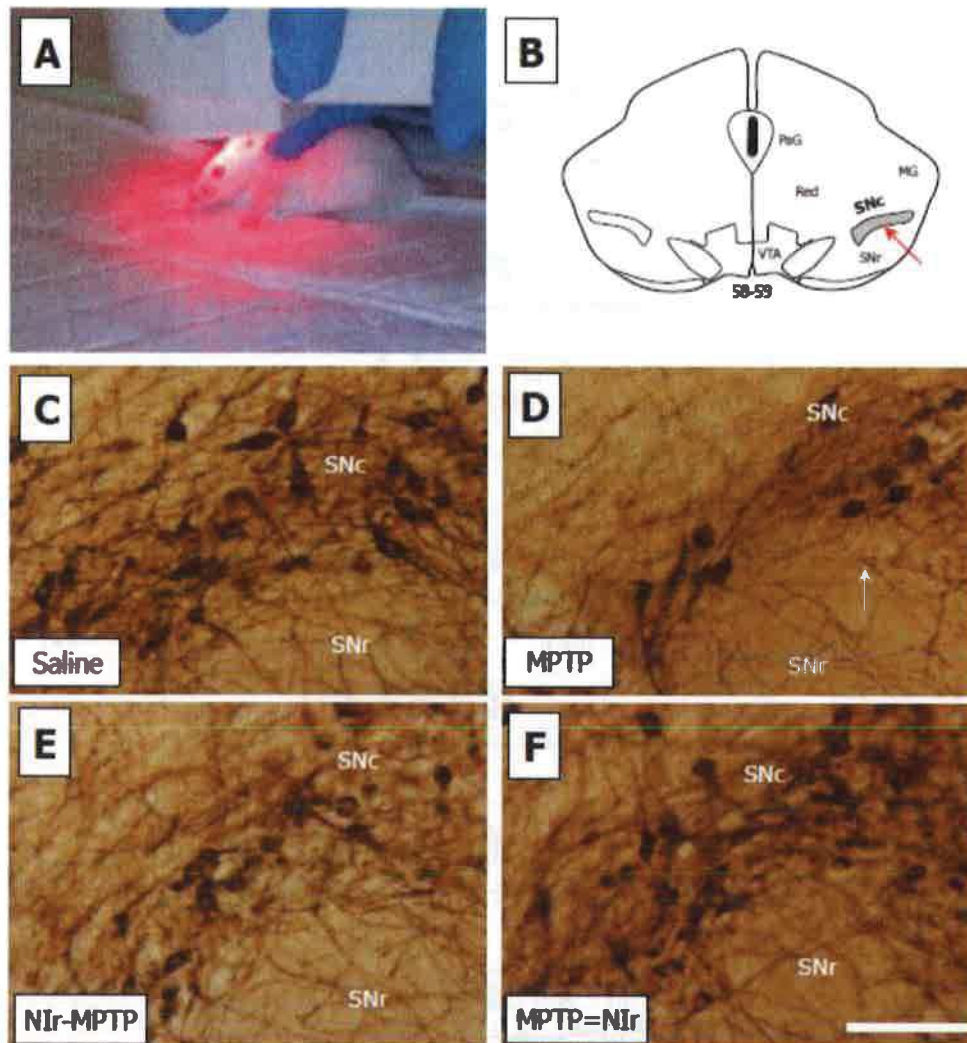


Fig 2. (A) Our application of NIR to mice. The LED was held over the mouse's head for 90s (for a single exposure). In general, the mice were very calm in the restrained position, particularly when the NIR LED was switched on. (B) Schematic diagram of coronal section, corresponding to plates 58-59 of mouse atlas (Paxinos and Franklin, 2001), from where the photomicrographs were taken (arrow; lateral regions, shaded). (C-D) Photomicrographs of TH⁺ cells in the SNc of the Saline (C), MPTP (D), Nir-MPTP (E; pre-treatment) and MPTP=Nir (F; simultaneous-treatment) groups (13d survival). The patterns of morphology in the other MPTP-Nir-treated groups were similar to those shown in (E) and (F), hence not shown; further, patterns in the corresponding groups on 5.5d and 7.5d, were similar to those on 13d. Photomicrographs were taken from a lateral region for each group (indicated by arrow in B). There were fewer TH⁺ cells and more degenerating axonal profiles (arrow D) in the SNc of the MPTP group than in the other groups. All figures are of coronal sections; dorsal to top and lateral to right. Scale bar = 100µm.

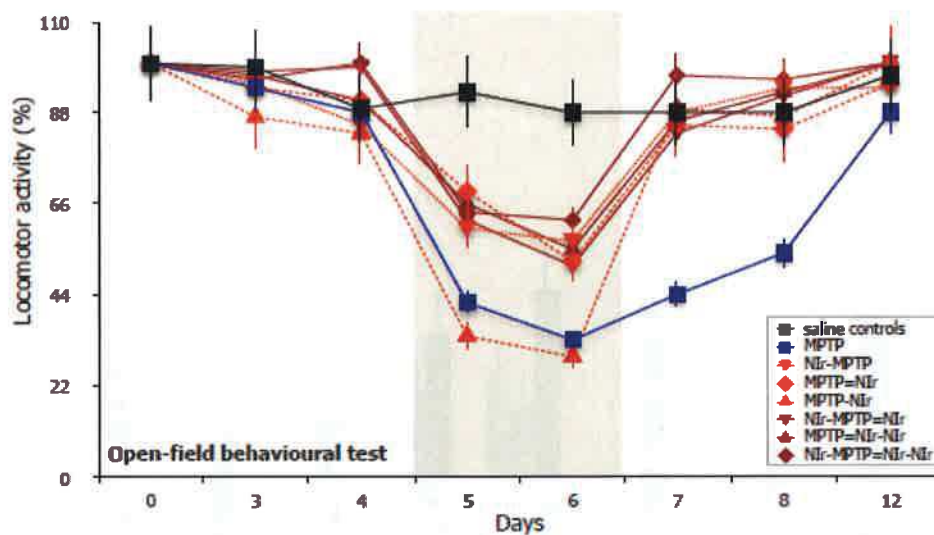


Fig 3. Graph showing the locomotor activity of mice as assessed by an open-field test. The different markers show results for the different experimental groups. The activities of the Saline and all Nlr-treated saline groups were similar and hence pooled. The changes in locomotor activity are expressed as a percentage of the baseline value for each group, with the baseline being 100%. Each animal was tested at 14 time points, twice on 3-8d (the individual values of both tests were similar for each animal and hence pooled) and once on 0d (baseline) and 12d. The grey shading represents the two days of MPTP (or saline) injection.

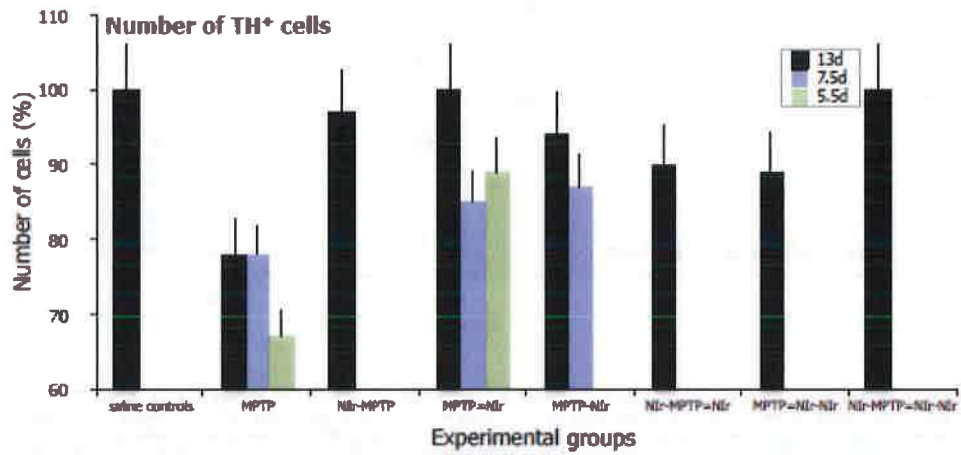


Fig 4. Graph showing the estimated total number of TH⁺ cells in the SNc in each of the experimental groups on 13d (black columns), 7.5d (blue columns) and 5.5d (green columns). The number of cells in the Saline and all NiR-treated saline groups were similar and hence pooled. Note that the number of cells in the MPTP group was lower than all the other groups of the same survival time, in particular all the NiR-treated MPTP groups; the fewest TH⁺ cells were evident in the MPTP group on 5.5d.

En résumé, nous montrons dans cette étude que :

- 1- Un prétraitement jusqu'à 48 h avant l'intoxication au MPTP induit une protection dopaminergique équivalente à un traitement simultané (20 % de cellules protégées par rapport au groupe MPTP). Ceci implique que, dans nos conditions expérimentales, la lumière à 670 nm induit un effet biologique à long terme d'au moins 48 h.
- 2- Un post-traitement a un effet à court terme sur les performances motrices des animaux (20 minutes). Précisément, les souris du groupe post-traité présentent une perte de leur activité motrice équivalente aux souris MPTP (60 % de perte, J6). 20 minutes après le traitement lumineux, ces mêmes souris présentent une activité motrice similaire aux souris salines, prétraitées et traitées simultanément au MPTP (J7).
- 3- Augmenter la quantité globale d'énergie lumineuse en augmentant le nombre de jours de traitement n'apporte pas de bénéfice particulier, dans nos conditions expérimentales. En effet, les souris des groupes bénéficiant de 4 ou 6 jours d'illumination ne présentent ni une activité motrice, ni un nombre de cellules dopaminergiques TH⁺ supérieurs aux groupes prétraités et traités simultanément (2 jours d'illumination).

V.3.3. Influence de la quantité de lumière sur l'efficacité thérapeutique

Cette campagne expérimentale a été conçue pour permettre une analyse croisée de l'influence de la puissance optique (P), de la durée d'illumination (Du), et donc de la quantité d'énergie délivrée (E_{op}) (n = 6 par groupe, soit 120 animaux en tout).

À toutes fins utiles, nous rappelons ici l'équation reliant ces trois paramètres :

$$P \times Du = E_{op}$$

Avec la puissance P (Watts), la durée Du (secondes) et l'énergie optique E_{op} (Joules). L'ensemble des puissances et durée utilisées, et des énergies délivrées résultantes, est rappelé Tableau IV-2.

Les deux questions centrales dans cette campagne sont :

- 1- Y a-t-il une corrélation entre la quantité d'énergie globale délivrée lors d'un flash lumineux et l'efficacité thérapeutique ?
- 2- Quelle est la fenêtre thérapeutique efficace, entre puissance optique et durée d'illumination d'un seul flash ?

V.3.3.1. Corrélation entre quantité d'énergie lumineuse et efficacité thérapeutique

V.3.3.1.1. Analyse comportementale

La Figure V-21 représente l'efficacité thérapeutique du traitement lumineux, sur l'activité motrice des souris MPTP, en fonction que la quantité d'énergie délivrée lors d'un flash lumineux.

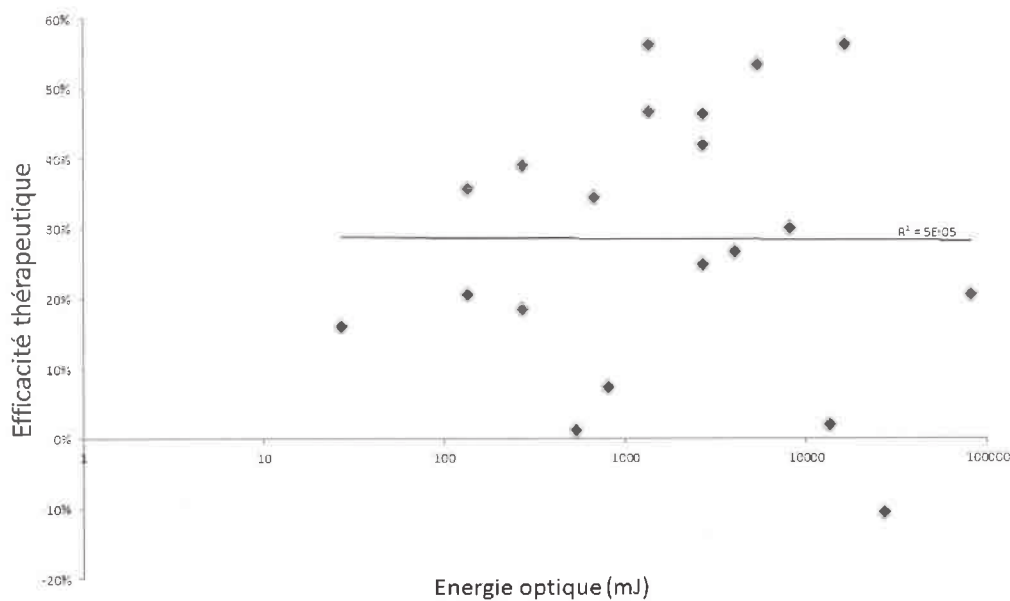


Figure V-21 : Efficacité thérapeutique (basée sur l'activité motrice) en fonction de la quantité d'énergie délivrée en un seul flash.

On remarque qu'il n'y a pas de corrélation entre ces deux paramètres ($R^2 = 5 \times 10^{-5}$). Autrement dit, la quantité globale d'énergie délivrée lors d'un flash lumineux n'influe pas sur l'efficacité thérapeutique, sur le plan comportemental, dans nos conditions.

V.3.3.1.2. Analyse histologique

La Figure V-22 représente l'efficacité thérapeutique du traitement lumineux, sur l'immuno-réactivité TH des souris MPTP, en fonction de la quantité d'énergie délivrée lors d'un flash lumineux.

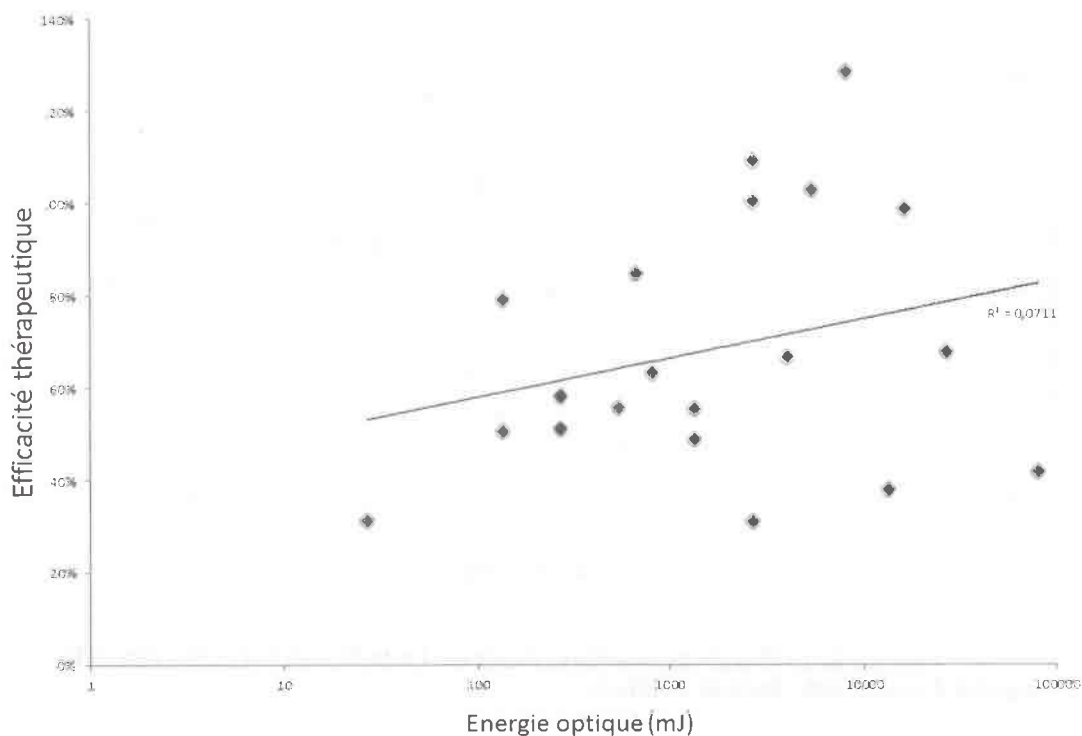


Figure V-22 : Efficacité thérapeutique (basée sur l'immuno-réactivité TH) en fonction de la quantité d'énergie délivrée en un seul flash.

On remarque une tendance à l'augmentation de l'efficacité avec l'augmentation de la quantité d'énergie. Cette tendance n'est toutefois pas soutenue par une corrélation mathématique ($R^2 = 0,0711$). Autrement dit, de même que pour l'activité motrice, la quantité globale d'énergie délivrée lors d'un flash lumineux ne semble pas influencer sur l'efficacité thérapeutique, sur le plan histologique, dans nos conditions.

V.3.3.2. Efficacité croisée entre puissance optique et durée d'une seule illumination

V.3.3.2.1. Analyse comportementale

La Figure V-23 et le Tableau V-1 représentent l'efficacité thérapeutique sur l'activité motrice d'une illumination à 670 nm, en fonction de la puissance optique délivrée (P) et de la durée de délivrance (Du). On remarque qu'il existe une fenêtre thérapeutique efficace, au sein de laquelle la relation puissance optique et durée d'illumination est adéquate pour préserver l'activité motrice des souris de la lésion MPTP (> à 25 % d'efficacité, $p < 0,05$ par rapport au groupe MPTP, encadré en pointillés). Au sein de cette zone, une fenêtre d'efficacité accrue se démarque (> à 40 % d'efficacité, $p < 0,01$, encadré en noir épais).

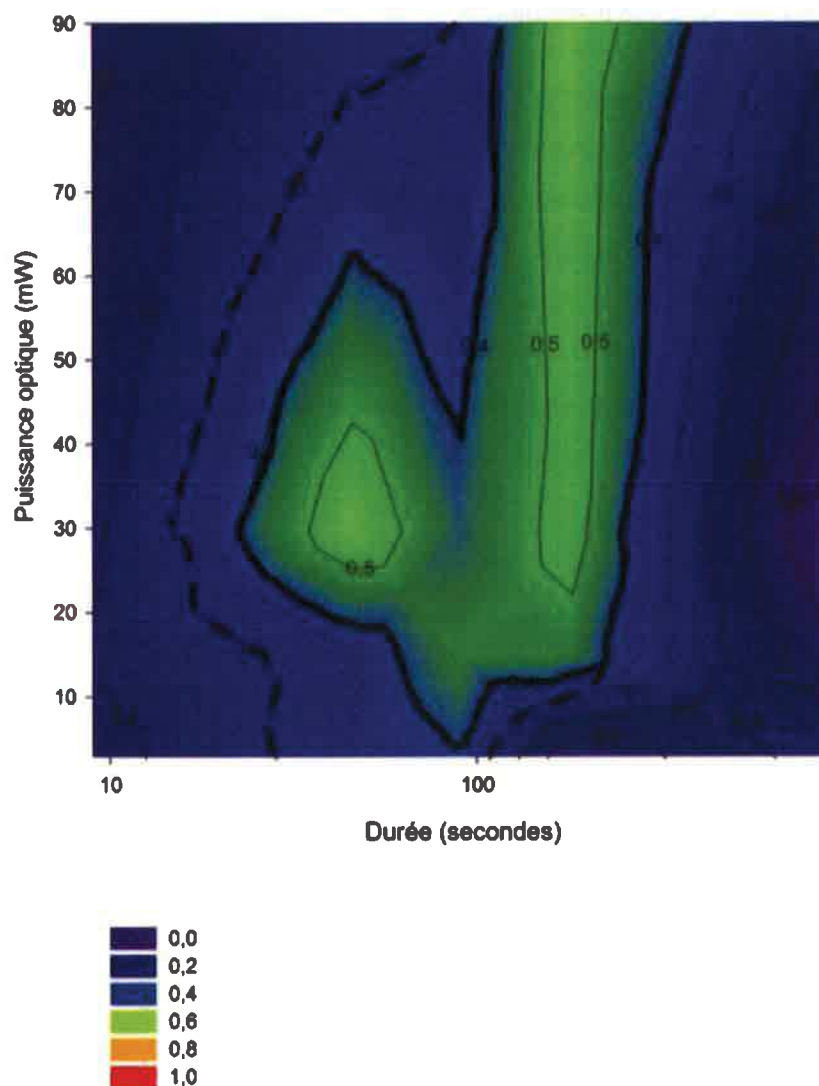


Figure V-23 : Représentation colorimétrique de l'efficacité thérapeutique d'une illumination à 670 nm sur l'activité motrice des souris (en fonction de la puissance délivrée et de la durée de délivrance). La zone cerclée de noir pointillé représente la fenêtre thérapeutique ayant une efficacité supérieure à 25 % ($p < 0,05$). La zone cerclée de noir pointillé représente la fenêtre thérapeutique ayant une efficacité supérieure à 40 % ($p < 0,01$).

| Efficacité | | Durée (s) | | | | |
|----------------|----|-----------|-----|-----|-----|-----|
| | | 9 | 45 | 90 | 180 | 900 |
| Puissance (mW) | 3 | 16% | 36% | 39% | 1% | 25% |
| | 15 | 21% | 35% | 47% | 47% | 2% |
| | 30 | 19% | 56% | 42% | 53% | 10% |
| | 90 | 8% | 27% | 30% | 56% | 21% |

Tableau V-1 : Représentation tabulaire de l'efficacité thérapeutique d'une illumination à 670 nm sur l'activité motrice des souris (en fonction de la puissance délivrée et de la durée de délivrance). La fenêtre thérapeutique encadrée de noir pointillé représente la fenêtre thérapeutique ayant une efficacité supérieure à 25 % ($p < 0,05$). La fenêtre thérapeutique encadrée de noir épais représente la fenêtre thérapeutique ayant une efficacité supérieure à 40 % ($p < 0,01$).

V.3.3.2.2. Analyse histologique

La Figure V-24 et le Tableau V-2 représentent l'efficacité thérapeutique sur le nombre de cellules TH⁺ dans la SNC d'une illumination à 670 nm, en fonction de la puissance optique délivrée (P) et de la durée de délivrance (Du). On remarque, comme pour le comportement, qu'il existe une fenêtre thérapeutique efficace, au sein de laquelle la relation puissance optique et durée d'illumination est adéquate pour préserver les cellules dopaminergiques des souris de la lésion MPTP (> à 50 % d'efficacité, $p < 0,01$ par rapport au groupe MPTP, encadré en pointillés). Au sein de cette zone, apparaît une seconde fenêtre d'intérêt, avec une efficacité thérapeutique supérieure à 85 % ($p < 0,001$ par rapport au groupe MPTP, encadré en noir épais).

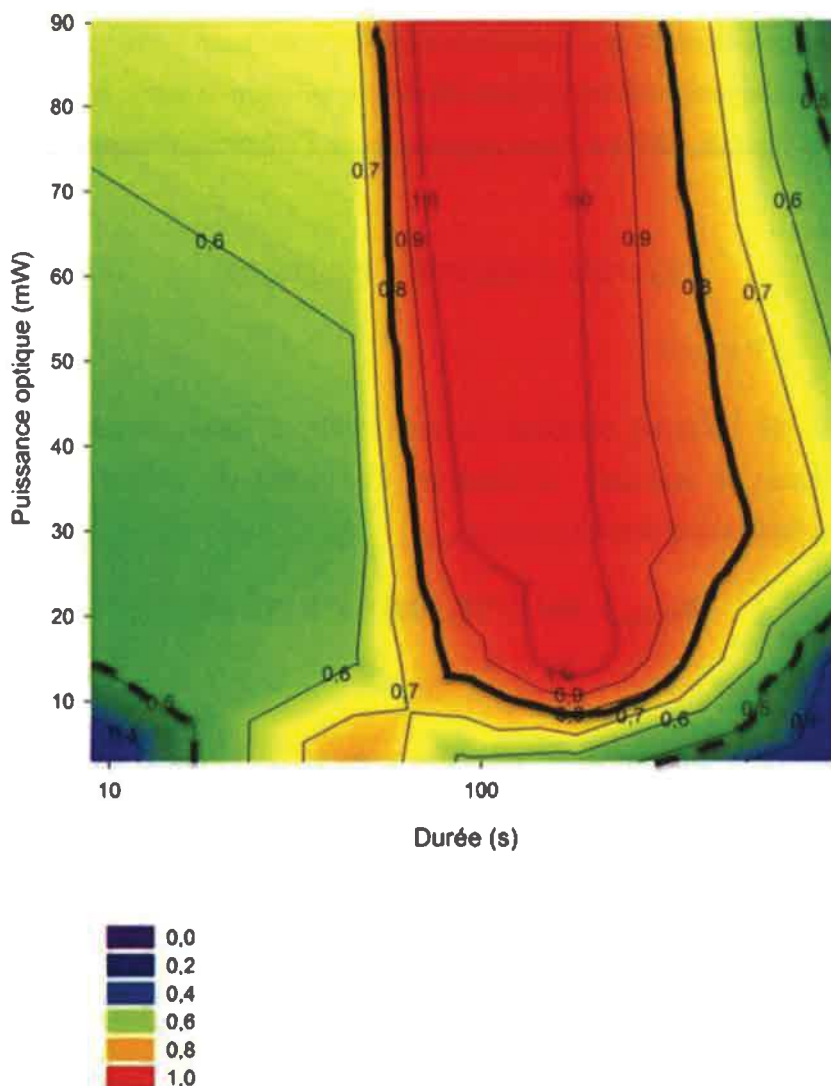


Figure V-24 : Représentation colorimétrique de l'efficacité thérapeutique d'une illumination à 670 nm sur le comptage des cellules TH⁺ (en fonction de la puissance délivrée et de la durée de délivrance). La zone cerclée de noir pointillé représente la fenêtre thérapeutique ayant une efficacité supérieure à 50 % ($p < 0,01$). La zone cerclée de noir pointillé représente la fenêtre thérapeutique ayant une efficacité supérieure à 85 % ($p < 0,001$).

| | | Durée (s) | | | | |
|----------------|----|-----------|-----|------|------|-----|
| | | 9 | 45 | 90 | 180 | 900 |
| Puissance (mW) | 3 | 32% | 79% | 58% | 56% | 31% |
| | 15 | 51% | 59% | 85% | 109% | 38% |
| | 30 | 51% | 56% | 101% | 103% | 68% |
| | 90 | 63% | 67% | 129% | 99% | 42% |

Tableau V-2 : Représentation tabulaire de l'efficacité thérapeutique d'une illumination à 670 nm sur le nombre de cellules TH⁺ présentes dans la substance noire compacte (en fonction de la puissance délivrée et de la durée de délivrance). La fenêtre thérapeutique encadrée de noir pointillé représente la fenêtre thérapeutique ayant une efficacité supérieure à 50 % ($p < 0,01$). La fenêtre thérapeutique encadrée de noir épais représente la fenêtre thérapeutique ayant une efficacité supérieure à 85 % ($p < 0,001$).

En résumé de cette étude, nous montrons que la quantité globale d'énergie optique appliquée ne joue pas de rôle notable (dans nos conditions expérimentales) sur l'efficacité thérapeutique. En contrepartie, il existe une fenêtre thérapeutique efficace, impliquant la durée d'illumination (un seul flash) et la puissance optique délivrée. Nous pouvons écrire l'efficacité thérapeutique E_T de la façon suivante

$$E_T = Du \in \{45; 180\} \cap P \in \{15; 90\}$$

Avec Du en s et P en mW.

Compte-tenu de l'objectif principal de cette étude, à savoir déterminer les paramètres d'illumination apportant le maximum d'efficacité, il convient de réduire la fenêtre proposée précédemment à une fenêtre d'efficacité accrue E_{Tmax} :

$$E_{Tmax} = Du \in \{90; 180\} \cap P \in \{15; 90\}$$

Avec Du en s et P en mW.

E_{Tmax} correspond à une efficacité supérieure à 85 % sur la protection des cellules TH^+ et supérieure à 40 % sur l'activité motrice.

DISCUSSION

GENERALE

VI. DISCUSSION GENERALE

VI.1. DEVELOPPEMENT DU DISPOSITIF IMPLANTE D'ILLUMINATION INTRACEREBRALE CHRONIQUE CHEZ LE RAT

Avant mon arrivée, un dispositif implantable pour rongeurs (souris), avec alimentation électrique déportée existait déjà au laboratoire²⁰⁰. Toutefois, celui-ci était calibré pour un encéphale de souris. Il présentait plusieurs inconvénients techniques dont il fallait s'affranchir :

- 1- Volume et masse du dispositif trop importants pour un rongeur.
- 2- Fils d'alimentation électrique traversant dans le dos de l'animal : difficulté de manipulation, risques élevés d'infection.
- 3- Pas de connectique modulable et robuste pour permettre de détacher l'animal et lui autoriser une libre mouvance pendant les études comportementales.
- 4- L'animal peut s'emmêler dans les fils électriques : danger pour l'animal et robustesse à long-terme limitée.

L'implant adapté aux rats, illustré Figure V-7B, présente l'avantage de pouvoir être stérilisé en autoclave, ce qui réduit grandement les risques d'infection pour l'animal. D'autre part, la sortie des câbles d'alimentation au niveau du dos (Figure V-7A) a été remplacée par une connectique courte, incluse dans du ciment, directement au niveau du crâne (Figure V-7C, D). En effet, la solution choisie pour les souris favorisait les infections d'une part, et réduisait la liberté de mouvements d'autre part. Le fait d'avoir une connectique directement sur la tête permet un nettoyage facile, sans anesthésie du rat et limite au maximum la gêne occasionnée dans ses mouvements.

De plus, cette connectique permet de brancher et débrancher l'implant à une source d'alimentation électrique sans contraindre l'animal. En effet, nous avons développé une potence d'alimentation (Figure V-15) laissant une liberté de mouvements maximum à l'animal en conditions d'hébergements. Cette potence présente trois degrés de liberté afin que l'animal subisse un minimum de contraintes dans ses déplacements. Elle possède une tension verticale suffisamment faible pour ne pas gêner l'animal, mais assez importante pour se relever dès que l'animal se met en position verticale ; ceci lui évite de s'emmêler dans les câbles auxquels il n'a, de cette façon, pas accès. Nous avons d'autre part montré que l'hébergement des animaux sur une durée de 23 jours dans ces conditions expérimentales n'altère pas leurs conditions cliniques au cours du temps (section V.1.2.5). Aucun stress comportemental notable n'a par ailleurs été observé lors de la manipulation des rats

branchés aux potences, en comparaison à des animaux hébergés en condition classique (observation non quantifiée).

Un point central du développement de la potence a été celui de sa robustesse. En effet, les rats sont des animaux beaucoup plus lourds et puissants que les souris. Il a donc fallu utiliser des matériaux résistants à la force de ces animaux :

- 1- Tube de blindage des câbles électriques en métal avec gainage en plastique dur (Figure V-15Ac) pour résister aux coups de dents éventuels.
- 2- Colle DP110 en renfort, au niveau du connecteur de la potence, avec une surcouche en silicone souple, pour augmenter la résistance aux torsions induites par les mouvements de tête du rat.
- 3- Ajout d'un rivet de sureté sur le connecteur côté potence, pour empêcher le rat de se déconnecter par lui-même.

Au niveau de l'implantation, des adaptations ont également eu lieu pour solidifier la tenue de l'implant sur le crâne :

- 1- Pose de vis au niveau des tempes en plus des 3 vis sur le dessus du crâne, pour éviter l'arrachage de l'implant, avec le ciment dentaire.
- 2- Rallonge de la tige de manipulation pour une meilleure ergonomie pendant l'acte chirurgical.

Concernant l'alimentation électrique des implants, nous avons réalisé des bornes d'alimentation permettant d'apporter un courant électrique modulable à 5 rats en même temps.

Ce système d'illumination pourrait être encore amélioré. En effet, si une connectique au niveau de la tête semble adaptée à nos conditions expérimentales, il est évident qu'un dispositif totalement implanté, avec une alimentation électrique non transcutanée serait préférable. Toutefois, notre cahier des charges en termes de puissance électrique (20 mW) pour délivrer une puissance optique en sortie d'implant suffisante (160 μ W) et stable sur une durée de 23 jours était très stricte. Il n'existe pas, à notre connaissance, de pile ou batterie permettant d'apporter une telle puissance pendant aussi longtemps, et suffisamment petite pour être implantable chez le rat. Nous avons donc opté pour une alimentation déportée.

D'autre part, au niveau des matériaux utilisés, l'implant que nous avons développé ne mime pas l'implant développé en parallèle pour les primates non humains (PNH). On ne peut donc pas faire de relation en termes de tolérance entre ces deux espèces. Notons que ce n'était pas l'objectif de cet implant rat. Il avait pour but de délivrer une illumination à puissance et durée contrôlables, afin

d'apporter une preuve de concept de la faisabilité d'une telle implantation, et du potentiel neuroprotecteur d'une illumination intracérébrale chez le rat. Notre implant, dans sa version présentée ici, a parfaitement répondu à cet objectif.

VI.2. ESTIMATION DE LA PUISSANCE OPTIQUE RECUE PAR LES SUBSTANCES NOIRES

L'objectif ici est de connaître la distance de pénétration de la lumière proche infrarouge dans les tissus cérébraux. Autrement dit, nous cherchons à connaître la quantité du signal lumineux restant après une distance donnée parcourue par celui-ci. En effet, s'il est aisé de mesurer la puissance optique délivrée en sortie du dispositif d'illumination, déterminer avec précision la quantité de lumière reçue par les zones cérébrales cibles s'avère plus compliqué.

Nous estimons ici qu'environ 62 % de la lumière à 670 nm est perdue par millimètre de tissu traversé chez le rat (Figure V-8). Il ne s'agit que d'une estimation, mais celle-ci s'approche de celle effectuée par Moro et al, en 2014²⁰⁰ chez la souris (65 % de perte par mm) avec une méthode similaire à la nôtre. Cette similarité entre les deux espèces peut s'expliquer par des coefficients de diffusion dans le cerveau similaires (μ_s , souris = 11,2 mm⁻¹ et μ_s , rat = 10,3 mm⁻¹)²⁴⁰. En effet, la perte de signal lumineux dans les tissus traversés est, entre autres, due à l'absorption et à la diffusion de la lumière par ces tissus. Le coefficient d'absorption illustre la propriété du tissu à absorber toute ou partie de la lumière qui le traverse ; plus ce coefficient est élevé, plus le tissu absorbe et moins le signal lumineux sortant du tissu est élevé, par rapport au signal lumineux qui y était entré. Toutefois, si la valeur du coefficient d'absorption a un impact direct sur la capacité d'un signal lumineux à pénétrer profondément dans un tissu biologique, le coefficient de diffusion semble jouer un rôle plus important encore. En effet, la diffusion est la propriété d'un tissu à dévier la lumière de sa trajectoire d'origine. La lumière est déviée par chaque portion de tissu traversée. Ainsi, dans un volume, comme le cerveau, statistiquement, la lumière finit par atteindre la cible voulue, mais par le biais d'une trajectoire déviée. En effet, plus le coefficient de diffusion est élevé, plus cette trajectoire est longue. Or, plus la trajectoire est longue, plus la lumière subit l'effet de l'absorption par les tissus. Ainsi, un très fort coefficient de diffusion, quelles que soient les propriétés d'absorption du tissu, provoque une forte perte lumineuse. Autrement dit, un tissu, même faiblement absorbant, s'il est traversé une multitude de fois (forte diffusion) finit par absorber une grande quantité du signal lumineux qui le traverse. Dans notre cas, les coefficients de diffusion chez le rat et la souris sont similaires, ce qui peut expliquer la similarité entre nos résultats de perte lumineuse et ceux de Moro et al 2014²⁰⁰.

La perte lumineuse après quelques millimètres est importante, d'où notre volonté, chez le rat 6-OHDA, d'apporter une solution d'illumination intracérébrale en prévision du transfert de notre thérapeutique chez l'humain. La puissance optique nécessaire à apporter aux substances noires chez l'humain n'est pas connue à ce jour. De plus, les coefficients de diffusion chez l'humain (μ_s = 3-4 mm⁻¹)²⁴¹ sont nettement inférieurs à ceux des rongeurs. Il est donc possible que la perte lumineuse en fonction de la distance traversée soit inférieure chez l'humain, par rapport aux rongeurs. Toutefois, il y a une distance de plusieurs centimètres entre la substance noire d'un patient parkinsonien et l'extérieur

de son crâne (~ 9 cm). Dans le cas d'une illumination extra-cérébrale, la puissance optique à délivrer en sortie de dispositif pourrait devoir être si importante qu'elle engendrerait des effets secondaires non négligeables : lésions thermiques, lésions oculaires, etc. Une illumination intracérébrale chez l'humain semble donc plus appropriée qu'une illumination extra-cérébrale.

De façon à introduire une certaine reproductibilité dans nos résultats, nous avons souhaité que le dispositif d'illumination intracérébrale développé pour le rat (voir section V.1.2) apporte une puissance optique aux substances noires du rat équivalente à celle délivrée aux substances noires de la souris par le dispositif d'illumination externe utilisé dans les études préalables de notre équipe^{146,164,191,195}. Sur la base de notre estimation de 62 % de perte par millimètre, nous obtenons le tableau suivant de puissance optique délivrée dans la substance noire :

| Espèce | Dispositif d'illumination | Puissance en sortie de dispositif (mW) | Distance à traverser (mm) | Puissance estimée reçue par les SN (μW) |
|---------------|----------------------------------|---|----------------------------------|---|
| Souris | Extra-cérébral | 30 | 8 | ~ 15 |
| Rat | Intracérébral | 0,16 | 2,5 | ~ 15 |

VI.3. SECURITE THERMIQUE DE L'ILLUMINATION INTRACEREBRALE

Toute implantation intracérébrale chronique pose la question de la production thermique du dispositif implanté et des risques de lésions liées à son fonctionnement.

Qualitativement, nous montrons section V.1.2.3 que les variations thermiques dues à l'illumination :

- 1- Dépendent de la puissance optique appliquée. En effet, l'augmentation de la température est linéaire à l'augmentation de la puissance optique. De même, la diffusion de la chaleur induite dans les tissus cérébraux est d'autant plus importante que la puissance optique est élevée. De plus, cette flaque de diffusion est relativement sphérique et ne semble donc pas dépendre des structures cérébrales traversées.
- 2- Ne dépendent pas du temps d'illumination. En effet, nos résultats montrent que l'échauffement se met en place dès le début de l'illumination (quelques dizaines de seconde). Suite à cela, aussi bien la température que la diffusion thermique restent stables, pendant au moins 30 minutes, avant de revenir au niveau de base, quelques secondes après l'arrêt de l'illumination.

Du point de vue quantitatif, dans nos conditions expérimentales, à savoir avec une fibre optique de 300 μm de diamètre, nous parvenons à illuminer à 670 nm jusqu'à une puissance optique de 15 mW en sortie de fibre sans provoquer d'échauffement chronique et local supérieur à 2 °C (norme 45502-2-1, article 1). Cette augmentation est limitée à 1 °C avec une illumination jusqu'à 5 mW optiques. Ces 5 mW sont à comparer aux 0,16 mW délivrés par l'implant rat (voir section précédente) dans le protocole d'évaluation du potentiel thérapeutique d'une illumination intracérébrale. Ces 0,16 mW en sortie de fibre sont suffisants pour induire une neuroprotection chez le rat 6-OHDA (voir section VI.5). Il existe donc une marge de sécurité thermique importante entre la puissance efficace chez le rat (0,16 mW) et la puissance maximum applicable dans les mêmes conditions (5 mW).

Notons par ailleurs qu'à seulement deux millimètres de distance du point le plus chaud, la température est déjà sous le seuil des 2 °C d'augmentation, même avec une augmentation maximum d'environ 8 °C (voir Figure V-13 et Figure V-14, 115 mW). Cette bonne capacité de dispersion de la chaleur par les tissus, même lors d'une forte augmentation de la température peut s'expliquer par la perfusion sanguine. En effet, la circulation sanguine agit comme régulateur thermique corporel. Cette propriété est très présente chez les rongeurs qui régulent leur température corporelle par une perfusion plus ou moins importante des tissus périphériques de leur queue²⁴². Un fonctionnement semblable existe au niveau cérébral chez les mammifères, de façon à limiter les risques de lésion de la barrière

hémato-encéphalique²⁴³. Le sang frais (~ 38 °C chez le rat) irrigue les tissus en hyperthermie ; il absorbe une partie de la chaleur du tissu et l'évacue hors du cerveau. Ce mécanisme est probablement un système de défense à court terme contre l'hyperthermie cérébrale. Nos résultats de dispersion de la chaleur à distance du point le plus chaud en sont un bon exemple.

Dans l'objectif de l'essai clinique, il semble intéressant et nécessaire de confirmer nos résultats quantitatifs sur des espèces taxonomiquement plus proches de l'humain, tels que les PNH, afin de déterminer si les valeurs obtenues sont extrapolables d'une espèce à l'autre. D'autre part, une modification de la fibre optique, (entre autres de son diamètre ou l'ajout d'un diffuseur optique), induirait une modification de la densité de puissance optique, à puissance délivrée égale, ce qui peut engendrer des résultats différents des nôtres.

VI.4. INTERETS ET LIMITES DES MODELES D'ETUDE UTILISES

VI.4.1. Validation des modèles utilisés

Nous avons choisi, dans ce travail de thèse, d'utiliser deux modèles neurotoxiques de la maladie de Parkinson pour évaluer le potentiel neuroprotecteur d'une illumination proche infrarouge : la souris MPTP et le rat 6-OHDA.

La première question soulevée est celle de la validité de ces deux modèles dans notre approche scientifique. En effet, dans la mesure où nous cherchons à évaluer le potentiel protecteur de la lumière proche infrarouge à la fois d'un point de vue moteur et histologique, il est nécessaire de travailler avec des modèles animaux présentant une perte dopaminergique et des troubles moteurs mimant la maladie de Parkinson.

Nous étudierons les deux modèles animaux utilisés séparément :

VI.4.1.1. Le modèle aigu MPTP souris

Nous avons choisi dans notre étude un modèle aigu, sévère de la maladie de Parkinson, à raison de 2 injections de 25 mg/kg de MPTP à 24 heures d'intervalle. Ce modèle est similaire à celui utilisé dans plusieurs études ayant démontré son intérêt dans la recherche préclinique de nouvelles thérapies de la maladie de Parkinson^{244,245}. Nous avons observé dans nos différentes études une mort neuronale de l'ordre de 45/50 %, 7 jours après la première injection (Figure V-2). Il s'agit d'un taux similaire à celui montré dans plusieurs études utilisant le même protocole d'injection^{146,195,199,200}. Ce taux présente l'avantage d'être assez important pour induire un déficit moteur marqué et observable, tout en restant suffisamment limité pour qu'il reste encore des cellules dopaminergiques à protéger.

Une étude est en cours pour déterminer la dynamique d'évolution de la lésion dopaminergique sur la semaine que dure notre protocole MPTP. Les résultats seront présentés lors de la soutenance de thèse, et ajoutés au manuscrit ultérieurement.

Concernant les déficits moteurs dans notre modèle MPTP, nous obtenons une perte de l'activité locomotrice pouvant aller jusqu'à 70 % dans toutes nos études. Il s'agit d'un niveau de troubles moteurs sévère, déjà observé par des études précédentes¹⁴⁶. Avec le présent protocole d'injection, les souris sont gravement atteintes sur le plan moteur, dès les minutes qui suivent la première injection de MPTP. Ceci permet d'étudier les bénéfices moteurs apportés par une thérapeutique dès le début du protocole d'injection.

Ces résultats confirment l'intérêt de notre modèle MPTP aigu dans l'étude du potentiel neuroprotecteur de la lumière proche infrarouge dans la maladie de Parkinson.

Il existe toutefois plusieurs inconvénients à travailler avec un modèle MPTP aigu. Le premier est la toxicité aiguë du MPTP à forte dose. En effet, Jackson-Lewis et al¹⁶¹ ont montré une neurotoxicité périphérique accompagnée d'une cardiotoxicité pouvant conduire à la mort de l'animal, à de telles doses de MPTP. Sur l'ensemble des trois années de thèse, nous avons en effet perdu 10 souris par mort subite, dans les secondes qui suivirent l'injection de MPTP. Il est fort probable que ces décès soient dus à la cardiotoxicité du MPTP à forte dose.

Un second inconvénient d'un protocole d'injection aigu est la récupération spontanée après quelques jours des animaux. En effet, dans la majorité de nos études, nous avons remarqué une récupération fonctionnelle des animaux MPTP après 8 jours (voir Figure V-1). Ce phénomène est bien connu des modèles aigus MPTP²⁴⁶. Si un modèle aigu permet une mise en place très rapide de la pathologie chez la souris, il ne permet pas de réaliser d'études sur un terme supérieur à quelques jours, et ne mime donc pas parfaitement la pathologie humaine. De plus, cette récupération fonctionnelle rapide nécessite d'analyser les résultats des études comparatives de paramètres de mise en jeu des stratégies thérapeutiques avec prudence.

D'autre part, la présence d' α -synucléine dans les modèles MPTP est controversée ; ces agrégats ne ressemblent pas aux corps de Lewy de la maladie de Parkinson¹⁶⁶. D'autre part, ces agrégats n'ont, à notre connaissance, jamais été observés dans des modèles aigus MPTP. Notre modèle ne fait pas exception sur ce point.

Un modèle plus chronique, basé sur des injections de MPTP moins dosées, mais sur un temps plus long, induit une plus forte variabilité interindividuelle au niveau comportemental et histologique. Dans nos études, nous avons observé une bonne homogénéité dans nos groupes d'étude, aussi bien sur le plan histologique (nombre de cellules TH⁺ : 7800 +/- 600), qu'au niveau de l'activité locomotrice (à MPTP J1 : activité = 41 % +/- 6 % ; à MPTP J2 : activité = 36 % +/- 6 %).

Dans cette thèse, nous n'avons pas exploré la possibilité de pratiquer des injections intraveineuses et non intrapéritonéales de MPTP. En effet, avec ce type de protocole, il est possible d'obtenir un modèle unilatéral (injection dans la carotide) de la maladie, mais la toxicité cardiovasculaire est exacerbée, ce qui n'est pas en faveur de son utilisation.

Malgré l'intérêt que représentent les différents modèles MPTP chez la souris, aucune ne mime parfaitement la pathologie humaine. Ce fait doit être connu et intégré avant toute étude basée sur ces modèles. Néanmoins, la souris MPTP reste un des modèles de choix pour des études sur le potentiel neuroprotecteur d'une nouvelle stratégie médicale.

VI.4.1.2. Le modèle 6-OHDA rat

Le modèle 6-OHDA que nous avons choisi est un modèle héli-parkinsonien, avec injection dans le striatum. En effet, dans la mesure où la 6-OHDA est hydrosoluble et ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique, une injection intracérébrale par chirurgie stéréotaxique est certes requise, mais permet de pratiquer une héli-lésion. Le modèle unilatéral 6-OHDA profite de cette propriété de la toxine. En effet, une injection unilatérale dans le striatum des rats engendre une lésion retro-induite de la substance noire ipsilatérale à l'injection. Cependant, ni le striatum, ni la substance noire controlatérale ne présenteront de lésion. Ainsi, on obtient un rat héli-parkinsonien où il est possible de comparer l'hémisphère lésé à l'hémisphère sain. Chaque individu peut alors être son propre contrôle.

D'autre part, cette propriété permet une meilleure survie des animaux. En effet, une lésion bilatérale réduit significativement l'espérance de vie des rats lésés, car les symptômes moteurs sont trop importants pour leur permettre de s'alimenter et s'abreuver correctement par eux-mêmes²⁴⁷.

Trois régions d'injection sont couramment utilisées pour induire un syndrome parkinsonien :

- 1- Directement dans la substance noire compacte, où se trouvent les corps cellulaires dopaminergiques touchés dans la maladie de Parkinson. Ce site d'injection permet de provoquer une lésion directe des neurones dopaminergiques, mais comprend un risque non négligeable de lésion mécanique de la substance noire. Dans le cas d'un travail sur la neuroprotection de la substance noire, précisément, nous ne pouvions pas nous permettre de risquer des lésions mécaniques dans cette zone, ce qui aurait pu biaiser nos résultats.
- 2- Dans le mfb, par lequel passent les projections nerveuses nigrostriées. Une injection dans cette région évite le risque de lésion mécanique de la substance noire. Toutefois, la mort neuronale induite par une injection dans le mfb est majeure, voire trop importante pour qu'une éventuelle neuroprotection ait le temps d'agir. En d'autres termes, il doit rester des neurones à protéger pour envisager une neuroprotection. Ce site d'injection n'était donc pas adéquat à une étude de principe sur le potentiel neuroprotecteur de la lumière proche infrarouge chez le rat 6-OHDA.
- 3- Dans le striatum, au niveau des terminaisons nerveuses de la voie dopaminergique nigrostriée. Une injection dans cette région provoque une lésion de l'ordre de 30/40 %¹²⁴, ce qui est légèrement supérieur aux 25 % de perte que nous avons observé. Cette lésion n'est pas majeure, mais suffisante pour déterminer le potentiel neuroprotecteur d'une nouvelle thérapeutique. C'est donc ce mode d'injection que nous avons choisi, à raison d'une seule injection de 4 μ L à 7,5 μ g/ μ L de 6-OHDA. Il s'agit du protocole d'injection utilisé par

Piallat et al¹²⁴. Par ailleurs, nous avons observé une perte de cellules TH⁺, mais également des cellules colorées au Nissl. Ceci est en faveur d'une lésion neuronale complète, et pas seulement fonctionnelle.

L'un des avantages principaux de ce modèle, pour notre étude, est qu'il est sensible à l'apomorphine. En effet, l'apomorphine est une molécule couramment utilisée en clinique pour traiter les symptômes moteurs des patients parkinsoniens. Chez le rat 6-OHDA, du fait de l'hypersensibilité de dénervation due à lésion dans le striatum lésé, on observe un comportement rotatoire controlatéral à la lésion, sous apomorphine. Il s'agit d'un comportement présent dans notre modèle, et qui permet d'avoir une bonne idée du niveau de lésion d'un animal, puisque le comportement rotatoire est lié à celui-ci. Cette hypersensibilité est progressive et s'installe dans un intervalle de temps d'environ 3 semaines¹²⁴. Dans cette thèse, nous avons limité l'étude à 3 semaines également ; toutefois, il semble que l'augmentation du nombre de tours n'avait pas encore atteint son plateau (Figure V-4).

En résumé, notre modèle unilatéral 6-OHDA permet d'étudier l'impact d'une nouvelle thérapeutique sur 1 – la survie neuronale, 2 – le comportement rotatoire à un moment donné, mais aussi 3 – sur l'évolution dans le temps de l'intensité de ce comportement.

Dans le cadre de notre étude, l'un des inconvénients majeurs de ce modèle réside dans son faible pouvoir lésionnel. En effet, les animaux parviennent à compenser leur héli-déficit moteur avec leur hémicorps sain. Ceci rend compliqué une étude des performances motrices sur les animaux par open field par exemple. Le *stepping test*¹⁹³ est un test de plus en plus couramment utilisé pour étudier les performances motrices des rats 6-OHDA. Toutefois, puisque 1 – il nécessite un entraînement conséquent des animaux, et 2 – le véritable marqueur d'intérêt de ce travail est le comptage neuronal dans la substance noire, nous avons choisi de ne pas le réaliser sur nos rats, et d'étudier le comportement rotatoire sous apomorphine. Ce test reste celui de référence dans le cas d'un protocole impliquant des rats héli-parkinsoniens. D'autre part, nous souhaitons ne pas risquer de biaiser nos résultats avec un éventuel apprentissage des tests comportementaux par les rats.

VI.4.2. La lumière proche infrarouge n'influe pas sur l'activité de la MAO-B et de DAT, *in vitro*

Il s'agit ici de s'assurer que la neuroprotection des cellules dopaminergiques et l'amélioration comportementale observée sur ces deux modèles, grâce à la lumière proche infrarouge, est bien un effet thérapeutique de celle-ci, et pas un artefact des modèles. Autrement dit, nous devons confirmer que la lumière proche infrarouge n'altère pas les mécanismes d'assimilation du MPTP et de la 6-OHDA. Le MPTP, après avoir traversé la barrière hémato-encéphalique, est oxydé en MPDP⁺ par la MAO-B, puis s'oxyde spontanément en MPP⁺, ce qui lui permet d'être internalisé dans les neurones

dopaminergiques par le transporteur DAT. Pour que notre modèle soit valide, on comprend bien que la lumière proche infrarouge ne doit pas modifier l'activité ni de la MAO-B, ni de DAT.

D'autre part, DAT est également impliqué dans l'internalisation de la 6-OHDA dans les neurones dopaminergiques.

Notre équipe d'accueil a montré que la lumière proche infrarouge à une puissance optique de 30 mW (puissance en sortie de dispositif d'illumination externe chez la souris MPTP) ne dénaturait pas le MPTP en solution injectable (données non publiées).

D'autre part, nos résultats Figure V-5 et Figure V-6 montrent, *in vitro*, à température physiologique (37 °C), que la lumière proche infrarouge à 670 et à 810 nm, à une puissance de 160 μ W optiques, ne modifie pas l'activité ni de la MAO-B, ni de DAT. Comme vu dans la section VI.2, cette puissance optique en sortie de fibre apporte une puissance résiduelle, dans le milieu d'étude, estimée équivalente à celle reçue par les neurones dopaminergiques de la substance noire, aussi bien chez les souris MPTP que chez les rats 6-OHDA. Dans leur ensemble, ces résultats nous permettent de penser que la lumière proche infrarouge n'agit pas sur les mécanismes d'assimilation des neurotoxines. Ainsi, aussi bien le MPTP que la 6-OHDA jouent leur rôle toxique et induisent une destruction des neurones dopaminergiques de la substance noire des animaux, accompagnée des troubles moteurs propres à ces modèles. La préservation de ces neurones, et la réduction des troubles moteurs semblent donc bien être dues à un effet neuroprotecteur de la lumière proche infrarouge sur les cellules lésées des rongeurs.

De plus, nous avons montré (section V.3.2) qu'une illumination 48 heures après l'injection de MPTP restaure efficacement les capacités motrices des souris, et préserve les neurones dopaminergiques restants. Ceci tend à confirmer que le fait d'injecter le MPTP, puis d'illuminer dans les minutes qui suivent (application du MPTP et de la lumière quasi-simultanée) n'est pas un biais expérimental.

En résumé, toutes ces données confirment 1 – la validité des résultats obtenus par mon équipe d'accueil, et 2 – la pertinence des modèles animaux choisis pour le présent travail.

VI.5. POTENTIEL THERAPEUTIQUE D'UNE ILLUMINATION PROCHE INFRAROUGE DANS LA MALADIE DE PARKINSON

L'un des objectifs principaux de ma thèse est de valider le potentiel neuroprotecteur d'une illumination proche infrarouge dans la maladie de Parkinson. Les premières études *in vitro* qui ont montré le potentiel neuroprotecteur de la LLLTpi ont rapporté une diminution de la mort neuronale, une augmentation du taux d'ATP cellulaire et une diminution du taux de marqueurs du stress oxydatif intra et extracellulaire. Ces études ont été réalisées sur les neurones striataux et corticaux de rats, après exposition à la roténone ou au MPP^{1209,218}. Plus récemment, Shaw et al¹⁹⁵ ont démontré *in vivo* le potentiel neuroprotecteur de la LLLTpi dans un modèle souris MPTP aigu. Plusieurs études ont confirmé ces résultats, sur des modèles MPTP aigus^{146,195,199,200} ou chroniques¹⁶⁴ de la maladie.

Nous venons conforter ces études en montrant sur plusieurs modèles de la maladie, sur plusieurs espèces, et à travers plusieurs paradigmes expérimentaux, le potentiel neuroprotecteur de la LLLTpi. En effet, nous confirmons la capacité des lumières à 670 et 810 nm à d'une part protéger les neurones dopaminergiques, mais également améliorer les capacités motrices des souris MPTP. Nous avons également montré ce potentiel chez le rat (section V.2.1), lors d'une illumination intracérébrale à 670 nm, aussi bien au niveau histologique, que comportemental. Moro et al, 2014²⁰⁰ avaient déjà apporté une preuve de faisabilité d'une telle illumination intracérébrale et de sa pertinence, sur un modèle MPTP souris, pour la protection des neurones dopaminergiques, mais n'avait pas confirmé ces résultats sur le plan comportemental. A notre connaissance, notre étude sur le rat 6-OHDA est donc la première à montrer :

- 1- La faisabilité d'une illumination continue intracérébrale chez le rat pendant 23 jours.
- 2- Le potentiel neuroprotecteur de la LLLTpi sur un modèle 6-OHDA rat de la maladie de Parkinson.
- 3- Une diminution du comportement rotatoire sous apomorphine de rats hémi-parkinsoniens.
- 4- Une neuroprotection « vraie ». En effet, nous montrons que l'illumination proche infrarouge augmente non seulement le nombre de cellules TH⁺, mais également le nombre de cellules marquées au marquage de Nissl, par rapport au groupe 6-OHDA non illuminé.

Une partie de notre équipe d'accueil a également démontré le potentiel neuroprotecteur de la LLLTpi sur un modèle MPTP primates de la maladie de Parkinson²⁰¹. Ceci, couplé aux études sur d'autres pathologies montrant le potentiel thérapeutique de la LLLTpi²⁰⁴⁻²¹⁴, va dans le sens d'un caractère ubiquitaire du mécanisme d'action de celle-ci.

En somme, le potentiel neuroprotecteur de la lumière proche infrarouge est à présent démontré sur plusieurs espèces animales, chez lesquelles le modèle parkinsonien a été induit de manières

différentes (souris MPTP aigue, rat 6-OHDA unilatéral, PNH MPTP aigue et semi-chronique²⁰¹), avec différentes toxines. L'efficacité de notre stratégie neuroprotectrice sur autant de modèles différents est un argument de poids en faveur de son efficacité potentielle sur la pathologie humaine. En effet, un modèle animal ne mime pas parfaitement la pathologie humaine. Chaque toxine, protocole d'induction, espèce animale, mime des manifestations biologiques de la pathologie qui lui sont propres. En ce sens, si une thérapeutique est efficace sur un grand nombre d'espèces et de toxines, il est fort probable que son efficacité soit conservée sur la pathologie humaine. C'est le cas de la lumière proche infrarouge à 670 nm. Récemment, une étude d'une autre équipe, réalisée sur un modèle par injection virale intracérébrale d'alpha-synucléine, est venu confirmer nos résultats en démontrant l'efficacité d'une illumination proche infrarouge sur la protection neuronale²⁴⁸.

Les deux questions principales qui se posent à ce stade du travail de recherche sont :

- 1- Comment peut-on optimiser l'efficacité du traitement ?
- 2- Comment la lumière proche infrarouge agit sur les cellules pour les protéger ?

Rappelons l'objectif principal du projet Nlr dans lequel s'inscrit mon travail : développer une nouvelle stratégie de neuroprotection fiable et rapidement applicable à l'humain. En ce sens, et sans négliger l'importance de la compréhension des mécanismes mis en œuvre, nous avons choisi d'orienter cette thèse sur la compréhension et l'optimisation des paramètres lumineux permettant d'obtenir un traitement d'efficacité maximum. Ce travail d'optimisation s'est axé autour de trois points :

- 1- Influence de la longueur d'onde.
- 2- Influence de la fenêtre temporelle de traitement.
- 3- Effet dose (énergie lumineuse, puissance optique, durée d'illumination).

VI.6. COMPARAISON ET ASSOCIATION DES POTENTIELS NEUROPROTECTEURS DE DEUX LONGUEURS D'ONDE : 670 ET 810 NM

La grande majorité des études sur le potentiel neuroprotecteur de la LLLTpi a été réalisée à une longueur d'onde de 670 nm. Peu d'études ont testé d'autres longueurs d'onde, comme 808-810 nm, par exemple. Notons l'étude de Trimmer et al²¹⁹, observant qu'une illumination à 810 nm rétablit les mouvements mitochondriaux le long des axones de cellules hybrides, comportant de l'ADN mitochondrial de patients parkinsoniens ; ces mêmes mouvements étant dégradés en l'absence de lumière.

Nous montrons ici qu'une illumination à 810 nm, dans des conditions expérimentales similaires à celles utilisées dans les études références de notre équipe, préserve l'activité locomotrice de souris MPTP et protège leurs neurones dopaminergiques de la substance noire compacte.

De précédents travaux menés à Clinatéc ont suggéré une protection neuronale approchant les 100 % chez les souris MPTP illuminées à 670 nm, bien que ce pourcentage n'ait pas été atteint dans notre étude à 810 nm. Il est intéressant de noter qu'une illumination à 810 nm préserve jusqu'à 100 % de l'activité motrice des souris MPTP. En effet, de telles performances chez des souris MPTP traitées avec une lumière à 670 nm n'ont jamais été montrées. Dans la mesure où ces observations proviennent d'études différentes, il nous a semblé nécessaire de réaliser une étude comparative de ces deux longueurs d'onde, sur la base des deux hypothèses de travail :

- 1- La lumière à 810 nm pourrait être préférable dans la préservation des performances motrices, alors que la lumière à 670 nm semble avoir un effet supérieur sur la protection neuronale.
- 2- L'association des deux longueurs d'onde pourrait induire un effet thérapeutique maximum, aussi bien sur les performances motrices que la protection des neurones dopaminergiques des souris MPTP.

Les résultats de cette étude comparative sont présentés section V.3.1.

Sur le plan comportemental, la lumière à 810 nm favorise une préservation motrice par rapport aux performances du groupe MPTP non traité, avec une significativité plus grande que celle observée avec la lumière à 670 nm. En revanche, nous n'avons pas observé de différence statistiquement significative entre les deux longueurs d'onde. Sur le plan histologique, les deux longueurs d'onde semblent induire une protection neuronale équivalente, avec un nombre de cellules TH⁺ similaire au groupe Saline.

Dans ces conditions expérimentales, notre hypothèse n°1 n'a pas été vérifiée. Nous ne pouvons donc pas conclure sur un avantage majeur d'une longueur d'onde sur une autre, aussi bien dans la préservation de l'activité locomotrice que dans la protection des neurones dopaminergiques.

La question suivante est celle de la pertinence d'un « cocktail » des deux longueurs d'ondes. Pour comprendre notre hypothèse de travail du « cocktail », nous pouvons visualiser les deux longueurs d'onde comme deux principes actifs différents. Nous avons suggéré précédemment que ces deux principes actifs ne présenteraient pas d'avantage l'un par rapport à l'autre. Toutefois, le « cocktail » des deux est-il pertinent ? Il y a deux façons d'envisager ce « cocktail » :

- 1- Soit les deux longueurs d'onde appliquées simultanément.
- 2- Soit les deux longueurs d'ondes appliquées l'une après l'autre.

VI.6.1. Applications simultanées des deux longueurs d'onde

Les groupes 670+810sim et 670+810sim⁺ ont bénéficié d'une illumination avec les deux longueurs d'ondes simultanément, soit à une puissance optique globale identique aux groupes 670 et 810 (30 mW, 670+810sim), soit à une puissance optique globale doublée (60 mW, 670+810sim⁺).

Dans nos conditions, et avec le modèle MPTP aigu utilisé, le groupe 670+810sim a des résultats similaires à ceux du groupe 670 nm, aussi bien sur le plan comportemental qu'histologique (Figure V-19 et Figure V-20). Il semble donc que cette condition d'illumination apporte peu de bénéfice par rapport à une illumination à 670 ou 810 nm seules. Le groupe 670+810sim⁺, quant à lui, ne bénéficie pas d'une amélioration comportementale par rapport au groupe MPTP non traité, mais présente une protection neuronale similaire à celle observée dans les groupes 670 et 810 nm.

En somme, il semblerait qu'augmenter la puissance optique, dans ces conditions, n'apporte pas de bénéfice particulier, mais pourrait tendre, au contraire, à réduire l'efficacité du traitement. Toutefois, il apparaît nécessaire de reproduire une telle étude sur un modèle de la pathologie à plus long terme, et présentant une récupération fonctionnelle moins précoce, de sorte à confirmer ou infirmer nos observations.

VI.6.2. Applications différées des deux longueurs d'onde

Il s'agit ici des groupes 670+810sép et 670+810sép⁺. Le groupe 670+810sép a bénéficié d'une durée d'illumination identique aux groupes 670 et 810 (90 s), alors que le groupe 670+810sép⁺ a bénéficié d'une durée d'illumination doublée (180 s). Ces deux groupes présentent des performances motrices similaires au groupe 810 (pas de différence significative avec le groupe 670), ainsi qu'une protection neuronale identique aux groupes 810 et 670 nm.

Ces deux conditions d'illumination semblent donc présenter un véritable potentiel thérapeutique dans notre modèle MPTP, mais dont le bénéfice n'apparaît pas majeur par rapport aux groupes 670 et 810 nm.

L'ensemble de nos résultats ne permet pas de conclure sur un avantage thérapeutique du 670 ou du 810 l'un par rapport à l'autre. D'autre part, le couplage de ces deux longueurs d'ondes, en simultané ou non, n'apporterait pas de bénéfice particulier à notre stratégie thérapeutique. Compte-tenu de la complexité technique de l'association de deux longueurs d'onde distinctes par rapport à l'utilisation d'une seule, ces paradigmes n'ont pas été retenus pour la suite de ce travail de thèse. Enfin, puisque 1 – la littérature scientifique est beaucoup plus fournie à 670 nm qu'à 810 nm et 2 – l'ensemble du projet Nlr a été débuté avec la longueur d'onde 670 nm, nous avons choisi de continuer ce projet de thèse avec cette longueur d'onde.

VI.7. CONDITIONS OPTIMALES D'APPLICATION DE LA LUMIERE A 670 NM

Pour rappel, dans l'ensemble de cette section, le terme « efficacité thérapeutique » est défini de la manière suivante :

$$\frac{\text{Perf groupe d'intérêt} - \text{Perf groupe MPTP}}{\text{Perf groupe contrôle} - \text{Perf groupe MPTP}}$$

Avec Perf = Activité motrice (étude comportementale), ou nombre de cellules TH⁺ (étude histologique). Perf groupe MPTP = Efficacité 0 (pas de traitement). Perf groupe contrôle = Efficacité 100 % (animaux non malades).

La notion d'efficacité désigne le potentiel thérapeutique d'une illumination proche infrarouge sur les modèles rongeurs choisis. Elle ne saurait être interprétée comme une extrapolation sur l'efficacité thérapeutique envisagée chez l'humain.

Une question centrale de l'optimisation du traitement proche infrarouge dans la maladie de Parkinson est celle de la fenêtre thérapeutique. En effet, si spontanément, apporter un maximum d'énergie lumineuse sans créer de lésion semblerait être la stratégie à adopter pour obtenir le meilleur effet neuroprotecteur, la question ne s'avère pas aussi simple.

Rojas et al²²⁵ suggèrent qu'une illumination continue n'apporte pas de bénéfice supplémentaire par rapport à une illumination sous forme de sessions de 360 secondes. Moro et al, 2014²⁰⁰ confirment ces résultats sur un modèle souris MPTP. Les deux études tendent, par ailleurs, à montrer que l'illumination continue serait moins efficace qu'une illumination discontinue. Néanmoins, il est à noter que la quantité d'énergie délivrée, dans ces deux études, est nettement plus importante en continu qu'en discontinu (puissance égale, mais durée augmentée). Nous avons donc deux paramètres modifiés à la fois, dans ces deux paradigmes (durée et quantité d'énergie globale). Il est donc difficile, dans ces conditions, de conclure sur l'effet de l'un ou l'autre sur l'efficacité thérapeutique du NIR.

Nos résultats, dans notre protocole sur le potentiel neuroprotecteur d'une illumination proche infrarouge sur un modèle rat de la maladie de Parkinson, vont dans le sens de la tendance apparue dans les deux études citées précédemment, à savoir qu'une illumination discontinue serait préférable à une illumination continue. En effet, l'application d'une lumière continue pendant 3 semaines, sur un modèle 6-OHDA, n'a pas apporté pas de bénéfice observable avec le paradigme employé, par rapport à une illumination discontinue, sous la forme 90 secondes, matin et soir (NIRP). L'illumination discontinue tendrait même à induire une meilleure neuroprotection que l'illumination continue.

Afin de savoir si c'est le fait d'illuminer en continu ou l'augmentation de la quantité de lumière qui dégrade l'effet neuroprotecteur, nous avons réalisé deux groupes continus distincts Nlrc et Nlrc+. Dans le groupe Nlrc, la quantité globale d'énergie délivrée est identique à NlrcP ; dans le groupe Nlrc+, c'est la puissance optique appliquée qui est identique, ce qui implique une quantité d'énergie délivrée supérieure au bout de trois semaines (à comprendre selon le rapport $Puissance \times durée = Energie$).

Dans les deux groupes continus, nous observons une efficacité thérapeutique inférieure à celle montrée dans le groupe NlrcP, et ce, quelle que soit la quantité d'énergie délivrée. Ces résultats renforcent l'hypothèse qu'une illumination discontinue semblerait préférable à une illumination continue.

Par ailleurs, nos résultats suggèrent qu'augmenter la quantité globale d'énergie optique reçue en augmentant le nombre de jours de traitements Nlrc apporterait un intérêt limité du point de vue de la protection des neurones dans ce modèle de la maladie de Parkinson.

Pour résumé intermédiaire :

| Paramètre étudié | Influence sur le potentiel thérapeutique | Type d'influence |
|---------------------------------------|--|---|
| Illumination 2 x 90 s pendant 2 jours | Paradigme historique | Paradigme historique |
| Illumination continue | Oui | Pas de bénéfice par rapport à l'illumination discontinue, voire moins bon effet |
| Augmentation du nombre de jours | Non | / |

Tableau VI-1 : Résumé intermédiaire des paramètres d'illumination influençant l'efficacité thérapeutique, sur la base des hypothèses formulées d'après les résultats obtenus.

Dans la mesure où modifier le nombre de flashes lumineux dans le temps n'influe pas sur l'efficacité thérapeutique, nous avons souhaité étudier l'effet qu'aurait la modification des paramètres d'illumination, au sein d'un flash, sur cette efficacité. Pour ce faire, nous avons réalisé une nouvelle étude, sur la souris MPTP, avec une illumination discontinue, mais à puissances optiques et durées d'illumination variables selon les groupes. Ainsi, nous varions également l'énergie lumineuse délivrée, selon l'équation :

$$P \times Du = Eop$$

Avec la puissance P (Watts), la durée Du (secondes) et l'énergie optique E_{op} (Joules).

Tout d'abord, dans nos conditions expérimentales, nos résultats suggèrent que l'énergie E_{op} aurait peu d'influence sur le potentiel thérapeutique, sur les performances motrices des souris (Figure V-21), ou sur la protection des neurones dopaminergiques de la substance noire (Figure V-22). Ceci serait de plus cohérent avec l'analyse proposée précédemment. Ainsi, ce ne serait pas par l'augmentation globale de E_{op} que l'on parviendrait à améliorer l'efficacité du traitement lumineux dans la maladie de Parkinson.

Toutefois, si la quantité d'énergie délivrée semble ne pas influencer sur le traitement, nos résultats laissent à penser que la manière dont la lumière est délivrée aurait une importance, même si on se restreint à une illumination non continue. En effet, nous proposons qu'il existe une fenêtre au sein de laquelle l'efficacité thérapeutique (E_T) est significative (Figure V-23 et Figure V-24). Sur le plan histologique, nos résultats suggèrent que la quasi intégralité de la plage...

$$E_{T \text{ histologie}} = Du \in \{9; 900\} \cap P \in \{3; 90\}$$

... présenterait un potentiel neuroprotecteur, du moins sur le modèle souris MPTP aigu. Toutefois, à l'intérieur de celle-ci, une fenêtre d'efficacité maximum (E_{Tmax}) semble se dessiner :

$$E_{Tmax \text{ histologie}} = Du \in \{90; 180\} \cap P \in \{15; 90\}$$

Au sein de cette fenêtre, le potentiel neuroprotecteur est de l'ordre de 85-100 %.

Sur le plan comportemental, la fenêtre efficace E_T semble plus restreinte :

$$E_{T \text{ comportement}} = Du \in \{45; 180\} \cap P \in \{15; 90\}$$

Il est intéressant de noter que l'efficacité, sur les performances motrices, ne dépasse pas les 55 % dans la plage étudiée. Ici encore, une fenêtre plus restreinte d'efficacité maximum semble se dessiner :

$$E_{Tmax \text{ comportement}} = Du \in \{90; 180\} \cap P \in \{15; 90\}$$

Remarquons par ailleurs que $E_{Tmax \text{ histologie}}$ et $E_{Tmax \text{ comportement}}$ sont identiques. Nous pouvons en conclure que la fenêtre d'efficacité maximum globale, dans nos conditions expérimentales, est :

$$E_{Tmax} = Du \in \{90; 180\} \cap P \in \{15; 90\}$$

Nous proposons la représentation schématique suivante :

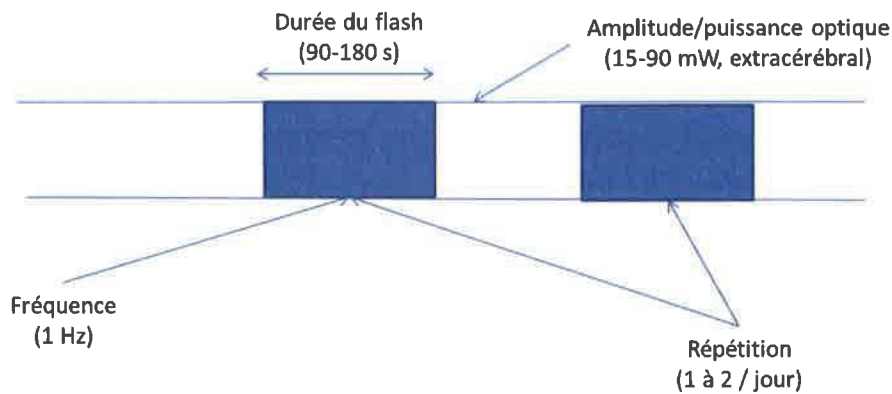


Figure VI-1 : Représentation schématique de la fenêtre d'efficacité maximum d'une illumination proche infrarouge chez la souris MPTP.

De plus, sur la base de l'analyse des cartes d'efficacité (Figure V-23 et Figure V-24) nous proposons que le paramètre majeur de l'efficacité thérapeutique serait la durée d'application d'un flash lumineux. En effet, dès lors que la puissance appliquée apparaît suffisante (15 mW), il semblerait que celle-ci n'influe plus sur l'efficacité (sort d'effet tout-ou-rien). Par contre, nous observons un effet cloche de la durée d'illumination, avec un seuil bas (90 s) et un seuil haut (180 s), en dessous et au-dessus desquels l'efficacité serait réduite (effet en cloche).

La Figure VI-2 schématise ces hypothèses.

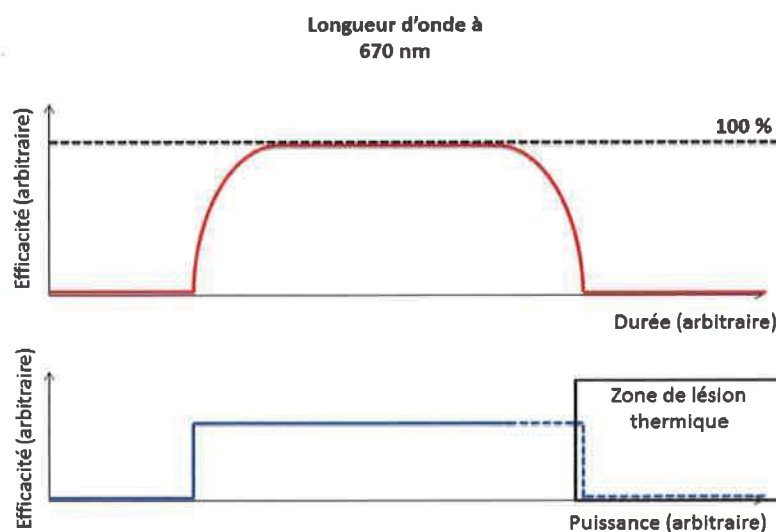


Figure VI-2 : Schéma théorique explicatif de l'effet de la durée d'illumination et de la puissance optique sur l'efficacité thérapeutique.

Les mécanismes d'action de la lumière proche infrarouge ne sont pas parfaitement connus à ce jour. Néanmoins, quels qu'ils soient, il semble évident qu'une durée minimum de l'ordre de la minute est nécessaire pour les activer et qu'une activation de trop longue durée : 1 – n'aurait pas d'intérêt, et 2 – induirait une désactivation, une inhibition, un rétrocontrôle négatif, etc à l'origine d'une baisse du potentiel neuroprotecteur de la lumière proche infrarouge à 670 nm dans la maladie de Parkinson.

En résumé :

| Paramètre étudié | Influence sur le potentiel thérapeutique | Type d'influence |
|--|---|--|
| Illumination 2 x 90 s pendant 2 jours | Paradigme historique | Paradigme historique |
| Illumination continue | Oui | Pas de bénéfice par rapport à l'illumination discontinue, voire moins bon effet |
| Augmentation du nombre de jours de traitements | Non | / |
| Quantité globale d'énergie | Non | / |
| Puissance optique | Oui | Existence d'un seuil bas à dépasser pour obtenir l'effet |
| Durée du flash | Oui | Effet en cloche, seuils bas et hauts. La durée doit être comprise entre les deux pour obtenir l'effet. |

Tableau VI-2 : Résumé global des paramètres d'illumination influençant l'efficacité thérapeutique, sur la base des hypothèses formulées d'après les résultats obtenus.

VI.8. DUREE D'ACTION D'UN TRAITEMENT LUMINEUX

La question suivante est celle de la durée d'action d'un traitement lumineux. Nous avons choisi d'y répondre à travers l'étude d'un prétraitement et d'un post-traitement, dans notre modèle souris MPTP.

Nous avons réalisé cette étude avec l'hypothèse de travail suivante : quels que soient les paramètres optiques nécessaires à l'induction des mécanismes neuroprotecteurs, ces derniers semblent continuer d'être actifs, même après l'arrêt de l'illumination.

Dans la section V.3.2, nous observons qu'un prétraitement de 48 heures par rapport à l'intoxication au MPTP induit une préservation des performances motrices des souris similaire à celle observée chez les animaux traités simultanément à leur intoxication. De plus, le prétraitement engendre également une neuroprotection similaire à ceux-ci, dans nos conditions. Il semble donc que nous sommes bien ici en présence d'un mécanisme d'action durable dans le temps. En effet, 48 heures après l'arrêt du prétraitement (donc au moment de la deuxième injection de MPTP), les souris prétraitées présentent toujours une protection motrice et neuronale équivalente aux souris simultanées. Quels qu'ils soient, les mécanismes induits auraient donc une durée d'au moins 48 heures.

Afin de confirmer cette hypothèse, il faudra réaliser une étude avec un modèle de la maladie à plus long terme, dans laquelle des animaux prétraités avec un seul flash sont intoxiqués au MPTP avec un intervalle variable depuis l'illumination.

D'autre part, dans nos conditions, les souris post-traitées présentent une récupération motrice maximale (~ 100 %) seulement 20 minutes après avoir été post-traitées. Ceci est d'autant plus marquant qu'un point de mesure de l'activité locomotrice juste avant le traitement lumineux a montré que ces mêmes souris présentaient une dégradation motrice similaire aux souris non traitées. Autrement dit, il semblerait qu'une illumination de 90 secondes permet, 20 minutes plus tard, une récupération complète de l'activité motrice de ces souris. Nous suggérons donc la présence de mécanismes à mise en place rapide (< 20 minutes).

En résumé, sans connaissance des mécanismes moléculaires impliqués, nous proposons ici que le potentiel thérapeutique du NIR serait soutenu par deux dynamiques mécanistiques distinctes et complémentaires :

- 1- Une mise en place rapide de l'effet (< 20 minutes), probablement due à un recrutement moléculaire (chaîne respiratoire, inhibition de la réponse inflammatoire, inhibition des signaux apoptotiques, etc) ou cellulaire (inhibition de la réponse macrophagique, etc).

- 2- Un effet durable, pendant au moins 48 heures (activation de facteurs de transmission, cascade protéique ou énergétique autoalimentée, etc).

**CONCLUSIONS ET
PERSPECTIVES**

VII. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En résumé, les travaux de cette thèse confirment la pertinence de la lumière proche infrarouge à 670 nm comme stratégie neuroprotectrice de la maladie de Parkinson. Nous observons qu'une lumière à 810 nm possède également un potentiel neuroprotecteur, mais n'apporterait probablement pas d'avantage significatif par rapport à 670 nm.

De plus, nous proposons, que la quantité globale d'énergie optique délivrée n'aurait pas d'influence sur l'efficacité thérapeutique, et ce, quelle que soit la manière d'augmenter la quantité d'énergie (continu *vs* discontinu, nombre de jours de traitement, énergie d'un flash lumineux). En outre, dans l'objectif d'optimiser le potentiel neuroprotecteur de notre stratégie, il semble plus pertinent de travailler sur la relation durée d'un flash lumineux — puissance optique de ce flash. Nous proposons en effet qu'il existe un seuil bas de puissance optique en dessous duquel il n'y aurait pas d'effet thérapeutique ; une fois le seuil dépassé, la puissance optique semble ne plus influencer sur le potentiel thérapeutique (sorte d'effet « tout-ou-rien »). L'augmentation trop importante de la puissance optique finit par provoquer un échauffement puis des lésions thermiques. Concernant la durée d'illumination, nous suggérons l'existence d'un effet en cloche, avec un seuil bas et un seuil haut, au sein duquel l'efficacité serait maximum, et en dehors desquels elle serait fortement réduite.

Nos résultats ont un impact sur la conception de l'essai clinique à venir. En effet, si les résultats quantitatifs obtenus dans le présent travail, sur rongeurs, sont difficilement transposables à l'humain, le précédent résumé qualitatif est à prendre en compte dans la conception de l'essai clinique. De façon à confirmer les hypothèses que nous émettons, et pour obtenir des données quantifiées plus facilement transposables chez l'humain, il est nécessaire de reproduire ces travaux sur la fenêtre énergétique lumineuse chez le PNH. Ces travaux sur les rongeurs pourront servir de base, de façon à réduire au maximum les cohortes de PNH.

A ce jour, la durée d'action d'un seul flash lumineux n'est pas bien connue. Nous proposons une efficacité d'au moins 48 heures. L'étude de la durée maximale d'efficacité reste nécessaire. Ceci permettra d'espacer au maximum les flashes successifs chez l'humain, dans un souci évident de confort pour le patient, et de préservation de la batterie de l'implant.

La compréhension des mécanismes moléculaires et biologiques impliqués dans la neuroprotection par illumination proche infrarouge ne faisait pas partie des objectifs de ces travaux. Toutefois, il s'agit d'un champ d'étude qui devra être développé à l'avenir. Ceci participerait à l'optimisation du traitement. Notons que toutes les hypothèses mécanistiques, présentées en début de ce manuscrit, sont en faveur d'un mécanisme ubiquitaire. Ainsi, la lumière proche infrarouge pourrait

présenter un intérêt neuroprotecteur dans d'autres pathologies, telles que la maladie de d'Alzheimer, l'AVC, etc. Il s'agit là de vastes champs de recherche encore peu explorés à ce jour et dont l'intérêt pourrait s'avérer majeur à l'avenir.

En conclusion, à travers ces travaux, nous avons réalisé une première caractérisation des paramètres qui influenceraient l'efficacité thérapeutique. Nous avons également proposé un certain nombre d'hypothèses quant à la manière dont il est possible de les régler pour optimiser le traitement. Ceci pose les bases des travaux précliniques et cliniques à venir.

BIBLIOGRAPHIE

VIII. BIBLIOGRAPHIE

1. Parkinson, J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **14**, 223–236; discussion 222 (2002).
2. Lees, A. J. Unresolved issues relating to the shaking palsy on the celebration of James Parkinson's 250th birthday. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **22 Suppl 17**, S327–334 (2007).
3. Vérin, M. & Defebvre, L. in *La maladie de Parkinson* (Elsevier-Masson, 2011).
4. Blandini, F., Nappi, G., Tassorelli, C. & Martignoni, E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* **62**, 63–88 (2000).
5. Bezard, E., Dovero, S., Imbert, C., Boraud, T. & Gross, C. E. Spontaneous long-term compensatory dopaminergic sprouting in MPTP-treated mice. *Synap. N. Y. N* **38**, 363–368 (2000).
6. Bergman, H. & Deuschl, G. Pathophysiology of Parkinson's disease: from clinical neurology to basic neuroscience and back. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **17 Suppl 3**, S28–40 (2002).
7. Exner, N., Lutz, A. K., Haass, C. & Winklhofer, K. F. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *EMBO J.* **31**, 3038–3062 (2012).
8. Lesage, S. & Brice, A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum. Mol. Genet.* **18**, R48–59 (2009).
9. Ascherio, A. *et al.* Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **60**, 197–203 (2006).
10. Schiesling, C., Kieper, N., Seidel, K. & Krüger, R. Review: Familial Parkinson's disease--genetics, clinical phenotype and neuropathology in relation to the common sporadic form of the disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **34**, 255–271 (2008).
11. Stanley-Jones, D. The anatomy of rigidity and tremor. *J. Nerv. Ment. Dis.* **124**, 163–166 (1956).
12. Delwaide, P. J., Sabbatino, M. & Delwaide, C. Some pathophysiological aspects of the parkinsonian rigidity. *J. Neural Transm. Suppl.* **22**, 129–139 (1986).
13. Wilson. The Croonian lectures on some disorders of mobility and muscle tone, with special reference to the corpus striatum. *Lancet* **209**, 53–62 (1925).

14. Mohr, P. & Volavka, J. Ladislav Haskovec and akathisia: 100th anniversary. *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.* **181**, 537 (2002).
15. Seppi, K. *et al.* The Movement Disorder Society Evidence-Based Medicine Review Update: Treatments for the non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **26 Suppl 3**, S42–80 (2011).
16. Chaudhuri, K. R., Healy, D. G., Schapira, A. H. V. & National Institute for Clinical Excellence. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol.* **5**, 235–245 (2006).
17. Cury, R. G. *et al.* Sensory abnormalities and pain in Parkinson disease and its modulation by treatment of motor symptoms. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* (2015). doi:10.1002/ejp.745
18. Ford, B. Pain in Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **25 Suppl 1**, S98–103 (2010).
19. Duus, P. *Diagnostic neurologique: les bases anatomiques.* (De Boeck Supérieur, 1998).
20. McRitchie, D. A., Cartwright, H. R. & Halliday, G. M. Specific A10 dopaminergic nuclei in the midbrain degenerate in Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* **144**, 202–213 (1997).
21. Rinne, J. O. Nigral degeneration in Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **8 Suppl 1**, S31–35 (1993).
22. Guttman, M., Kish, S. J. & Furukawa, Y. Current concepts in the diagnosis and management of Parkinson's disease. *Can. Med. Assoc. J.* **168**, 293–301 (2003).
23. Riederer, P. & Wuketich, S. Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. *J. Neural Transm.* **38**, 277–301 (1976).
24. Scherman, D. *et al.* Striatal dopamine deficiency in Parkinson's disease: role of aging. *Ann. Neurol.* **26**, 551–557 (1989).
25. Schwarzschild, M. A., Agnati, L., Fuxe, K., Chen, J.-F. & Morelli, M. Targeting adenosine A2A receptors in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* **29**, 647–654 (2006).
26. Hirsch, E., Graybiel, A. M. & Agid, Y. A. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* **334**, 345–348 (1988).

27. Javoy-Agid, F. & Agid, Y. Is the mesocortical dopaminergic system involved in Parkinson disease? *Neurology* **30**, 1326–1330 (1980).
28. Scatton, B., Rouquier, L., Javoy-Agid, F. & Agid, Y. Dopamine deficiency in the cerebral cortex in Parkinson disease. *Neurology* **32**, 1039–1040 (1982).
29. Cash, R. *et al.* Parkinson's disease and dementia: norepinephrine and dopamine in locus ceruleus. *Neurology* **37**, 42–46 (1987).
30. Halliday, G. M., Blumbergs, P. C., Cotton, R. G., Blessing, W. W. & Geffen, L. B. Loss of brainstem serotonin- and substance P-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain Res.* **510**, 104–107 (1990).
31. Jellinger, K. A. Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol. Chem. Neuropathol. Spons. Int. Soc. Neurochem. World Fed. Neurol. Res. Groups Neurochem. Cerebrospinal Fluid* **14**, 153–197 (1991).
32. Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M. & Goedert, M. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 6469–6473 (1998).
33. Engelen, S. Ubiquitination of α -synuclein and autophagy in Parkinson's disease. *Autophagy* **4**, 372–374 (2008).
34. Ishizawa, T., Mattila, P., Davies, P., Wang, D. & Dickson, D. W. Colocalization of tau and alpha-synuclein epitopes in Lewy bodies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62**, 389–397 (2003).
35. Arima, K. *et al.* Cellular co-localization of phosphorylated tau- and NACP/alpha-synuclein-epitopes in lewy bodies in sporadic Parkinson's disease and in dementia with Lewy bodies. *Brain Res.* **843**, 53–61 (1999).
36. Goetz, C. G., Poewe, W., Rascol, O. & Sampaio, C. Evidence-based medical review update: pharmacological and surgical treatments of Parkinson's disease: 2001 to 2004. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **20**, 523–539 (2005).
37. Birkmayer, W. & Hornykiewicz, O. [The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia]. *Wien. Klin. Wochenschr.* **73**, 787–788 (1961).

38. Cotzias, G. C., Papavasiliou, P. S. & Gellene, R. Modification of Parkinsonism--chronic treatment with L-dopa. *N. Engl. J. Med.* **280**, 337–345 (1969).
39. Rascol, O. *et al.* A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1484–1491 (2000).
40. Bergman, H., Wichmann, T., Karmon, B. & DeLong, M. R. The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *J. Neurophysiol.* **72**, 507–520 (1994).
41. Kreiss, D. S., Mastropietro, C. W., Rawji, S. S. & Walters, J. R. The response of subthalamic nucleus neurons to dopamine receptor stimulation in a rodent model of Parkinson's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **17**, 6807–6819 (1997).
42. Vila, M. *et al.* Metabolic activity of the basal ganglia in parkinsonian syndromes in human and non-human primates: a cytochrome oxidase histochemistry study. *Neuroscience* **71**, 903–912 (1996).
43. Bergman, H., Wichmann, T. & DeLong, M. R. Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science* **249**, 1436–1438 (1990).
44. Aziz, T. Z., Peggs, D., Sambrook, M. A. & Crossman, A. R. Lesion of the subthalamic nucleus for the alleviation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism in the primate. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **6**, 288–292 (1991).
45. Benazzouz, A., Gross, C., Féger, J., Boraud, T. & Bioulac, B. Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys. *Eur. J. Neurosci.* **5**, 382–389 (1993).
46. Pollak, P. *et al.* [Effects of the stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson disease]. *Rev. Neurol. (Paris)* **149**, 175–176 (1993).
47. Limousin, P. *et al.* Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* **339**, 1105–1111 (1998).
48. Vingerhoets, F. J. G. *et al.* Subthalamic DBS replaces levodopa in Parkinson's disease: two-year follow-up. *Neurology* **58**, 396–401 (2002).

49. Russmann, H. *et al.* L-dopa-induced dyskinesia improvement after STN-DBS depends upon medication reduction. *Neurology* **63**, 153–155 (2004).
50. Ginsberg, M. D. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* **55**, 363–389 (2008).
51. Rascol, O. ‘Disease-modification’ trials in Parkinson disease: target populations, endpoints and study design. *Neurology* **72**, S51–58 (2009).
52. Maetzler, W., Liepelt, I. & Berg, D. Progression of Parkinson’s disease in the clinical phase: potential markers. *Lancet Neurol.* **8**, 1158–1171 (2009).
53. The Unified Parkinson’s Disease Rating Scale (UPDRS): Status and recommendations. *Mov. Disord.* **18**, 738–750 (2003).
54. Goetz, C. G. *et al.* Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson’s Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **23**, 2129–2170 (2008).
55. Chen, C.-M. *et al.* Increased oxidative damage in peripheral blood correlates with severity of Parkinson’s disease. *Neurobiol. Dis.* **33**, 429–435 (2009).
56. Whone, A. L. *et al.* Slower progression of Parkinson’s disease with ropinirole versus levodopa: The REAL-PET study. *Ann. Neurol.* **54**, 93–101 (2003).
57. Parkinson Study Group. Dopamine transporter brain imaging to assess the effects of pramipexole vs levodopa on Parkinson disease progression. *JAMA* **287**, 1653–1661 (2002).
58. Kong, P. *et al.* Neuroprotection of MAO-B inhibitor and dopamine agonist in Parkinson disease. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 431–439 (2015).
59. Parkinson Study Group. Effects of tocopherol and deprenyl on the progression of disability in early Parkinson’s disease. *N. Engl. J. Med.* **328**, 176–183 (1993).
60. Olanow, C. W. *et al.* The effect of deprenyl and levodopa on the progression of Parkinson’s disease. *Ann. Neurol.* **38**, 771–777 (1995).
61. Shoulson, I. *et al.* Impact of sustained deprenyl (selegiline) in levodopa-treated Parkinson’s disease: a randomized placebo-controlled extension of the deprenyl and tocopherol antioxidative therapy of parkinsonism trial. *Ann. Neurol.* **51**, 604–612 (2002).

62. Pålhagen, S. *et al.* Selegiline slows the progression of the symptoms of Parkinson disease. *Neurology* **66**, 1200–1206 (2006).
63. Schapira, A., Bate, G. & Kirkpatrick, P. Rasagiline. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 625–626 (2005).
64. Schapira, A. H. V. *et al.* Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 845–854 (2006).
65. Youdim, M. B. & Weinstock, M. Molecular basis of neuroprotective activities of rasagiline and the anti-Alzheimer drug TV3326 [(N-propargyl-(3R)aminoindan-5-YL)-ethyl methyl carbamate]. *Cell. Mol. Neurobiol.* **21**, 555–573 (2001).
66. Mandel, S., Weinreb, O., Amit, T. & Youdim, M. B. H. Mechanism of neuroprotective action of the anti-Parkinson drug rasagiline and its derivatives. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **48**, 379–387 (2005).
67. Youdim, M. B. H. *et al.* Rasagiline: neurodegeneration, neuroprotection, and mitochondrial permeability transition. *J. Neurosci. Res.* **79**, 172–179 (2005).
68. Maruyama, W. *et al.* N-Propargyl-1 (R)-aminoindan, rasagiline, increases glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in neuroblastoma SH-SY5Y cells through activation of NF-kappaB transcription factor. *Neurochem. Int.* **44**, 393–400 (2004).
69. Parkinson Study Group. A controlled trial of rasagiline in early Parkinson disease: the TEMPO Study. *Arch. Neurol.* **59**, 1937–1943 (2002).
70. Parkinson Study Group. A controlled, randomized, delayed-start study of rasagiline in early Parkinson disease. *Arch. Neurol.* **61**, 561–566 (2004).
71. Carter, A. J. & Müller, R. E. Pramipexole, a dopamine D2 autoreceptor agonist, decreases the extracellular concentration of dopamine in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* **200**, 65–72 (1991).
72. Functional Roles for Dopamine-Receptor Subtypes.: Clinical Neuropharmacology. *LWW* at http://journals.lww.com/clinicalneuropharm/Fulltext/1995/01001/Functional_Roles_for_Dopamine_Receptor_Subtypes_.5.aspx
73. Schapira, A. H. V. Neuroprotection in PD--a role for dopamine agonists? *Neurology* **61**, S34–42 (2003).

74. Schapira, A. H. V. & Olanow, C. W. Rationale for the use of dopamine agonists as neuroprotective agents in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **53 Suppl 3**, S149–157; discussion S157–159 (2003).
75. Le, W. D. & Jankovic, J. Are dopamine receptor agonists neuroprotective in Parkinson's disease? *Drugs Aging* **18**, 389–396 (2001).
76. Ogawa, N. *et al.* Bromocriptine protects mice against 6-hydroxydopamine and scavenges hydroxyl free radicals in vitro. *Brain Res.* **657**, 207–213 (1994).
77. Muralikrishnan, D. & Mohanakumar, K. P. Neuroprotection by bromocriptine against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity in mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **12**, 905–912 (1998).
78. Sethy, V. H., Wu, H., Oostveen, J. A. & Hall, E. D. Neuroprotective effects of the dopamine agonists pramipexole and bromocriptine in 3-acetylpyridine-treated rats. *Brain Res.* **754**, 181–186 (1997).
79. Takashima, H., Tsujihata, M., Kishikawa, M. & Freed, W. J. Bromocriptine protects dopaminergic neurons from levodopa-induced toxicity by stimulating D(2)receptors. *Exp. Neurol.* **159**, 98–104 (1999).
80. Gassen, M., Gross, A. & Youdim, M. B. Apomorphine enantiomers protect cultured pheochromocytoma (PC12) cells from oxidative stress induced by H₂O₂ and 6-hydroxydopamine. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **13**, 242–248 (1998).
81. Asanuma, M. *et al.* Protective effects of pergolide on dopamine levels in the 6-hydroxydopamine-lesioned mouse brain. *Arch. Int. Pharmacodyn. Thérapie* **329**, 221–230 (1995).
82. Kitamura, Y., Kohno, Y., Nakazawa, M. & Nomura, Y. Inhibitory effects of talipexole and pramipexole on MPTP-induced dopamine reduction in the striatum of C57BL/6N mice. *Jpn. J. Pharmacol.* **74**, 51–57 (1997).
83. Zou, L. *et al.* Pramipexole inhibits lipid peroxidation and reduces injury in the substantia nigra induced by the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice. *Neurosci. Lett.* **281**, 167–170 (2000).

84. Vu, T. Q. *et al.* Pramipexole attenuates the dopaminergic cell loss induced by intraventricular 6-hydroxydopamine. *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996* **107**, 159–176 (2000).
85. Schapira, A. H. V. Mitochondrial disease. *Lancet Lond. Engl.* **368**, 70–82 (2006).
86. Schapira, A. H. V. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* **7**, 97–109 (2008).
87. Schapira, A. H. Mitochondrial diseases. *The Lancet* **379**, 1825–1834 (2012).
88. Shults, C. W. *et al.* Effects of coenzyme Q10 in early Parkinson disease: evidence of slowing of the functional decline. *Arch. Neurol.* **59**, 1541–1550 (2002).
89. NINDS NET-PD Investigators. A randomized clinical trial of coenzyme Q10 and GPI-1485 in early Parkinson disease. *Neurology* **68**, 20–28 (2007).
90. Storch, A. *et al.* Randomized, double-blind, placebo-controlled trial on symptomatic effects of coenzyme Q(10) in Parkinson disease. *Arch. Neurol.* **64**, 938–944 (2007).
91. Müller, T., Büttner, T., Gholipour, A. F. & Kuhn, W. Coenzyme Q10 supplementation provides mild symptomatic benefit in patients with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **341**, 201–204 (2003).
92. Matthews, R. T. *et al.* Creatine and cyclocreatine attenuate MPTP neurotoxicity. *Exp. Neurol.* **157**, 142–149 (1999).
93. Bender, A. *et al.* Creatine supplementation in Parkinson disease: a placebo-controlled randomized pilot trial. *Neurology* **67**, 1262–1264 (2006).
94. Boka, G. *et al.* Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **172**, 151–154 (1994).
95. Gören, B. *et al.* Investigation of neuroprotective effects of cyclooxygenase inhibitors in the 6-hydroxydopamine induced rat Parkinson model. *Turk. Neurosurg.* **19**, 230–236 (2009).
96. Chen, H. *et al.* Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Arch. Neurol.* **60**, 1059–1064 (2003).
97. NINDS NET-PD Investigators. A randomized, double-blind, futility clinical trial of creatine and minocycline in early Parkinson disease. *Neurology* **66**, 664–671 (2006).

98. Gordon, P. H. *et al.* Efficacy of minocycline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a phase III randomised trial. *Lancet Neurol.* **6**, 1045–1053 (2007).
99. Carlsson, A., Lindqvist, M. & Magnusson, T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* **180**, 1200 (1957).
100. Ghosh, B., Antonio, T., Reith, M. E. A. & Dutta, A. K. Discovery of 4-(4-(2-((5-Hydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl)(propyl)amino)ethyl)piperazin-1-yl)quinolin-8-ol and its analogues as highly potent dopamine D2/D3 agonists and as iron chelator: in vivo activity indicates potential application in symptomatic and neuroprotective therapy for Parkinson's disease. *J. Med. Chem.* **53**, 2114–2125 (2010).
101. Niswender, C. M. *et al.* Discovery, characterization, and antiparkinsonian effect of novel positive allosteric modulators of metabotropic glutamate receptor 4. *Mol. Pharmacol.* **74**, 1345–1358 (2008).
102. Austin, P. J. *et al.* Symptomatic and neuroprotective effects following activation of nigral group III metabotropic glutamate receptors in rodent models of Parkinson's disease. *Br. J. Pharmacol.* **160**, 1741–1753 (2010).
103. Shook, B. C. *et al.* In vivo characterization of a dual adenosine A2A/A1 receptor antagonist in animal models of Parkinson's disease. *J. Med. Chem.* **53**, 8104–8115 (2010).
104. Heeringa, M. J. & Abercrombie, E. D. Biochemistry of somatodendritic dopamine release in substantia nigra: an in vivo comparison with striatal dopamine release. *J. Neurochem.* **65**, 192–200 (1995).
105. Robledo, P. & Feger, J. Acute monoaminergic depletion in the rat potentiates the excitatory effect of the subthalamic nucleus in the substantia nigra pars reticulata but not in the pallidal complex. *J. Neural Transm. Gen. Sect.* **86**, 115–126 (1991).
106. Benazzouz, A. *et al.* Intraoperative microrecordings of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **17 Suppl 3**, S145–149 (2002).
107. Ungerstedt, U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharmacol.* **5**, 107–110 (1968).

108. Sakai, K. & Gash, D. M. Effect of bilateral 6-OHDA lesions of the substantia nigra on locomotor activity in the rat. *Brain Res.* **633**, 144–150 (1994).
109. Vernon, A. C., Croucher, M. J. & Dexter, D. T. Additive neuroprotection by metabotropic glutamate receptor subtype-selective ligands in a rat Parkinson's model. *Neuroreport* **19**, 475–478 (2008).
110. Iczkiewicz, J. *et al.* The RGD-containing peptide fragment of osteopontin protects tyrosine hydroxylase positive cells against toxic insult in primary ventral mesencephalic cultures and in the rat substantia nigra. *J. Neurochem.* **114**, 1792–1804 (2010).
111. Luthman, J., Fredriksson, A., Lewander, T., Jonsson, G. & Archer, T. Effects of d-amphetamine and methylphenidate on hyperactivity produced by neonatal 6-hydroxydopamine treatment. *Psychopharmacology (Berl.)* **99**, 550–557 (1989).
112. Mazziro, E. A., Reams, R. R. & Soliman, K. F. A. The role of oxidative stress, impaired glycolysis and mitochondrial respiratory redox failure in the cytotoxic effects of 6-hydroxydopamine in vitro. *Brain Res.* **1004**, 29–44 (2004).
113. Perumal, A. S., Gopal, V. B., Tordzro, W. K., Cooper, T. B. & Cadet, J. L. Vitamin E attenuates the toxic effects of 6-hydroxydopamine on free radical scavenging systems in rat brain. *Brain Res. Bull.* **29**, 699–701 (1992).
114. Kunikowska, G. & Jenner, P. 6-Hydroxydopamine-lesioning of the nigrostriatal pathway in rats alters basal ganglia mRNA for copper, zinc- and manganese-superoxide dismutase, but not glutathione peroxidase. *Brain Res.* **922**, 51–64 (2001).
115. Oestreicher, E. *et al.* Degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons increases iron within the substantia nigra: a histochemical and neurochemical study. *Brain Res.* **660**, 8–18 (1994).
116. Glinka, Y., Gassen, M. & Youdim, M. B. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *J. Neural Transm. Suppl.* **50**, 55–66 (1997).
117. Jenner, P. Clues to the mechanism underlying dopamine cell death in Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry Suppl.* **22–28** (1989).
118. Whitton, P. S. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br. J. Pharmacol.* **150**, 963–976 (2007).

119. Tansey, M. G. & Goldberg, M. S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol. Dis.* **37**, 510–518 (2010).
120. Gerhard, A. *et al.* In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **21**, 404–412 (2006).
121. Cicchetti, F. *et al.* Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. *Eur. J. Neurosci.* **15**, 991–998 (2002).
122. Mogi, M. *et al.* Increase in level of tumor necrosis factor-alpha in 6-hydroxydopamine-lesioned striatum in rats is suppressed by immunosuppressant FK506. *Neurosci. Lett.* **289**, 165–168 (2000).
123. Mogi, M. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci. Lett.* **165**, 208–210 (1994).
124. Piallat, B., Benazzouz, A. & Benabid, A. L. Subthalamic nucleus lesion in rats prevents dopaminergic nigral neuron degeneration after striatal 6-OHDA injection: behavioural and immunohistochemical studies. *Eur. J. Neurosci.* **8**, 1408–1414 (1996).
125. Sauer, H. & Oertel, W. H. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* **59**, 401–415 (1994).
126. Przedborski, S. *et al.* Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience* **67**, 631–647 (1995).
127. Lee, C. S., Sauer, H. & Bjorklund, A. Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairments following axon terminal lesion by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Neuroscience* **72**, 641–653 (1996).
128. Kirik, D., Rosenblad, C. & Björklund, A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp. Neurol.* **152**, 259–277 (1998).
129. Blandini, F., Levandis, G., Bazzini, E., Nappi, G. & Armentero, M.-T. Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following

- intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. *Eur. J. Neurosci.* **25**, 397–405 (2007).
130. Cadet, J. L. & Zhu, S. M. The intrastriatal 6-hydroxydopamine model of hemiparkinsonism: quantitative receptor autoradiographic evidence of correlation between circling behavior and presynaptic as well as postsynaptic nigrostriatal markers in the rat. *Brain Res.* **595**, 316–326 (1992).
131. Kirik, D., Georgievska, B., Rosenblad, C. & Björklund, A. Delayed infusion of GDNF promotes recovery of motor function in the partial lesion model of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* **13**, 1589–1599 (2001).
132. Spillantini, M. G. *et al.* Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**, 839–840 (1997).
133. Baba, M. *et al.* Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am. J. Pathol.* **152**, 879–884 (1998).
134. Braak, E. *et al.* alpha-synuclein immunopositive Parkinson's disease-related inclusion bodies in lower brain stem nuclei. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **101**, 195–201 (2001).
135. Um, J. W. *et al.* Formation of parkin aggregates and enhanced PINK1 accumulation during the pathogenesis of Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **393**, 824–828 (2010).
136. Blanchard, V. *et al.* Long-term induction of tyrosine hydroxylase expression: compensatory response to partial degeneration of the dopaminergic nigrostriatal system in the rat brain. *J. Neurochem.* **64**, 1669–1679 (1995).
137. Stanic, D., Finkelstein, D. I., Bourke, D. W., Drago, J. & Horne, M. K. Timecourse of striatal re-innervation following lesions of dopaminergic SNpc neurons of the rat. *Eur. J. Neurosci.* **18**, 1175–1188 (2003).
138. Hefti, F., Melamed, E., Sahakian, B. J. & Wurtman, R. J. Circling behavior in rats with partial, unilateral nigro-striatal lesions: effect of amphetamine, apomorphine, and DOPA. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **12**, 185–188 (1980).
139. Davis, G. C. *et al.* Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.* **1**, 249–254 (1979).

140. Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W. & Irwin, I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* **219**, 979–980 (1983).
141. Burns, R. S. *et al.* A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 4546–4550 (1983).
142. Jenner, P. *et al.* 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in the common marmoset. *Neurosci. Lett.* **50**, 85–90 (1984).
143. Langston, J. W. & Ballard, P. Parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): implications for treatment and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Can. J. Neurol. Sci. J. Can. Sci. Neurol.* **11**, 160–165 (1984).
144. Johannessen, J. N., Chiueh, C. C., Burns, R. S. & Markey, S. P. Differences in the metabolism of MPTP in the rodent and primate parallel differences in sensitivity to its neurotoxic effects. *Life Sci.* **36**, 219–224 (1985).
145. Sonsalla, P. K. & Heikkila, R. E. Neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and methamphetamine in several strains of mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **12**, 345–354 (1988).
146. Moro, C. *et al.* Photobiomodulation preserves behaviour and midbrain dopaminergic cells from MPTP toxicity: evidence from two mouse strains. *BMC Neurosci.* **14**, 40 (2013).
147. Riachi, N. J., LaManna, J. C. & Harik, S. I. Entry of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine into the rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **249**, 744–748 (1989).
148. Javitch, J. A., D'Amato, R. J., Strittmatter, S. M. & Snyder, S. H. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 2173–2177 (1985).
149. Nicklas, W. J., Youngster, S. K., Kindt, M. V. & Heikkila, R. E. MPTP, MPP⁺ and mitochondrial function. *Life Sci.* **40**, 721–729 (1987).
150. Karunakaran, S. *et al.* Selective activation of p38 mitogen-activated protein kinase in dopaminergic neurons of substantia nigra leads to nuclear translocation of p53 in 1-methyl-4-

- phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **28**, 12500–12509 (2008).
151. Saporito, M. S., Thomas, B. A. & Scott, R. W. MPTP activates c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) and its upstream regulatory kinase MKK4 in nigrostriatal neurons in vivo. *J. Neurochem.* **75**, 1200–1208 (2000).
152. Hassouna, I., Wickert, H., Zimmermann, M. & Gillardon, F. Increase in bax expression in substantia nigra following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) treatment of mice. *Neurosci. Lett.* **204**, 85–88 (1996).
153. Vila, M. *et al.* Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 2837–2842 (2001).
154. Jackson-Lewis, V., Jakowec, M., Burke, R. E. & Przedborski, S. Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegener. J. Neurodegener. Disord. Neuroprotection Neuroregeneration* **4**, 257–269 (1995).
155. Tatton, N. A. & Kish, S. J. In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining. *Neuroscience* **77**, 1037–1048 (1997).
156. Hadjiconstantinou, M., Cavalla, D., Anthoupoulou, E., Laird, H. E. & Neff, N. H. N-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine increases acetylcholine and decreases dopamine in mouse striatum: both responses are blocked by anticholinergic drugs. *J. Neurochem.* **45**, 1957–1959 (1985).
157. Meredith, G. E., Totterdell, S., Beales, M. & Meshul, C. K. Impaired glutamate homeostasis and programmed cell death in a chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* **219**, 334–340 (2009).

158. Ferraro, T. N., Golden, G. T., DeMattei, M., Hare, T. A. & Fariello, R. G. Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on levels of glutathione in the extrapyramidal system of the mouse. *Neuropharmacology* **25**, 1071–1074 (1986).
159. Kurkowska-Jastrzebska, I., Wrońska, A., Kohutnicka, M., Członkowski, A. & Członkowska, A. The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. *Exp. Neurol.* **156**, 50–61 (1999).
160. Hébert, G., Arsaut, J., Dantzer, R. & Demotes-Mainard, J. Time-course of the expression of inflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in the striatum and mesencephalon of mice injected with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, a dopaminergic neurotoxin. *Neurosci. Lett.* **349**, 191–195 (2003).
161. Jackson-Lewis, V. & Przedborski, S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nat. Protoc.* **2**, 141–151 (2007).
162. Ferger, B., Teismann, P., Earl, C. D., Kuschinsky, K. & Oertel, W. H. The protective effects of PBN against MPTP toxicity are independent of hydroxyl radical trapping. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **65**, 425–431 (2000).
163. Gibrat, C. *et al.* Differences between subacute and chronic MPTP mice models: investigation of dopaminergic neuronal degeneration and alpha-synuclein inclusions. *J. Neurochem.* **109**, 1469–1482 (2009).
164. Peoples, C. *et al.* Photobiomodulation enhances nigral dopaminergic cell survival in a chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* (2012). doi:10.1016/j.parkreldis.2012.01.005
165. Przedborski, S. *et al.* The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *J. Neurochem.* **76**, 1265–1274 (2001).
166. Meredith, G. E. *et al.* Lysosomal malfunction accompanies alpha-synuclein aggregation in a progressive mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res.* **956**, 156–165 (2002).
167. Fornai, F. *et al.* Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 3413–3418 (2005).

168. Alvarez-Fischer, D. *et al.* Modelling Parkinson-like neurodegeneration via osmotic minipump delivery of MPTP and probenecid. *J. Neurochem.* **107**, 701–711 (2008).
169. Shimoji, M., Zhang, L., Mandir, A. S., Dawson, V. L. & Dawson, T. M. Absence of inclusion body formation in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **134**, 103–108 (2005).
170. Miller, D. B., Ali, S. F., O'Callaghan, J. P. & Laws, S. C. The impact of gender and estrogen on striatal dopaminergic neurotoxicity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **844**, 153–165 (1998).
171. Yang, Y. X., Wood, N. W. & Latchman, D. S. Molecular basis of Parkinson's disease. *Neuroreport* **20**, 150–156 (2009).
172. Cookson, M. R. & Bandmann, O. Parkinson's disease: insights from pathways. *Hum. Mol. Genet.* **19**, R21–27 (2010).
173. Hardy, J. Genetic analysis of pathways to Parkinson disease. *Neuron* **68**, 201–206 (2010).
174. Chesselet, M.-F. In vivo alpha-synuclein overexpression in rodents: a useful model of Parkinson's disease? *Exp. Neurol.* **209**, 22–27 (2008).
175. Dawson, T. M., Ko, H. S. & Dawson, V. L. Genetic animal models of Parkinson's disease. *Neuron* **66**, 646–661 (2010).
176. Lin, X. *et al.* Leucine-rich repeat kinase 2 regulates the progression of neuropathology induced by Parkinson's-disease-related mutant alpha-synuclein. *Neuron* **64**, 807–827 (2009).
177. Perez, F. A., Curtis, W. R. & Palmiter, R. D. Parkin-deficient mice are not more sensitive to 6-hydroxydopamine or methamphetamine neurotoxicity. *BMC Neurosci.* **6**, 71 (2005).
178. Kitada, T. *et al.* Impaired dopamine release and synaptic plasticity in the striatum of PINK1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 11441–11446 (2007).
179. Goldberg, M. S. *et al.* Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ-1. *Neuron* **45**, 489–496 (2005).
180. Kitada, T., Tong, Y., Gautier, C. A. & Shen, J. Absence of nigral degeneration in aged parkin/DJ-1/PINK1 triple knockout mice. *J. Neurochem.* **111**, 696–702 (2009).
181. Zetterström, R. H. *et al.* Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* **276**, 248–250 (1997).

182. Nunes, I., Tovmasian, L. T., Silva, R. M., Burke, R. E. & Goff, S. P. Pitx3 is required for development of substantia nigra dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 4245–4250 (2003).
183. Hwang, D.-Y., Ardayfio, P., Kang, U. J., Semina, E. V. & Kim, K.-S. Selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra of Pitx3-deficient aphakia mice. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **114**, 123–131 (2003).
184. Jankovic, J., Chen, S. & Le, W. D. The role of Nurr1 in the development of dopaminergic neurons and Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* **77**, 128–138 (2005).
185. Le, W. *et al.* Decreased NURR1 gene expression in patients with Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* **273**, 29–33 (2008).
186. Bergman, O. *et al.* PITX3 polymorphism is associated with early onset Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* **31**, 114–117 (2010).
187. Le, W. *et al.* Selective agenesis of mesencephalic dopaminergic neurons in Nurr1-deficient mice. *Exp. Neurol.* **159**, 451–458 (1999).
188. Le, W., Conneely, O. M., He, Y., Jankovic, J. & Appel, S. H. Reduced Nurr1 expression increases the vulnerability of mesencephalic dopamine neurons to MPTP-induced injury. *J. Neurochem.* **73**, 2218–2221 (1999).
189. Jiang, C. *et al.* Age-dependent dopaminergic dysfunction in Nurr1 knockout mice. *Exp. Neurol.* **191**, 154–162 (2005).
190. Van den Munckhof, P., Gilbert, F., Chamberland, M., Lévesque, D. & Drouin, J. Striatal neuroadaptation and rescue of locomotor deficit by L-dopa in aphakia mice, a model of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **96**, 160–170 (2006).
191. Reinhart, F. *et al.* 810nm near-infrared light offers neuroprotection and improves locomotor activity in MPTP-treated mice. *Neurosci. Res.* (2014). doi:10.1016/j.neures.2014.11.005
192. Anandhan, A. *et al.* Resveratrol attenuates oxidative stress and improves behaviour in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) challenged mice. *Ann. Neurosci.* **17**, 113–119 (2010).

193. Olsson, M., Nikkhah, G., Bentlage, C. & Björklund, A. Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **15**, 3863–3875 (1995).
194. Mogi, M. *et al.* Homospecific activity (activity per enzyme protein) of tyrosine hydroxylase increases in parkinsonian brain. *J. Neural Transm.* **72**, 77–82 (1988).
195. Shaw, V. E. *et al.* Neuroprotection of midbrain dopaminergic cells in MPTP-treated mice after near-infrared light treatment. *J. Comp. Neurol.* **518**, 25–40 (2010).
196. Peoples, C. *et al.* Survival of Dopaminergic Amacrine Cells after Near-Infrared Light Treatment in MPTP-Treated Mice. *ISRN Neurol.* **2012**, 850150 (2012).
197. Purushothuman, S., Nandasena, C., Johnstone, D. M., Stone, J. & Mitrofanis, J. The impact of near-infrared light on dopaminergic cell survival in a transgenic mouse model of parkinsonism. *Brain Res.* **1535**, 61–70 (2013).
198. El Massri, N. *et al.* The effect of different doses of near infrared light on dopaminergic cell survival and gliosis in MPTP-treated mice. *Int. J. Neurosci.* 1–20 (2014). doi:10.3109/00207454.2014.994063
199. Johnstone, D. M. *et al.* Indirect application of near infrared light induces neuroprotection in a mouse model of parkinsonism - an abscopal neuroprotective effect. *Neuroscience* **274**, 93–101 (2014).
200. Moro, C. *et al.* Photobiomodulation inside the brain: a novel method of applying near-infrared light intracranially and its impact on dopaminergic cell survival in MPTP-treated mice. *J. Neurosurg.* **120**, 670–683 (2014).
201. Darlot, F. *et al.* Near-infrared light is neuroprotective in a monkey model of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* (2015). doi:10.1002/ana.24542
202. Whelan, H. T. *et al.* Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *J. Clin. Laser Med. Surg.* **19**, 305–314 (2001).
203. Romeo, S. *et al.* Bright light exposure reduces TH-positive dopamine neurons: implications of light pollution in Parkinson's disease epidemiology. *Sci. Rep.* **3**, 1395 (2013).

204. Eells, J. T. *et al.* Therapeutic photobiomodulation for methanol-induced retinal toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3439–3444 (2003).
205. Natoli, R. *et al.* 670nm photobiomodulation as a novel protection against retinopathy of prematurity: evidence from oxygen induced retinopathy models. *PloS One* **8**, e72135 (2013).
206. Natoli, R. *et al.* Gene and noncoding RNA regulation underlying photoreceptor protection: microarray study of dietary antioxidant saffron and photobiomodulation in rat retina. *Mol. Vis.* **16**, 1801–1822 (2010).
207. Ando, T. *et al.* Comparison of therapeutic effects between pulsed and continuous wave 810-nm wavelength laser irradiation for traumatic brain injury in mice. *PloS One* **6**, e26212 (2011).
208. Oron, A. *et al.* Near infrared transcranial laser therapy applied at various modes to mice following traumatic brain injury significantly reduces long-term neurological deficits. *J. Neurotrauma* **29**, 401–407 (2012).
209. Lapchak, P. A., Wei, J. & Zivin, J. A. Transcranial infrared laser therapy improves clinical rating scores after embolic strokes in rabbits. *Stroke J. Cereb. Circ.* **35**, 1985–1988 (2004).
210. Detaboada, L. *et al.* Transcranial application of low-energy laser irradiation improves neurological deficits in rats following acute stroke. *Lasers Surg. Med.* **38**, 70–73 (2006).
211. Moges, H. *et al.* Light therapy and supplementary Riboflavin in the SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Lasers Surg. Med.* **41**, 52–59 (2009).
212. Muili, K. A., Gopalakrishnan, S., Meyer, S. L., Eells, J. T. & Lyons, J.-A. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice by photobiomodulation induced by 670 nm light. *PloS One* **7**, e30655 (2012).
213. Michalikova, S., Ennaceur, A., van Rensburg, R. & Chazot, P. L. Emotional responses and memory performance of middle-aged CD1 mice in a 3D maze: effects of low infrared light. *Neurobiol. Learn. Mem.* **89**, 480–488 (2008).
214. De Taboada, L. *et al.* Transcranial laser therapy attenuates amyloid- β peptide neuropathology in amyloid- β protein precursor transgenic mice. *J. Alzheimers Dis. JAD* **23**, 521–535 (2011).

215. Lampl, Y. *et al.* Infrared laser therapy for ischemic stroke: a new treatment strategy: results of the NeuroThera Effectiveness and Safety Trial-1 (NEST-1). *Stroke J. Cereb. Circ.* **38**, 1843–1849 (2007).
216. Lapchak, P. A. Taking a light approach to treating acute ischemic stroke patients: transcranial near-infrared laser therapy translational science. *Ann. Med.* **42**, 576–586 (2010).
217. Schiffer, F. *et al.* Psychological benefits 2 and 4 weeks after a single treatment with near infrared light to the forehead: a pilot study of 10 patients with major depression and anxiety. *Behav. Brain Funct. BBF* **5**, 46 (2009).
218. Ying, R., Liang, H. L., Whelan, H. T., Eells, J. T. & Wong-Riley, M. T. T. Pretreatment with near-infrared light via light-emitting diode provides added benefit against rotenone- and MPP+-induced neurotoxicity. *Brain Res.* **1243**, 167–173 (2008).
219. Trimmer, P. A. *et al.* Reduced axonal transport in Parkinson's disease cybrid neurites is restored by light therapy. *Mol. Neurodegener.* **4**, 26 (2009).
220. Whelan, H. *et al.* Harnessing the cell's own ability to repair and prevent neurodegenerative disease. *SPIE Newsroom* **2008**, 1–3 (2008).
221. Desmet, K. D. *et al.* Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation. *Photomed. Laser Surg.* **24**, 121–128 (2006).
222. Lu, J., Zhou, T. C. & Saper, C. B. Identification of wake-active dopaminergic neurons in the ventral periaqueductal gray matter. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **26**, 193–202 (2006).
223. Chung, H. *et al.* The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann. Biomed. Eng.* **40**, 516–533 (2012).
224. Hamblin, M. R. & Demidova, T. N. Mechanisms of low level light therapy. in **6140**, 1–12 (2006).
225. Gonzalez-Lima, F. & Rojas. Low-level light therapy of the eye and brain. *Eye Brain* **49** (2011). doi:10.2147/EB.S21391
226. Quirk, B. J., Torbey, M., Buchmann, E., Verma, S. & Whelan, H. T. Near-infrared photobiomodulation in an animal model of traumatic brain injury: improvements at the behavioral and biochemical levels. *Photomed. Laser Surg.* **30**, 523–529 (2012).

227. Byrnes, K. R. *et al.* Light promotes regeneration and functional recovery and alters the immune response after spinal cord injury. *Lasers Surg. Med.* **36**, 171–185 (2005).
228. Oron, A. *et al.* Low-level laser therapy applied transcranially to rats after induction of stroke significantly reduces long-term neurological deficits. *Stroke J. Cereb. Circ.* **37**, 2620–2624 (2006).
229. Tuby, H., Maltz, L. & Oron, U. Induction of autologous mesenchymal stem cells in the bone marrow by low-level laser therapy has profound beneficial effects on the infarcted rat heart. *Lasers Surg. Med.* **43**, 401–409 (2011).
230. Tuby, H., Maltz, L. & Oron, U. Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis. *Lasers Surg. Med.* **38**, 682–688 (2006).
231. Begum, R., Powner, M. B., Hudson, N., Hogg, C. & Jeffery, G. Treatment with 670 nm light up regulates cytochrome C oxidase expression and reduces inflammation in an age-related macular degeneration model. *PloS One* **8**, e57828 (2013).
232. Zhao, G., Guo, K. & Dan, J. case analysis of Parkinson's disease treated by endonasal low energy He-Ne laser. *Acta Acad. Med. Qingdao Univ.* **39**, 398 (36).
233. Burchman, M. A. Using Photobiomodulation on a severe Parkinson's patient to enable extractions, root canal treatment and partial denture fabrication. *J Laser Dent* **19**, 297–300 (2011).
234. Maloney, R., Shanks, S. & Maloney, J. THE APPLICATION OF LOW-LEVEL LASER THERAPY FOR THE SYMPTOMATIC CARE OF LATE STAGE PARKINSON'S DISEASE: A NON-CONTROLLED, NON-RANDOMIZED STUDY. in *LASERS IN SURGERY AND MEDICINE* 61–61 (WILEY-LISS DIV JOHN WILEY & SONS INC, 111 RIVER ST, HOBOKEN, NJ 07030 USA, 2010).
235. Sotocinal, S. G. *et al.* The Rat Grimace Scale: A partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol. Pain* **7**, 55 (2011).
236. Deumens, R., Blokland, A. & Prickaerts, J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp. Neurol.* **175**, 303–317 (2002).

237. Schober, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* **318**, 215–224 (2004).
238. Shaw, V. E. *et al.* Patterns of Cell Activity in the Subthalamic Region Associated with the Neuroprotective Action of Near-Infrared Light Treatment in MPTP-Treated Mice. *Park. Dis.* **2012**, (2012).
239. Mitrofanis, J. *et al.* The potential of light therapy in Parkinson's disease. *ChronoPhysiology Ther.* **1** (2014). doi:10.2147/CPT.S57180
240. Kubelka–Munk model of light transmission through diffuse scattering media. at <http://www.openoptogenetics.org/index.php?title=Transmission_Through_Brain_Tissue>
241. W. F. Cheong, S. A. P. A Review of the Optical Properties of Tissues. *Quantum Electron. IEEE J. Of* **26**, 2166 – 2185 (1991).
242. Stricker, E. M. & Hainsworth, F. R. Evaporative Cooling in the Rat: Interaction with Heat Loss from the Tail. *Q. J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci.* **56**, 231–241 (1971).
243. Hayward, J. N. & Baker, M. A. A comparative study of the role of the cerebral arterial blood in the regulation of brain temperature in five mammals. *Brain Res.* **16**, 417–440 (1969).
244. Przedborski, S. *et al.* The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism. *Restor. Neurol. Neurosci.* **16**, 135–142 (2000).
245. Wallace, B. A. *et al.* Survival of midbrain dopaminergic cells after lesion or deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in MPTP-treated monkeys. *Brain J. Neurol.* **130**, 2129–2145 (2007).
246. Moro, C. *et al.* Photobiomodulation preserves behaviour and midbrain dopaminergic cells from MPTP toxicity: evidence from two mouse strains. *BMC Neurosci.* **14**, 40 (2013).
247. Ferro, M. M. *et al.* Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. *J. Neurosci. Methods* **148**, 78–87 (2005).
248. Oueslati, A. *et al.* Photobiomodulation Suppresses Alpha-Synuclein-Induced Toxicity in an AAV-Based Rat Genetic Model of Parkinson's Disease. *PloS One* **10**, e0140880 (2015).

ANNEXES

IX. ANNEXES

IX.1. LISTE DES PUBLICATIONS

Reinhart, Florian, Nabil El Massri, Fannie Darlot, Napoleon Torres, Daniel M. Johnstone, Claude Chabrol, Thomas Costecalde, et al. 2014. “*810nm near-Infrared Light Offers Neuroprotection and Improves Locomotor Activity in MPTP-Treated Mice.*” *Neuroscience Research*, November. doi:10.1016/j.neures.2014.11.005.

Reinhart, Florian, Nabil El Massri, Claude Chabrol, Celine Cretallaz, Daniel M. Johnstone, Napoleon Torres, Fannie Darlot, et al. 2015. “*Intracranial Application of near-Infrared Light in a Hemi-Parkinsonian Rat Model: The Impact on Behavior and Cell Survival.*” *Journal of Neurosurgery*, November, 1–13. doi:10.3171/2015.5.JNS15735

El Massri, Nabil, Daniel M. Johnstone, Cassandra L. Peoples, Cécile Moro, **Florian Reinhart**, Napoleon Torres, Jonathan Stone, Alim-Louis Benabid, and John Mitrofanis. 2014. “*The Effect of Different Doses of near Infrared Light on Dopaminergic Cell Survival and Gliosis in MPTP-Treated Mice.*” *The International Journal of Neuroscience*, December, 1–20. doi:10.3109/00207454.2014.994063.

Johnstone, D. M., N. el Massri, C. Moro, S. Spana, X. S. Wang, N. Torres, C. Chabrol, X. De Jaeger, **F. Reinhart**, et al. 2014. “*Indirect Application of near Infrared Light Induces Neuroprotection in a Mouse Model of Parkinsonism - an Abscopal Neuroprotective Effect.*” *Neuroscience* 274 (August): 93–101. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.05.023.

Darlot, Fannie, Cécile Moro, Nabil El Massri, Claude Chabrol, Daniel M. Johnstone, **Florian Reinhart**, Diane Agay, et al. 2015. “*Near-Infrared Light Is Neuroprotective in a Monkey Model of Parkinson’s Disease.*” *Annals of Neurology*, October. doi:10.1002/ana.24542.

En supplément, un article scientifique est soumis et quatre sont en cours de rédaction, tous en premier auteur, au moment de la rédaction du présent manuscrit.

IX.2. LISTE DES COMMUNICATIONS AFFICHEES

- F. Reinhart**, V Auboiron, C. Chabrol, F. Darlot, N. Torres-Martinez, D. Johnstone, A.-L. Benabid, J. Mitrofanis, C. Moro. *High resolution MR-thermometry is a proper method to characterize thermal safety of chronic implantable medical device*. Program No. 850.24. 2014 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2014. Online.
- F. Reinhart**, N. E. Massri, N. Torres-Martinez, F. Darlot, C. Chabrol, D. Johnstone, J. Stone, J. Mitrofanis, A.-L. Benabid, C. Moro. *The neuroprotective effects of near infrared light (670nm) when applied at different periods in relation to MPTP insult*. Program No. 678.03. 2015 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2015. Online.
- F. Reinhart**, F. Darlot, C. Chabrol, C. Gaude, D. Ratel, N. Torres-Martinez, A.-L. Benabid, C. Moro. *Because it does not influence MAO-B and DAT activities, the Near Infrared light therapy is a promising protective strategy against Parkinson's disease*. Program No. 678.25. 2015 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2015. Online.
- F. Darlot, C. Moro, N. Torres-Martinez, C. Chabrol, **F. Reinhart**, D. Agay, T. Costecalde, J. Mitrofanis, A. Benabid. *Effects of intra-cerebral near infra-red illumination on mptp monkeys*. Program No. 218.11. 2014 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2014. Online.
- F. Darlot, C. Yeromonahos, A. Mombrun, **F. Reinhart**, D. Agay, N. Torres-Martinez, V. Jousseume, C. Moro, F. Berger, A.-L. Benabid, A. Bouamrani. *Kinetics of MPTP elimination in non-human primate's urine intoxicated by MPTP: study by a new nano-interface based Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Mass Spectrometry approach*. Program No. 132.11. 2015 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2015. Online.

IX.3. RESUME

La maladie de Parkinson est la seconde pathologie neurodégénérative la plus fréquente, après la maladie d'Alzheimer. Elle se manifeste par une mort progressive et continue des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée, accompagnée de troubles moteurs et non moteurs lourdement handicapants. La maladie de Parkinson touche près de 6,3 millions de personnes dans le monde, avec une répartition homogène sur l'ensemble de la planète.

Il existe plusieurs thérapeutiques permettant de diminuer les symptômes des patients. Les plus efficaces sont la dopa-thérapie et la stimulation cérébrale profonde. Toutefois, à ce jour, aucune stratégie visant à protéger les neurones dopaminergiques de la dégénérescence n'a démontré son efficacité chez l'humain. En parallèle, un nombre grandissant d'études suggère le potentiel cytoprotecteur d'une illumination proche infrarouge. Récemment, plusieurs études ont observé le potentiel neuroprotecteur de cette gamme de lumière sur des modèles rongeurs de la maladie de Parkinson.

L'objectif du présent travail est de confirmer ce potentiel et d'entamer l'optimisation de son efficacité afin de préfigurer l'essai clinique à venir.

Pour ce faire, avec les modèles MPTP souris et 6-OHDA unilatéral rat, nous avons étudié la faisabilité d'une illumination intracérébrale chronique, ainsi que l'influence de la longueur d'onde, de la fenêtre temporelle de traitement (pré-, post-traitement), de la quantité globale d'énergie optique apportée (continu vs discontinu, nombre de flashes lumineux, énergie d'un seul flash), de la durée d'un flash et de la puissance optique appliquée sur l'efficacité thérapeutique.

Nous démontrons ici la faisabilité d'une illumination intracérébrale chronique et son potentiel neuroprotecteur. Nous proposons que les longueurs d'onde 670 et 810 nm protègent toutes deux les neurones dopaminergiques dans nos modèles d'étude. Nous suggérons une mise en place rapide des mécanismes de protection (< 20 min), et un maintien dans le temps pendant au moins 48 heures. De plus, nous observons qu'une illumination discontinue semble préférable à une illumination continue. La quantité globale d'énergie optique appliquée semble ne pas avoir de rôle significatif sur l'efficacité du traitement. En revanche, il existerait un seuil bas pour la puissance optique, qui semble régie par un effet « tout-ou-rien ». Nous proposons que l'efficacité thérapeutique serait également liée à la durée d'un flash lumineux, par « un effet en cloche ».

Tous ces résultats sont en adéquation avec la littérature scientifique qu'ils complètent. Couplés aux travaux sur les primates non humains de mon équipe d'accueil, les résultats de cette thèse serviront de base de travail à la conception du futur essai clinique.

IX.4. ABSTRACT

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease, after Alzheimer disease. It is characterized by a slow, continuous death of dopaminergic neurons in the nigrostriatal pathway, followed by severe motor and non-motor symptoms. Parkinson's disease affects 6.3 million peoples, with a homogeneous distribution worldwide.

There are several symptomatic strategies applied in clinic, such as the dopa-therapy (gold standard) and the deep brain stimulation. However, these therapeutical approaches are not neuroprotective. Indeed, to date, there is no strategy able to effectively slow or rescue the course of the disease. Alternatively, a growing number of studies suggest the cytoprotective potential of a near infrared illumination. Recently, several studies observed the neuroprotective potential of these wavelengths in rodent models of Parkinson disease.

The aim of this work is to confirm and optimize the efficacy of a near infrared treatment in Parkinson's disease, as the first step for the future clinical trial.

We used the MPTP mice and the 6-OHDA unilateral rat models. In this works we assess the feasibility and the effectiveness of an intracerebral chronical illumination. We also measured the influence of the wavelength, the time window (pre-, post-treatment), the global optical energy delivered (continuous vs discontinuous, number of flashes, energy of one flash), the duration of one flash and the optical power on the therapeutical efficacy.

We demonstrate here the feasibility of an intracerebral chronical illumination and its neuroprotective potential. We suggest that the 670 and 810 nm wavelengths both protect the dopaminergic cells in the rodent models, and produce a quick activation of the protective mechanisms (< 20 min). The neuroprotective effect seems to stay effective at least 48 hours after the illumination. Moreover, we propose that a discontinuous illumination seems better than a continuous one. We suggest that the global optical energy delivered has no significant influence on the efficacy. In contrast, the optical power seems to have an everything-or-nothing effect. The therapeutical efficacy is also flash duration dependent (bell effect).

All these results complete the scientific literature. Together with the work on non-human primates from my team, these results will be useful to design the future clinical trial.