



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université Rouen Normandie

Etude des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les effets neuroprotecteurs du gliopeptide Octadecaneuropeptide (ODN) dans un modèle murin de la Maladie de Parkinson

Présentée et soutenue par
Seyma BAHDOUDI

Thèse soutenue publiquement le 28 novembre 2017
devant le jury composé de

Mr Serge BIRMAN	DR CNRS, UMR CNRS 8249, ESPCI Paris	Rapporteur
M Pascal SALIN	DR CNRS, UMR 7288 CNRS, Université Aix-Marseille	Rapporteur
Mme Marie-Christine TONON	DR INSERM, U1239, Université de Rouen	Examineur
M Gérard LIZARD	DR INSERM, Université de Bourgogne Franche-Comté	Examineur
Mme Olfa MASMOUID-KOUKI	PR Université Tunis El Manar	Examineur
M David VAUDRY	CR Inserm, U1239, Université de Rouen	Directeur de thèse

Thèse dirigée par le Dr David VAUDRY, unité INSERM 1239 et Pr Olfa Masmoudi-Kouki, UR11ES09



Remerciements

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au sein de l'Université de Rouen Normandie, dans le laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Inserm U1239, dirigé par le Docteur Youssef Anouar.. A l'issue de la rédaction de cette recherche, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de « l'apprenti-chercheur ».

Je voudrais tout d'abord remercier les membres du Jury

*Le Dr. **Pascal Salin**, directeur de recherche à l'Université Aix-Marseille, qui me fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail. Conscient de la faveur qu'il m'accorde, je souhaite lui témoigner toute ma gratitude.*

*Le Dr. **Serge Birman**, directeur de recherche à ESPCI Paris, pour l'honneur qu'il m'a fait pour sa participation à mon jury de thèse en qualité de rapporteur de mon travail, pour le temps consacré à la lecture de cette thèse, et pour les suggestions et les remarques judicieuses qu'il m'a indiquées.*

*Le Dr. **Gérard Lizard**, directeur de recherche à l'Université de Bourgogne Franche-Comté, a bien voulu examiner ce travail. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour sa présence à ma soutenance de thèse.*

*Le Dr. **Marie-Christine Tonon**, directrice de recherche à l'Université de Rouen, a accepté d'examiner de ce travail et pour son soutien permanent. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma sincère gratitude.*

*Je remercie le Dr. **David Vaudry**, Chargé de Recherche à l'Inserm, de m'avoir intégrée au sein de son équipe et de m'avoir encadrée tout au long de ma thèse. Je le remercie pour sa passion pour son travail, sa disponibilité et sa rigueur scientifique ainsi que pour le temps et la confiance qu'il m'a accordé. Je profite de cette occasion pour lui témoigner ma reconnaissance.*

*Je tiens à remercier Pr. **Olfa Masmoudi-kouki**, Professeur à l'Université de Tunis El Manar, pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'elle a consacré à diriger cette recherche. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité et son respect sans faille, des délais serrés de relecture des documents que je lui ai adressés. J'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral. Merci pour les conseils avisés, l'enthousiasme/positivisme et pour votre bienveillance à mon égard tout au long de ces années, Il y a tant de choses qui vont me manquer et notamment nos discussions scientifiques et nos séjours en France, qui ont beaucoup contribué dans la construction de la personne que je suis aujourd'hui. Les meilleurs souvenirs de ces années ont aussi été les moments passés à travailler ensemble dans la chambre de culture et la salle de chirurgie. J'ai beaucoup appris de vous et je suis admirative de la chercheuse passionnée. Merci, car pendant toutes ces années, vous m'avez transmis avec sagesse et bienveillance le savoir et la passion.*

*Je tiens tous particulièrement à remercier Pr. **Mohamed Amri** ; Professeur de neurophysiologie et de nutrition à la Faculté des Sciences de Tunis, qui m'a accepté et m'a pris en charge au sein de son laboratoire de neurophysiologie fonctionnelle et pathologie.*

*Je souhaite remercier le Dr. **Youssef Anouar**, Directeur de l'unité Inserm 1239, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et d'avoir mis à disposition le matériel nécessaire au bon déroulement de ces travaux de thèse.*

*Je remercie vivement le Dr. **Hubert Vaudry**, pour son aide, ses conseils et sa rigueur.*

*Je remercie le Dr. **Jean Claude Do-Rego** ainsi que Dr. **Jean Luc Do-Régo** pour leur disponibilité, leur collaboration et leur aide pour faire réussir ce travail.*

Je remercie sincèrement Marine Di-giovanni pour son aide à réaliser les longues manipulations de la RT-PCR.

Je voudrais aussi remercier l'ensemble des membres du Laboratoire pour leur aide et soutien tout au long de ce travail de thèse. Je remercie plus spécialement, Auriane, Housni, Julie,, Maria, Marine, Nico, Mahmoud, Pierre-Mickaël, Rhita, Coals, Donovan et Hélène.

Ces dernières années ont été riches en rencontres, je remercie infiniment Fatima et Karima à qui je n'ai jamais su dire toute l'affection que j'ai pour eux, qui furent présents à mes côtés lorsque j'en avais besoin et pour tous les moments inoubliables partagés ensemble.

Je remercie également Houda et Abir pour leur soutien amical.

*Je remercie ma cousine **Salma**, pour tous les moments et pour son soutien et son aide quand j'en avais besoin.*

Enfin, je remercie ceux qui ont veillé sur moi depuis toujours, ceux qui m'ont fait confiance, qui m'ont soutenue sans faille dans tous mes projets et qui ont accepté mes choix sans pour

*autant toujours forcément les comprendre, **Slim et Monia**, vous êtes l'une de mes raisons de vivre, sans eux rien ne serait possible. Ahmed et Aymen et toute ma famille, Je n'aurais rien fait de tout cela sans votre amour.*

Un tout grand merci à mon beau père, Habib, pour en avoir vérifié l'orthographe. Pour quelqu'un qui n'est pas du domaine, c'est un exploit que tu ne te sois pas endormi en le lisant ! Je remercie également, tata et Saoussen qui ont su croire en moi et qui m'ont apporté leur soutien.

*Je remercie chaleureusement mon mari, **Anis**, le père de mon futur bébé, pour sa grande patience, son encouragement, la confiance qu'il m'a témoigné et surtout pour son soutien moral ininterrompu et ses nombreux conseils tout le long de ma thèse.*

Résumé

La maladie de Parkinson (MP) est un trouble neurodégénératif caractérisé par une perte progressive de neurones dopaminergiques (DA) de la substance noire *pars compacta* (SNpc). Différents mécanismes sont associés à la neuropathogénèse de la MP et en particulier le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, le stress oxydatif, l'apoptose et les processus neuro-inflammatoires. L'octadécaneuropeptide (ODN) est un peptide dérivé du *diazepam-binding inhibitor* (DBI) exprimé par les cellules astrogliales, qui exerce une action neuroprotectrice dans un modèle cellulaire *in vitro* de la MP. A ce jour, aucune étude *in vivo* n'a été réalisée, afin de déterminer si les données obtenues sur les modèles cellulaires *in vitro* peuvent être transposées *in vivo*. Le projet de cette thèse consiste ainsi à mettre en évidence l'action protectrice de l'ODN sur la survie des neurones DA de la SNpc dans un modèle murin de la MP et à rechercher les conséquences de l'inactivation du gène du précurseur de l'ODN (DBI) sur la vulnérabilité des neurones DA. Les résultats obtenus montrent qu'une seule injection intra-cérébroventriculaire d'une faible quantité d'ODN (10 ng), 1 h après la dernière administration systémique de 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) prévient significativement la perte des neurones DA dans la substance noire et la dégénérescence de leurs prolongements nerveux vers le striatum comme mesuré par des marquages et des mesures d'expression de la tyrosine hydroxylase. Cet effet neuroprotecteur de l'ODN est accompagné par une réduction du nombre d'astrocytes réactifs, une forte inhibition de l'expression de gènes pro-inflammatoires tels que les interleukines (IL) IL-1 β et IL-6, et *tumor necrosis factor- α* . De plus, l'ODN bloque l'inhibition du gène anti-apoptotique Bcl-2 et la stimulation des gènes pro-apoptotiques Bax et caspase-3, induite par le MPTP dans la SNpc et le striatum. L'ODN réduit également l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de produits d'oxydation lipidique dans les neurones DA. Par ailleurs, les souris *knock-out* DBI (DBI^{-/-}) sont plus vulnérables que les animaux sauvages (DBI^{+/+}) vis-à-vis de la neurotoxicité du MPTP. L'absence de production d'ODN endogène, chez les souris DBI^{-/-} parkinsoniennes, augmente les dommages cellulaires induits par le MPTP, la réactivité gliale, les taux de ROS, l'expression

de cytokines pro-inflammatoires et l'activité de la caspase-3 dans la région nigro-striée. L'ensemble de ces résultats montre que le gliopeptide ODN exerce un puissant effet neuroprotecteur contre la dégénérescence des neurones DA de la SNpc induite par le MPTP, chez la souris. Cette action protectrice met en jeu des mécanismes impliquant l'inhibition des processus neuro-inflammatoires, oxydatifs et apoptotiques. D'autre part, la déficience en ODN potentialise les effets délétères du MPTP, suggérant que ce peptide joue un rôle clé lors de la réponse à un stress cellulaire.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by a progressive loss of loss of dopaminergic (DA) neurons within the substantia nigra pars compacta (SNpc). Different mechanisms are associated with the neuropathogenesis of PD including dysfunction of the mitochondrial respiratory chain, oxidative stress, apoptosis and neuroinflammatory processes. Octadecaneuropeptide (ODN) is a diazepam-binding inhibitor (DBI)-derived peptide, expressed by astrocytes, which protects neurons against oxidative cell damages and apoptosis in an *in vitro* model of PD. Nevertheless, its protective action *in vivo* has never been investigated. Therefore, the aim of the project of this thesis was to investigate whether intracerebroventricular (i.c.v) injection of ODN could prevent DA neuron degeneration in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced mouse model of PD, and to explore the vulnerability of ODN precursor knockout (DBI KO) mice to MPTP-induced neurotoxicity. The results show that a single i.c.v injection of 10 ng/μl ODN, 1 h after the last systemic administration of MPTP, prevents the reduction of the number of tyrosine hydroxylase (TH)-positive cell bodies and fibers in the SNpc and striatum, respectively. Immunofluorescence imaging, Western blot analysis and Q-PCR studies revealed that ODN totally abolished MPTP-induced decrease of TH positive cells, mRNA expression and protein levels. This neuroprotective effect of ODN is accompanied by a reduction in the number of reactive astrocytes, an inhibition of the expression of pro-inflammatory genes such as interleukins (IL) IL-1β and IL-6, and a decrease of tumor necrosis factor -α. In addition, ODN blocks the inhibition of the anti-apoptotic Bcl-2 gene and the stimulation of Bax and caspase-3 expression induced by MPTP in the SNpc and striatum. ODN also reduces the accumulation of reactive oxygen species (ROS) and lipid oxidation products in DA neurons. Furthermore, DBI^{-/-} mice exhibited more vulnerability to MPTP than wild-type animals (DBI^{+/+}). Thus, ODN KO

mice are more sensitive to MPTP-induced inflammatory and oxidative brain damages, suggesting that the endogenous OD may also be neuroprotective. These results indicate that, based on its anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effect, the gliopeptide ODN could lead to the development of effective therapeutic agents for the treatment of cerebral injuries involving oxidative neurodegeneration.

Table des matières

Table des matières.....	9
Liste des communications.....	20
Liste des Figures.....	22
Liste des tableaux.....	24
Etude Bibliographique.....	28
I- La maladie de Parkinson.....	29
1. Histoire de la maladie de Parkinson.....	29
2. Symptômes cliniques de la maladie de Parkinson	30
3. Caractéristiques neurochimiques et neuropathologiques de la maladie de Parkinson.....	31
4. Les causes de la maladie de Parkinson	36
4.1. Facteurs génétiques	36
4.1.1. Gène de l' α -synucléine.....	37
4.1.2. Gène DJ-1	37
4.1.3. Gène de la dardarine	38
4.1.4. Gène PINK1	38
4.2. Facteurs environnementaux	40
5. Mécanismes de neuropathogenèse de la maladie de Parkinson.....	42
5.1. Implication du stress oxydatif	42
5.2. Implication du dysfonctionnement mitochondrial	48
5.3. La Neuroinflammation	50
5.4. Les mécanismes de mort cellulaire	51
6. Traitements.....	53
6.1. Les traitements chirurgicaux	54

6.2. Les traitements médicamenteux	55
6.2.1. La Dopathérapie.....	55
6.2.2. Les agonistes dopaminergiques	57
6.2.3. Les inhibiteurs d'enzymes.....	57
7. Modèle Expérimental d'étude	58
7.1. Caractéristiques du modèle d'intoxication par la 6-OHDA.....	58
7.2. Caractéristiques du modèle d'intoxication par le MPTP	60
II. La Neuroprotection : Implication des facteurs de susceptibilité astrogliale....	64
1. Caractéristiques fonctionnelles des astrocytes	65
2. Rôle des astrocytes dans les processus neurodégénératifs de la maladie de Parkinson.....	69
2.1. Effets bénéfiques des astrocytes réactifs.....	70
2.2. Rôle dégénératif des astrocytes dans la MP.....	72
III. L'endozépine, ODN.....	74
1. Organisation et régulation de l'expression du gène du DBI.....	75
2. Sources d'endozépines dans le SNC	78
3. Structure, maturation et régulation de la libération des endozépines	79
3.1. Structure et maturation.....	79
3.2. Contrôle de la libération de l'ODN.....	81
4. Activités Biologiques de l'ODN dans le SNC	83
4.1. Effets de l'ODN relayés par l'activation des CBR	84
4.2. Effets de l'ODN relayés par le récepteur métabotrope	85
4.3. Effets protecteurs de l'ODN sur les cellules nerveuses	86
Objectifs	90
Matériels & Méthodes	93

I. Modèle animal.....	94
II.Génotypage des animaux ACBP/DBI	94
1. Extraction d'ADN génomique	94
2. Réaction de polymérisation en Chaîne (PCR)	95
3. Electrophorèse.....	95
III. Procédure des injections	95
1. Injection intra-péritonéale	95
2. Injection intra-cérébroventriculaire.....	96
IV. Procédures de traitement.....	96
1. Souris de la lignée Sauvage.....	96
2. Souris transgéniques.....	97
V. Procédures expérimentales.....	97
1. Prélèvement et préparation des tissus	97
2. Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (RT-PCR)	98
2.1. Extraction des ARNm	98
2.2. Dosage de la quantité et qualité de l'ARN.....	98
2.3. Transcription inverse.....	98
2.4. Les étapes de la q-PCR	99
3. Immunohistochimie.....	100
4. Western blot	101
5. Mesure des dommages oxydatifs	102
5.1. Dosage du taux du malondialdéhyde (MDA)	102
5.2. Evaluation de l'accumulation des ROS	103
5.3. Mesure de l'activité de la Caspase-3.....	103

VI- Analyses statistiques.....	103
Résultats.....	105
Discussion.....	122
1.L'ODN prévient chez la souris la perte des neurones dopaminergiques de la SNpc induite par le traitement au MPTP	123
2. Identification des mécanismes cellulaires impliqués dans l'effet neuroprotecteur de l'ODN dans un modèle murin de la MP	126
2.1. Rôle antioxydant de l'ODN	126
2.2. Rôle anti-inflammatoire et anti-apoptotique de l'ODN	128
3. L'ODN, un agent neuroprotecteur endogène ?	130
3.1. Caractéristiques des souris invalidées pour le gène du DBI	130
3.2. Effet de la déficience en ODN sur la sensibilité des neurones dopaminergiques de la SNpc vis-à-vis du MPTP	132
Conclusions & Perspectives	136
Références Bibliographiques.....	142

Liste des abréviations

Actb	Actine b
ADNc	ADN complémentaire
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ARE	<i>Antioxidant response element</i>
ARNm	Ribonucléiques messagers
ATP	Adénosine triphosphate
Aβ	Peptide β -peptide
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell leukemia/lymphoma 2
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BZ	Benzodiazépine
CBR	Central type benzodiazepine receptor
COMT	Catéchol-o méthyltransférase
CRH	<i>Corticotropin-releasing hormone</i>
CTF/NF1	<i>AAT-Binding transcription factor/nuclear factor 1</i>
Cytochrome C	Cytochrome C
DA	Dopamine
DAT	Transporteur membranaire de la dopamine
DBI	<i>Diazepam-binding inhibitor</i>
DDT	Dichloro-diphényl-trichloroéthane
DSC	Débit sanguin cérébral
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
EZ	Endozépine
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>

GABA	Acide γ -aminobutyrique
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GDNF	<i>Glial cell-derived neurotrophic factor</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GGF	Glycine-glycine-phénylalanine
GnRH	Gonadotropin releasing hormone (gonadolibérine)
GPx	Glutathion peroxydase
GP	Globus pallidus
GRE	<i>Glucocorticoid-response element</i>
GSH	Glutathion
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HNE	4-Hydroxyl-2-nonenal
HNF	<i>Hepatocyte nuclear factors</i>
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
i.c.v	Injection intracérébroventriculaire
i.p	Injection intrapéritonéale
i.v	Injection intraveineuse
IL	Interleukines
KCL	Chlorure de potassum
KO	<i>Knock out</i>
LCR	Liquide céphalorachidien
LRRK	Leucine-rich repeat kinase
MAN	Modulateur allostérique négatif
MANF	<i>Mesencephalic astrocyte derived neurotrophic factor</i>
MAO B	Monoamine-oxydase B
MAP	Modulateur allostérique positif
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>

MDA	Malondialdéhyde
MP	Maladie de parkinson
MPDP+	1-Methyl-4-phenyl-1,2-dihydropyridinium
MPP+	1-Methyl-4-phenylpyridine
MPTP	1-Méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
MSH	<i>Melanocyte-stimulating hormone</i>
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NDS	<i>Normal donkey serum</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NOS	NO-Synthase
NPY	Neuropeptide Y
NRF	<i>Nuclear factor (erythroid-derived)-like</i>
NST	Noyau subthalamique
O₂^{•-}	Anion superoxyde
ODN	Octadécaneuropeptide
OH[•]	Radical hydroxyl
ONOO⁻	Anion peroxyinite
OP	Octapeptide
PACAP	<i>Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide</i>
PAR	<i>Protease-activated receptor</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PFA	Paraformaldéhyde
PINK1	<i>PTEN-induced putative kinase 1</i>
PIPs	Polyphosphoinositides
PK	Protéine kinase
PLC	Phospholipase C

POMC	Pro-opiomélanocortine
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE	Peroxisome proliferator- response element
RIA	Radio-immunologique
RNS	Espèces réactives azotées
ROS	Espèces oxygénées réactives
RT	<i>Reverse transcription</i>
RT-PCR	Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel
SCP	Stimulation cérébrale profonde
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SEM	Standard error of the mean
SN	Substance noire
SNC	Système nerveux central
SNpc	Substance noire <i>pars compacta</i>
SNr	Substance noire <i>reticulata</i>
SOD	Superoxyde dismutase
SRE	<i>Sterol regulatory element-like sequence</i>
TBA	Thiobarbiturique
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	<i>Tris buffered saline with Tween® 20</i>
TCA	Acide trichloroacétique
TEP	Tomographie par Emission de Positrons
TGFβ	<i>Glial cell-derived neurotrophic factor</i>
TH	Tyrosine hydroxylase
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TTN	Triakontatétraneuropeptide

TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling</i>
UII	Urotensine II
URP	<i>UII-related peptide</i>
VMAT	<i>Vesicular monoamine transporter</i>
VTA	Aire tegmentale ventrale

Liste des Publications

1. **Bahdoudi Seyma**, Ghouili Ikram, Hmiden Mansour, do Rego Jean-Luc⁴, Lefranc Benjamin, Leprince Jérôme, Chuquet Julien, do Rego Jean-Claude, Ann-Britt Marcher, Mandrup Susanne, Vaudry Hubert, Tonon Marie-Christine, Amri Mohamed, Masmoudi-Kouki Olfa and Vaudry David. Neuroprotective effects of the gliopeptide ODN in an *in vivo* model of Parkinson's disease. *Cellular and Molecular Life Science* **Decembre 2017** doi : 10.1007/s00018-017-2727-2.
2. Ghouili I, **Bahdoudi S**, Morin F, Amri F, Hamdi Y, Coly PM, Walet-Balieu ML, Leprince J, Zekri S, Vaudry H, Vaudry D, Castel H, Amri M, Tonon MC, Masmoudi-Kouki O. Endogenous Expression of ODN-Related Peptides in Astrocytes Contributes to Cell Protection Against Oxidative Stress: Astrocyte-Neuron Crosstalk Relevance for Neuronal Survival. *Mol Neurobiol.* **2017** doi: 10.1007/s12035-017-0630-3.
3. Douiri S, **Bahdoudi S**, Hamdi Y, Cubi R, Basille M, Fournier A, Vaudry H, Tonon MC, Amri M, Vaudry D, Masmoudi-Kouki O. Involvement of endogenous antioxidant systems in the protective activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide against hydrogen peroxide-induced oxidative damages in cultured rat astrocytes. *J Neurochem.* **2016**, 137:913-930 doi: 10.1111/jnc.13614.
4. Vaudry D, Corbière A, Basille M, **Bahdoudi S**, Masmoudi O, Leprince J, Burel D, Bénard M, Galas L, Komuro FH. Characterization of neuropeptides which control cerebellar granule cell survival, migration and differentiation. **2015**, 12;4 L58 doi: 10.1186/2193-1801-4-S1-L58.
5. Hamdi Y, Kaddour H, Vaudry D, Douiri S, **Bahdoudi S**, Leprince J, Castel H, Vaudry H, Amri M, Tonon MC, Masmoudi-Kouki O. The stimulatory effect of the

- octadecaneuropeptide ODN on astroglial antioxidant enzyme systems is mediated through a GPCR. *Front Endocrinol.* **2012**, 21:138. doi: 10.3389/fendo.2012.00138.
6. Hamdi Y, Kaddour H, Vaudry D, **Bahdoudi S**, Douiri S, Leprince J, Castel H, Vaudry H, Tonon MC, Amri M, Masmoudi-Kouki O. The octadecaneuropeptide ODN protects astrocytes against hydrogen peroxide-induced apoptosis via a PKA/MAPK-dependent mechanism. *PLoS One.* **2012**, 7:e42498. doi: 10.1371/journal.pone.0042498.
 7. Masmoudi-Kouki O, Douiri S, Hamdi Y, Kaddour H, **Bahdoudi S**, Vaudry D, Basille M, Leprince J, Fournier A, Vaudry H, Tonon MC, Amri M. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects astroglial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *J Neurochem.* **2011**, 117:403-411. doi: 10.1111/j.1471-4159.

Liste des communications

- 1. Bahdoudi Seyma**, Kadour Hadhemi, Hamdi Yosra, Douiri Salma, Vaudry David, Tonon Marie Christine, Amri Mohamed et Masmoudi Kouki Olfa. Effet du neuropeptide PACAP et du gliopeptide ODN dans les processus neurodégénératifs : Modèle cellulaire de la maladie de Parkinson. *7^{ème} Journée de Neurosciences*. **Tunis-17 Décembre 2011**, Tunis, Tunisie.
- 2. Bahdoudi Seyma**, Kadour Hadhemi, Hamdi Yosra, Douiri Salma, Vaudry David, Leprince Jérôme, Tonon Marie Christine, Amri Mohamed et Masmoudi Kouki Olfa. The neuropeptide PCAPA and the gliopeptide ODN prevent 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of cerebellar granule neurons. *4th Conference of the Mediterranean Neuroscience Society*, September 30 – October 3, **2012, Istanbul, Turkey**.
- 3. Bahdoudi Seyma**, David Vaudry, Hadhemi Kaddour, Douiri Salma, Yosra Hamdi, Leprince Jérôme, Marie-Christine Tonon, Mohamed Amri and Olfa Masmoudi-Kouki. Etude des effets combinés du neuropeptide PACAP et du gliopeptide ODN dans la protection des cellules en grain du cervelet contre la toxicité induite par la 6-hydroxydopamine. *39^{ème} Colloque de la Société de Neuroendocrinologie*, 25-27 septembre **2013, Fès, Maroc**.
- 4. Bahdoudi Seyma²**, Hadhemi Kaddour¹, David Vaudry²⁻⁴, Yosra Hamdi¹, Douiri Salma¹, Leprince Jérôme²⁻⁴, Marie-Christine Tonon², Mohamed Amri¹ and Olfa Masmoudi-Kouki¹. Synergic protective effect of the neuropeptide PCAPA and the gliopeptide ODN on 6-OHDA-induced oxidative stress and apoptosis in cerebellar granule neurons. . *3^{èmes} Journées de l'IRIB 20 Juin 2014 - Manoir Henri IV de Caugé - Evreux - France*.
- 5. Bahdoudi Seyma²**, David Vaudry²⁻⁴, Hadhemi Kaddour¹, Yosra Hamdi¹, Douiri Salma¹, Leprince Jérôme²⁻⁴, Marie-Christine Tonon², Mohamed Amri¹ and Olfa Masmoudi-Kouki¹.

6. **Bahdoudi Seyma**², David Vaudry²⁻⁴, Hadhemi Kaddour¹, Yosra Hamdi¹, Douiri Salma¹, Leprince Jérôme²⁻⁴, Marie-Christine Tonon², Mohamed Amri¹ and Olfa Masmoudi-Kouki¹. The neuropeptide PACAP and the gliopeptide ODN prevent 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of cerebellar granule neurons PeReNE Final Meeting 15 -16 January 2015 – Le Havre France (**Prix de la meilleure communication affichée**)
7. **Bahdoudi Seyma**², David Vaudry²⁻⁴, Hadhemi Kaddour¹, Yosra Hamdi¹, Douiri Salma¹, Leprince Jérôme²⁻⁴, Marie-Christine Tonon², Mohamed Amri¹ and Olfa Masmoudi-Kouki¹. The Neuroprotective effect of the ODN and the PACAP in experimental Parkinson Disease model. 19^{ème} Congrès du GFPP 17 – 22 Mai 2015 - Port – Bail
8. **Bahdoudi Seyma**¹, Ghouili Ikram², Jean Luc Do Régo,³ Leprince Jérôme^{1,3,4}, Jean Claude Do Régo⁵, Vaudry Hubert^{1,3,4}, Tonon Marie-Christine^{1,3}, Amri Mohamed², Masmoudi-Kouki Olfa² and Vaudry David^{1,3,4}. Neuroprotective effects of the gliopeptide octadecaneuropeptide in an in vivo model of Parkinson disease RegPep2016 July 11-15, 2016 Rouen ~ Normandy, France.

Liste des Figures

Figure 1: Présentation du fonctionnement des noyaux gris centraux et physiopathogénèse de la maladie de Parkinson (Dauer and Przedborski 2003).

Figure 2 : Immunomarquage de différents composants des corps de Lewy dans les neurones dopaminergiques de la SNpc.

Figure 3 : Représentation schématique des différents mécanismes cellulaires impliqués dans le développement de la maladie de Parkinson et leur inter-relation (Dias *et al.* 2013).

Figure 4 : Représentation schématique des réactions aboutissant à la production de ROS et site d'action des principaux systèmes de défense anti-oxydante [[http://fr.wikipedia.org/wiki/Radical_\(chimie\)](http://fr.wikipedia.org/wiki/Radical_(chimie))].

Figure 5: Représentation schématique des composants protéiques de la chaîne de transport des électrons et des sites de production des ROS (Carriere *et al.* 2006)

Figure 6 : Métabolisme de la dopamine dans le cerveau.

Figure 7 : Voie biochimique de biosynthèse de la dopamine.

Figure 8 : Mécanismes impliqués dans la toxicité de la 6-OHDA.

Figure 9 : Métabolisme du MPTP.

Figure 10 : Mécanismes intracellulaires impliqués dans la neurotoxicité du MPTP dans les neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* (SNpc).

Figure 11: Représentations schématiques des propriétés morphologiques des astrocytes et de leurs interactions avec des cellules du SNC (Garcia-Marin *et al.* 2007).

Figure 12: Rôle neuroprotecteur de l'astrocyte réactif contre la dégénérescence des neurones dopaminergiques (Rappold and Tieu 2010).

Figure 13 : (A) Représentation schématique de l'organisation du gène du DBI chez l'homme.

Figure 14 : Modélisation structurale tridimensionnelle du DBI humain [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>].

Figure 15 : Effets protecteurs de l'ODN contre la mort cellulaire induite par le stress oxydatif (Hamdi *et al.* 2012a, Kaddour *et al.* 2013).

Figure 16 : Représentation schématique récapitulative des mécanismes intracellulaires mis en jeu dans l'effet protecteur de l'ODN dans les neurones et les astrocytes contre la cytotoxicité oxydative.

Figure 17: Identification de la nature moléculaire des peptides de la famille de l'ODN secrétés dans les surnageants de cultures d'astrocytes natifs ou activés par le stress oxydant à l'aide d'un système UPLC couplé à un spectromètre de masse 6490 ESI (+) - triple quad.

Figure 18 : Effet antioxydant de l'ODN dans les cellules nerveuses.

Figure 19 : Variation du poids corporel chez les animaux transgéniques DBI *knock out* traités par le MPTP.

Figure 20 : Effet de l'inhibition de l'expression du DBI par ARNsi dans les astrocytes sur la mort cellulaire induite par le stress oxydatif modéré.

Figure 21 : Représentation schématique des mécanismes intracellulaires impliqués dans l'effet neuroprotecteur de l'ODN sur les neurones dopaminergiques de la SNpc contre la neurotoxicité du MPTP, chez la souris.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales activités biologiques des cellules astrogliales dans le cerveau.

Tableau 2 : Teneur en endozépinines dans des structures cérébrales.

Tableau 3 : Liste des gènes utilisés en PCR.

Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés en immunohistochimie.

Tableau 5 : Liste des anticorps primaires utilisés en Western blot.

Avant-Propos

La maladie de Parkinson (MP) est une pathologie neurodégénérative caractérisée par la perte progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire qui innervent le striatum, induisant un ensemble de troubles neurologiques, et en premier lieu la survenue de graves déficits moteurs (tremblements au repos, hypertonie musculaire, akinésie et bradykinésie) (Fraix 2004). Différents mécanismes pourraient être associés à la neuropathogénèse de la MP dont le stress oxydatif, le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, l'apoptose ou les processus neuro-inflammatoires (Bhat *et al.* 2015, Emerit *et al.* 2004, Gaki and Papavassiliou 2014, Keeney *et al.* 2006). La prévalence de la MP ne cesse d'augmenter, en raison notamment de l'allongement de l'espérance de vie, ce qui pose un problème de santé publique majeur. Toutefois, les traitements actuels de la MP ne sont que des traitements palliatifs, s'articulant autour d'analogues dopaminergiques et la stimulation intracérébrale à haute fréquence (Fraix *et al.* 2008) (Dauer and Przedborski 2003, Wang *et al.* 2017). Aussi, il est d'un grand intérêt de pouvoir développer des stratégies visant à protéger les cellules neuronales des processus neurodégénératifs et capables de stopper ou ralentir la progression de la maladie.

Il est maintenant clairement établi que les cellules astrogliales, en contrôlant le processus neuro-inflammatoire, et le niveau de production de facteurs neurotrophiques, d'agents neuroprotecteurs et de molécules antioxydantes, jouent un rôle important dans la pathogénèse de la MP (Hirsch *et al.* 2003a, McGeer and McGeer 2008, Mena *et al.* 2002). L'octadécaneuropeptide (ODN) et son précurseur le *diazepam-binding inhibitor* (DBI) forment la famille des endozépinines, des peptides initialement considérés comme les ligands endogènes des récepteurs des benzodiazépines (Tonon *et al.* 2013b). Largement distribués dans le système nerveux central, les peptides de la famille de l'ODN sont exclusivement produits par les cellules astrogliales (Tonon *et al.* 2013b, Yanase *et al.* 2002) et leur libération est sous le contrôle de plusieurs neuropeptides dont le *pituitary adenylate*

cyclase-activating polypeptide (PACAP; (Masmoudi *et al.* 2003)), un peptide largement étudié pour son activité neuroprotectrice (Seaborn *et al.* 2011, Vaudry *et al.* 2009). Des études cliniques ont révélé que les quantités d'endozépines sont augmentées dans le liquide céphalo-rachidien de patients souffrant de troubles neurologiques dont la MP (Ferrarese *et al.* 1990). Des études *in vitro*, menées en collaboration entre les équipes de Tunis (UR11ES09) et de Rouen (U1239), ont montré que l'ODN présente une activité anti apoptotique à la fois sur des neurones traités à la 6-OHDA et des astrocytes corticaux en culture exposés à un stress oxydatif (Hamdi *et al.* 2012a, Hamdi *et al.* 2011, Kaddour *et al.* 2013). De plus, l'ODN exerce un effet glioprotecteur en stimulant la biosynthèse de glutathion, l'activité des enzymes anti-oxydantes (SOD et catalase) ainsi que l'expression de leurs gènes dans les astrocytes en culture, et en réduisant la surproduction de ROS induite par le H₂O₂ (Hamdi *et al.* 2012b, Hamdi *et al.* 2015). Plus récemment nous avons démontré que les astrocytes cultivés en conditions de stress oxydatif chronique et modéré par le H₂O₂ (50 µM) stimulent la libération d'ODN et l'expression de son gène (Ghouili *et al.* 2017). En revanche, l'invalidation de l'expression du gène du précurseur de l'ODN par la technique d'ARN interférents (ARNsi) augmente la vulnérabilité des astrocytes vis-à-vis du stress oxydatif modéré. Cet effet a été contrecarré en rajoutant de l'ODN (10⁻⁹ M) dans le milieu de culture. De plus, le traitement des neurones avec du milieu conditionné astroglial réduit de manière significative la mort neuronale induite par le H₂O₂. Or cette action neuroprotectrice du milieu conditionné glial est fortement atténuée en présence d'un antagoniste de l'ODN. Ces données indiquent que l'ODN endogène pourrait participer au mécanisme de compensation ou de protection cellulaire en réponse aux dommages oxydatifs empêchant la mort cellulaire et la progression des processus de neurodégénérescence.

Les travaux *in vitro* conjoints entre l'équipe de Rouen (INSERM U1239) et celle de Tunis (UR11ES09) ont démontré que le gliopeptide ODN régule la réaction neuro-inflammatoire (*via* la production de la cytokine interleukine-1β; (Tokay *et al.* 2005)), le

métabolisme oxydatif (Hamdi *et al.* 2012b, Hamdi *et al.* 2015) et l'apoptose (Hamdi *et al.* 2012a, Hamdi *et al.* 2011, Kaddour *et al.* 2013), processus qui pourraient avoir une influence décisive sur la neurodégénérescence observée dans la maladie de Parkinson (Brochard *et al.* 2009, Hirsch and Hunot 2009). Néanmoins, à ce jour, aucune étude *in vivo* n'a été réalisée, afin de déterminer si les données obtenues sur les modèles cellulaires *in vitro* peuvent être transposées *in vivo*. De ce fait, nous avons cherché à savoir si l'ODN présente un effet délétère ou bénéfique dans les processus neurodégénératifs de la MP.

Le projet de recherche de cette thèse a donc eu pour but :

- i) d'étudier la capacité de l'ODN, injecté par voie intracérébroventriculaire, à réduire voire bloquer les processus neurodégénératifs, *i.e.* la neuro-inflammation et la réactivité gliale, la neurotoxicité oxydative et l'apoptose des neurones dopaminergiques de la substance noire, dans un modèle murin de la MP, des souris C57Bl6J traitées avec du 1 - méthyl 4 - phényl 1,2,3,6-tétrahydro pyridine (MPTP),
- ii) de rechercher les conséquences de l'inactivation du gène précurseur de l'ODN sur la survie des neurones dopaminergiques de la substance noire et les paramètres oxydatif et inflammatoire dans le même modèle animal de la MP que celui cité précédemment.

A terme ce travail permettrait de vérifier l'hypothèse selon laquelle le gliopeptide ODN agit en tant qu'agent neuroprotecteur vis-à-vis de la mort neuronale observée dans la MP. Il pourrait également fournir de nouvelles pistes et cibles thérapeutiques fondées sur l'utilisation de facteurs glio- et neuro-protecteurs, pour ralentir voir même bloquer la mort des neurones dopaminergiques de la substance noire et améliorer le traitement de la MP.

Étude Bibliographique



I- La maladie de Parkinson

1. Histoire de la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson et ses manifestations sont connues depuis longtemps puisqu'elle était déjà référée dans le système médical indien antique de l'Ayurveda sous le nom de Kampavata. Elle était alors traitée par une plante, la mucuna pruriens, aujourd'hui connue comme source de L-Dopa. En ce qui concerne la littérature médicale occidentale, la maladie de Parkinson fût décrite pour la première fois par le physicien Galen dans des écrits sur ce qu'il appela la « paralysie agitante » (shaking palsy) en l'an 175 après J.-C. Mais ce n'est qu'en 1817 que le médecin londonien James Parkinson publia un essai médical détaillé sur la « paralysie agitante » intitulé « *An Essay on the Shaking Palsy* ». Cette étude n'était néanmoins basée que sur six cas qu'il observa dans le cadre de sa pratique médicale ou qu'il rencontra au cours de promenades dans son voisinage. Ce n'est que soixante ans plus tard qu'un neurologue français, Jean Martin Charcot, reconnut l'importance des travaux de James Parkinson et nomma ainsi cette affection sous le terme de « Maladie de Parkinson » (MP). L'analyse *post-mortem* de cerveaux de patients parkinsoniens décédés, a révélé un déficit en dopamine (DA) dans le striatum comparativement au niveau de DA présent dans le cerveau des sujets contrôles. Bien que les symptômes, le diagnostic et les caractéristiques de la MP soient bien établis, son étiologie demeure toutefois inconnue. La prévalence de la MP est de 2‰ dans la population générale, s'élevant à 2% au-delà de 65 ans. Elle débute en moyenne entre 55 et 65 ans, mais peut survenir à un âge plus précoce (Dickson 2012, Duncan *et al.* 2013). Elle est de fréquence légèrement plus élevée chez les hommes que chez les femmes (Daley *et al.* 2012, Ma *et al.* 2014). La MP correspond à la deuxième cause d'handicap moteur chez le sujet âgé (après les accidents vasculaires cérébraux) et à la deuxième maladie neurodégénérative affectant le plus d'individus après la maladie d'Alzheimer (Ma *et al.* 2014).

2. Symptômes cliniques de la maladie de Parkinson

2.1. Troubles moteurs

La MP se caractérise principalement par une perte des neurones dopaminergiques localisés au niveau de la substance noire (*locus niger*) *pars compacta* (SNpc) mésencéphalique, qui se projettent vers le striatum. Cette dégénérescence neuronale entraîne un déficit en DA dans le striatum, responsable de la survenue des symptômes moteurs (tremblement de repos, hypertonie musculaire, akinésie et bradykinésie) que rencontrent les patients parkinsoniens (Huang *et al.* 2003, Kumar *et al.* 2003, Rothwell and Huang 2003).

a- Les tremblements au repos surviennent surtout au niveau des mains, des bras et de la tête. C'est très souvent grâce à ce symptôme qu'un patient découvre qu'il est atteint de la MP et c'est en général celui qui le gêne le plus.

b- La rigidité musculaire ou **l'hypertonie** affecte la plupart des parkinsoniens et empêche les mouvements fluides. De plus, cela mène très souvent à la perte d'expressions faciales.

c- La lenteur ou l'akinésie rend parfois les mouvements volontaires très difficiles à réaliser et mène aussi, au stade avancé de la maladie, à l'interruption d'un mouvement en cours.

d- La bradykinésie, quant à elle, se traduit par une lenteur des mouvements et affecte beaucoup les activités de tous les jours (s'habiller, se laver). Elle se manifeste aussi par un retard dans l'amorce du mouvement.

2.2. Troubles neuropsychiatriques

a- Troubles de l'humeur: La MP s'accompagne fréquemment de troubles de l'humeur, se manifestant principalement sur un versant dépressif (Gotham *et al.* 1986). Ces troubles peuvent être classés en deux grandes catégories, à savoir les troubles dépressifs

et les troubles bipolaires, qui peuvent s'exprimer sous formes d'épisodes ponctuels de courte durée de façon cyclique ou s'étendre sur une longue période.

b- Troubles anxieux : Les patients décrivent des sentiments excessifs ou inappropriés d'appréhension, de nervosité, d'agitation ou de tension qui persistent ou sont récurrents. Cette anxiété s'accompagne d'une hypovigilance, de troubles du sommeil, d'une perte d'énergie et d'une baisse de la concentration (Santangelo *et al.* 2016, Vitale *et al.* 2016).

c- L'apathie : Elle correspond à l'expression d'un sentiment de fatigue intellectuelle ou mentale. Cette fatigue se définit par un manque de désirs, d'idées d'envie ou encore une difficulté à concrétiser un projet. Ce déficit de motivation s'accompagne par une perte de variations émotionnelles et une atténuation des capacités de réponse affective (Pluck and Brown 2002).

d- Les troubles cognitifs : Ils se traduisent par des problèmes de mémoire, une diminution de la capacité de l'apprentissage et une lenteur d'idéalisation.

Avant apparition de ces troubles moteurs et neuropsychiatriques, des premiers signes souvent peu évocateurs peuvent être détectés comme une fatigabilité, des crampes et diverses douleurs. En outre, de nombreux travaux démontrent qu'aux stades les plus précoces de la maladie, on assiste à une baisse de l'olfaction (hyposmie) chez les patients. Ceci représente un indicateur assez sensible d'un début de MP, et des tests d'olfactométrie sont maintenant utilisés lors de suspicion d'apparition de celle-ci (Doty 2012, Miyamoto 2012).

3. Caractéristiques neurochimiques et neuropathologiques de la maladie de Parkinson

Les principaux symptômes de la MP sont les troubles moteurs. L'activité motrice est sous le contrôle du système des ganglions de la base, composé du striatum (formé du

putamen et du noyau caudé), du globus pallidus (GP), de la SN et du noyau subthalamique (NST). La déplétion dopaminergique sévère conduit à un dysfonctionnement des ganglions de la base impliquant deux circuits. La voie directe relie le striatum au globus pallidus interne (GPi) à la substance noire *reticulata* (SNr), structures de sortie des ganglions de base. La voie indirecte relie le striatum à la SNr en passant par deux relais, le globus pallidus externe (GPe) et le noyau subthalamique (NST). Ainsi, au cours de la MP, les lésions dopaminergiques affectant la voie directe entraînent une désinhibition du GPi et de la SNr, structures responsables d'une hyperactivité inhibitrice GABAergique des voies efférentes se projetant sur le thalamus. L'inhibition de l'activité du GPe, dans la voie indirecte, altère quant à elle le tonus inhibiteur GABAergique au niveau du NST, qui est le siège d'une hyperactivité glutamatergique en relation avec le Gpi/SNr. Par conséquent, une amplification de l'hyperfonctionnement des voies efférentes inhibitrices à GABA se projetant sur le thalamus se produit dans la MP (Figures 1A et 1B) (Fraix 2004, Fraix *et al.* 2008, Thobois *et al.* 2003).

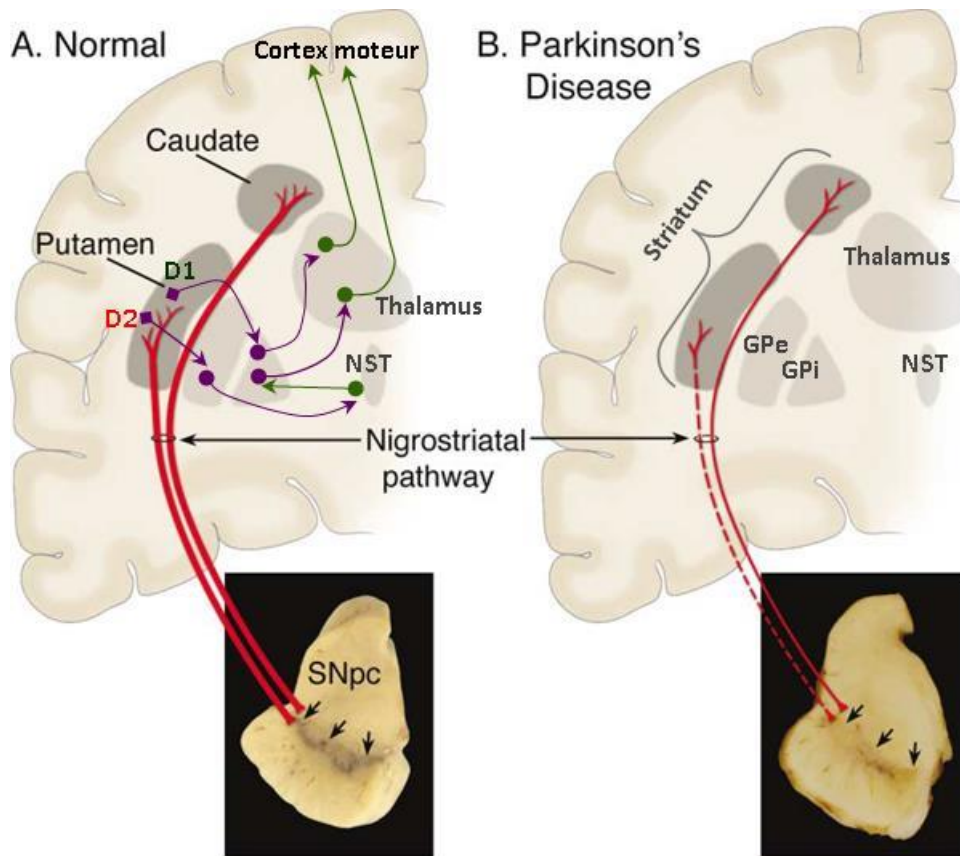


Figure 1 : Présentation du fonctionnement des noyaux gris centraux et physiopathogénèse de la maladie de Parkinson. A. Représentation schématique de la voie nigrostriatale normale (en rouge). Les neurones dopaminergiques dont les corps cellulaires sont situés dans la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) se projettent sur le striatum (composé du putamen et du noyau caudé, flèches rouges épaisses), où elles agissent sur deux types de récepteurs. Premièrement, l'activation des récepteurs dopaminergiques de type D1 (positivement couplé à l'adénylyl cyclase) conduit à une activation des neurones striataux GABAergiques, qui projettent vers le globus pallidus interne (GPi) afin d'y exercer une activité inhibitrice. Ainsi inhibé, le GPi, qui exerce normalement une activité tonique inhibitrice sur le thalamus, libère les noyaux du thalamus de leur état inactif. Les neurones thalamiques peuvent alors exercer leur activité stimulatrice sur les différentes aires motrices corticales et permettre ainsi l'initiation des mouvements. Cette voie est appelée voie directe. Deuxièmement, l'activation des récepteurs dopaminergiques de type D2 (négativement couplés à l'adénylyl cyclase); induit une forte inhibition des neurones striataux ce qui diminue alors leur contrôle inhibiteur sur le globus pallidus externe (GPe). Ainsi activé, le GPe permet une

régulation négative de la voie directe grâce à une action inhibitrice du GPe sur le GPi. Le GPe exerce également une activité GABAergique inhibitrice sur le noyau subthalamique, ce qui permet une limitation de l'activité du GPi. Cette voie est appelée voie directe. La pigmentation normale de la SNpc, produite par la neuromélanine dans les neurones dopaminergiques est indiquée par les flèches noires. **B.** Dans la MP, le déficit en dopamine provoque une perturbation générale des circuits des ganglions de la base aboutissant à une sur-activation du GPi responsable d'une forte inhibition du cortex moteur, qui conduit à une perte progressive du contrôle moteur. Les flèches noires indiquent la dépigmentation de la substance noire et rendent compte de la disparition des neurones dopaminergiques contenant des pigments de neuromélanine. → Transmission GABAergique ; → transmission Glutamatergique. SNpc : substance noire pars compacta ; GPe/i : Globus pallidus externe ou interne ; NST : noyaux subthalamiques. D'après (Dauer and Przedborski 2003).

Des granules pigmentés bruns/noirs ont été décrits dans le système nerveux central humain, plus précisément dans la SN et le locus coeruleus, nommés neuromélanine en raison de leur ressemblance avec la mélanine (Graham 1978, 1979). Ces pigments neuromélaniques se trouvent, entourés d'une double membrane dans le périkaryon neuronal, et leur accumulation dans la SN pourrait être causée par le vieillissement (Olanow et al, 2009). La neuromélanine pourrait provenir de l'auto-oxydation de la DA en présence d'oxygène (Carstam *et al.* 1991, Hirsch *et al.* 1988, Lyden *et al.* 1984, McNeill *et al.* 1984). Cette neuromélanine pourrait aussi servir de réservoir pour certaines toxines, et permettrait ainsi à des métaux de transitions impliqués dans la MP de s'y loger, ce qui pourrait expliquer la neurotoxicité spécifique de certaines substances, comme le I-méthyl-4-phénylpyridinium (Burns *et al.* 1984, Wu *et al.* 1986). La dégénérescence des neurones DAergiques neuromélaniques associée à la MP s'accompagne donc d'une diminution de la pigmentation noire dans la SN observable lors de l'autopsie (Youdim et Riederer, 1997) (Figure 1).

La dégénérescence de la voie nigrostriée est accompagnée de l'apparition d'inclusions cytoplasmiques appelées "corps de Lewy" dans les neurones dopaminergiques de la SNpc. Les corps de Lewy sont des agrégats de protéines cytoplasmiques eosinophiles sphériques composés de nombreuses protéines (Figure 2),

y compris l' α -synucléine, la parkine, l'ubiquitine et les neurofilaments. Les corps de Lewy ont un diamètre supérieur à 15 nm et une structure organisée contenant un noyau dense entouré d'un halo clair (Braak et al. 1995). Les corps de Lewy ne sont pas spécifiques à la MP puisque l'on peut aussi en retrouver dans le cerveau de personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer et de certaines formes de démences. Toutefois, la présence de corps de Lewy dans le SNc du mésencéphale est exclusive à la MP. Actuellement, plus de 70 protéines ont été identifiées dans les corps de Lewy (Wakabayashi *et al.* 2007) dont des protéines impliquées dans les formes familiales de la MP, à savoir la parkine (Schlossmacher *et al.* 2002), PINK1 (Abou-Sleiman *et al.* 2006, Gandhi *et al.* 2006), DJ-1 (Bandopadhyay *et al.* 2004), l' α -synucléine (Spillantini *et al.*, 1997), UCHL1 (Vaughan *et al.* 2001), LRRK2 (Miklossy *et al.* 2006) et la synphiline-1 (Mori *et al.* 2008, Wakabayashi *et al.* 2007). La dégénérescence des neurones est corrélée à l'agrégation protéique intracellulaires dans les CL. Ces observations sont associées à l'apparition des troubles moteurs (Feany et Bander 2000).

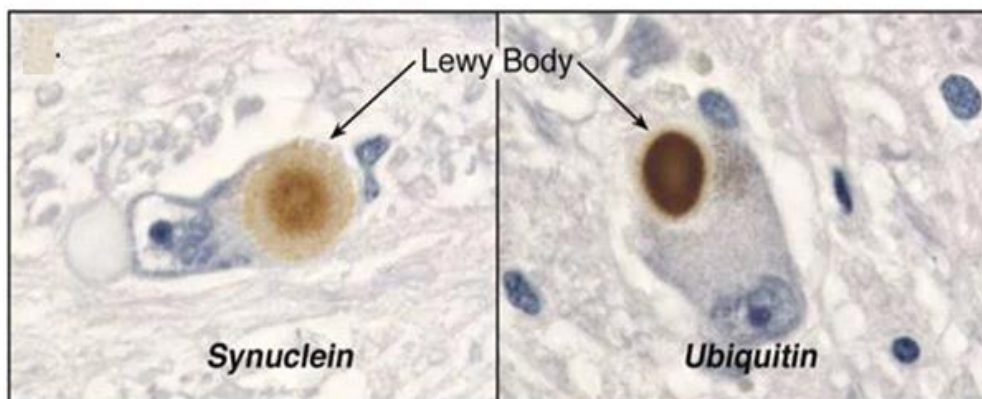


Figure 2 : Immunomarquage de différents composants des corps de Lewy dans les neurones dopaminergiques de la SNpc. L'immunomarquage des corps de Lewy avec un anticorps contre la synucléine est essentiellement localisé dans la zone centrale (image à gauche), à l'inverse, l'immunoréactivité de type ubiquitine est plus diffuse dans le corps de Lewy (image de droite). SNpc : substance noire *pars compacta*. D'après (Dauer and Przedborski 2003).

4. Les causes de la maladie de Parkinson

Le développement de la MP serait la conséquence de l'interaction entre des facteurs génétiques (Singleton *et al.* 2013) et neurotoxiques environnementaux (Baldi *et al.* 2003, Gao *et al.* 2012), responsables de phénomènes de stress oxydatif et d'un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale conduisant au final à la mort apoptotique des neurones dopaminergiques nigrostriés et à l'installation d'une réponse neuroinflammatoire qui entretienne la perte neuronale et la progression de la maladie (Jenner P. *et al.* 2003 ; Marchetti B, *et al.* 2005).

4.1. Facteurs génétiques

Depuis la découverte, en 1997, de la première forme héréditaire de la MP associée à la mutation du gène SNCA (α -synucléine) (Polymeropoulos *et al.* 1997), cinq gènes ont à ce jour été identifiés pour provoquer des formes familiales de la MP, à savoir SNCA, parkine (Hardy *et al.* 2006), DJ-1, PINK1 (Kilarski *et al.* 2012), ATP13A2 (Yang and Xu 2014) et LRRK2 (Lesage *et al.* 2006, Ross *et al.* 2011). Les mutations situées dans les gènes codant pour l' α -synucléine, et LRRK2 se transmettent de façon autosomique dominante et celles dans les gènes codant pour la parkine, DJ-1, PINK1 et l'ATP13A2 se transmettent de façon autosomique récessive (Lohmann *et al.* 2012, Pineda-Trujillo *et al.* 2006, Tomiyama *et al.* 2015, Witoelar *et al.* 2017). Les formes idiopathique et héréditaire de la MP sont très similaires d'un point de vue clinique et pathologique, mais la forme héréditaire se développe souvent plus tôt, vers l'âge de 40-45 ans, et certains signes cliniques particuliers peuvent y être associés (Sharma *et al.* 2012).

Bien que la voie commune reliant les gènes liés à des formes familiales de la MP ne soit pas encore élucidée, il apparaît que la mitochondrie joue un rôle central dans le processus de neurodégénérescence de la MP. En effet, au moins 4 gènes responsables des formes héréditaires de la MP, sont impliqués dans la régulation de l'activité mitochondriale. Il a été rapporté que la moitié des cas précoces de MP est due à des

mutations des gènes PINK1 et PARK2, conduisant à l'altération du renouvellement normal des mitochondries et à leur dégradation rapide (Branco et al, 2010). Des études récentes, ont identifié un nouveau gène, VPS13C (*vacuolar protein sorting 13C*), impliqué dans une forme précoce de la MP. La mutation de ce gène conduit à la perte de fonction de la protéine VPS13C, responsable d'une vulnérabilité des mitochondries au stress conduisant à la mort neuronale par mitophagie selon une voie dépendante de PINK1/PARKIN (Lesage *et al.* 2016).

4.1.1. Gène de l' α -synucléine

L'un des premiers gènes identifié fut le gène PARK1 (*4q21*) codant pour la protéine α -synucléine, très abondante physiologiquement dans les neurones et impliquée dans la plasticité neuronale. Trois mutations autosomales dominantes sur le chromosome 4q21 furent principalement identifiées (Polymeropoulos et al. 1997). Le gène muté est dupliqué (Chartier-Harlin *et al.* 2004) et même tripliqué (Singleton *et al.* 2003), ce qui entraîne la production d'une plus grande quantité de la protéine mutée comparativement à la protéine normale, et mène à son agrégation. Le marquage des corps de Lewy avec un anticorps contre l' α -synucléine agrégée montre une forte immunoréactivité, signe de la présence de la protéine mutée dans les corps de Lewy et donc suggère son implication dans la MP (Polymeropoulos *et al.* 1997). Aucune de ces mutations ne fut identifiée dans la forme idiopathique de la MP. Malgré le fait que des mutations dans ce gène restent des causes relativement rares de MP, ces découvertes ont été réellement importantes dans la compréhension de la maladie (Hardy et al, 2006).

4.1.2. Gène DJ-1

Le gène DJ-1 comporte 11 mutations autosomales récessives, ce qui est en fait le second plus fréquemment touché dans la forme familiale de la MP. La protéine est impliquée dans la réponse au stress oxydatif (Ishikawa *et al.* 2009, Tsuboi *et al.* 2008, Yanagida *et al.* 2009). Elle pourrait agir comme un antioxydant puisqu'en présence d'un stress, la protéine se transforme en un dérivé capable de céder des protons (Yanagida *et*

al. 2009). De plus, le DJ-1 forme des complexes ARN-protéines qui régulent l'expression de gènes impliqués dans la réponse cellulaire au stress oxydant (Chan and Chan 2015, Mukherjee *et al.* 2015, Zhang *et al.* 2015). Les mutations affectent donc l'activité de cette protéine et rendent la cellule plus vulnérable au stress oxydatif (Ishikawa *et al.* 2009, Saito *et al.* 2014, Taira *et al.* 2004).

4.1.3. Gène de la dardarine

Une mutation autosomale dominante au niveau du gène LRRK2 (*leucine-rich repeat kinase 2*), qui code pour la protéine dardarine, a été identifiée, impliqué dans la forme héréditaire de la MP (Sayad *et al.* 2016). En effet, cette mutation induit une modification d'une protéine kinase qui pourrait entraîner la phosphorylation de l' α -synucléine et de tau, toutes deux impliquées dans la MP et la maladie d'Alzheimer (Hardy *et al.* 2009, Wider and Wszolek 2007).

4.1.4. Gène PINK1

PINK1, *PTEN-induced putative kinase 1*, est une kinase mitochondriale dont le gène est le *PINK1* situé sur le chromosome 1. La mutation du *PINK1* est responsable d'une forme précoce et familiale de la MP, appelée « maladie de Parkinson de type 6 » ou PARK6. La mutation de PINK1 entraîne une altération des mitochondries des neurones dopaminergiques et l'accumulation d'espèces oxygénées réactives responsables des dommages oxydatifs et de la mort neuronale par stress oxydatif (Lin *et al.*, 2009 ; Branco *et al.* 2010)

Globalement l'identification des gènes liés à des formes familiales de la MP, telles que l' α -synucléine, la parkine, le DJ-1, le PINK-1 et la LRRK2 fournissent des informations importantes sur les voies moléculaires impliquées dans la maladie et mettent en évidence des mécanismes par lesquels le stress oxydatif et le

dysfonctionnement mitochondrial contribuent à la mort des neurones dopaminergiques (Figure 3).

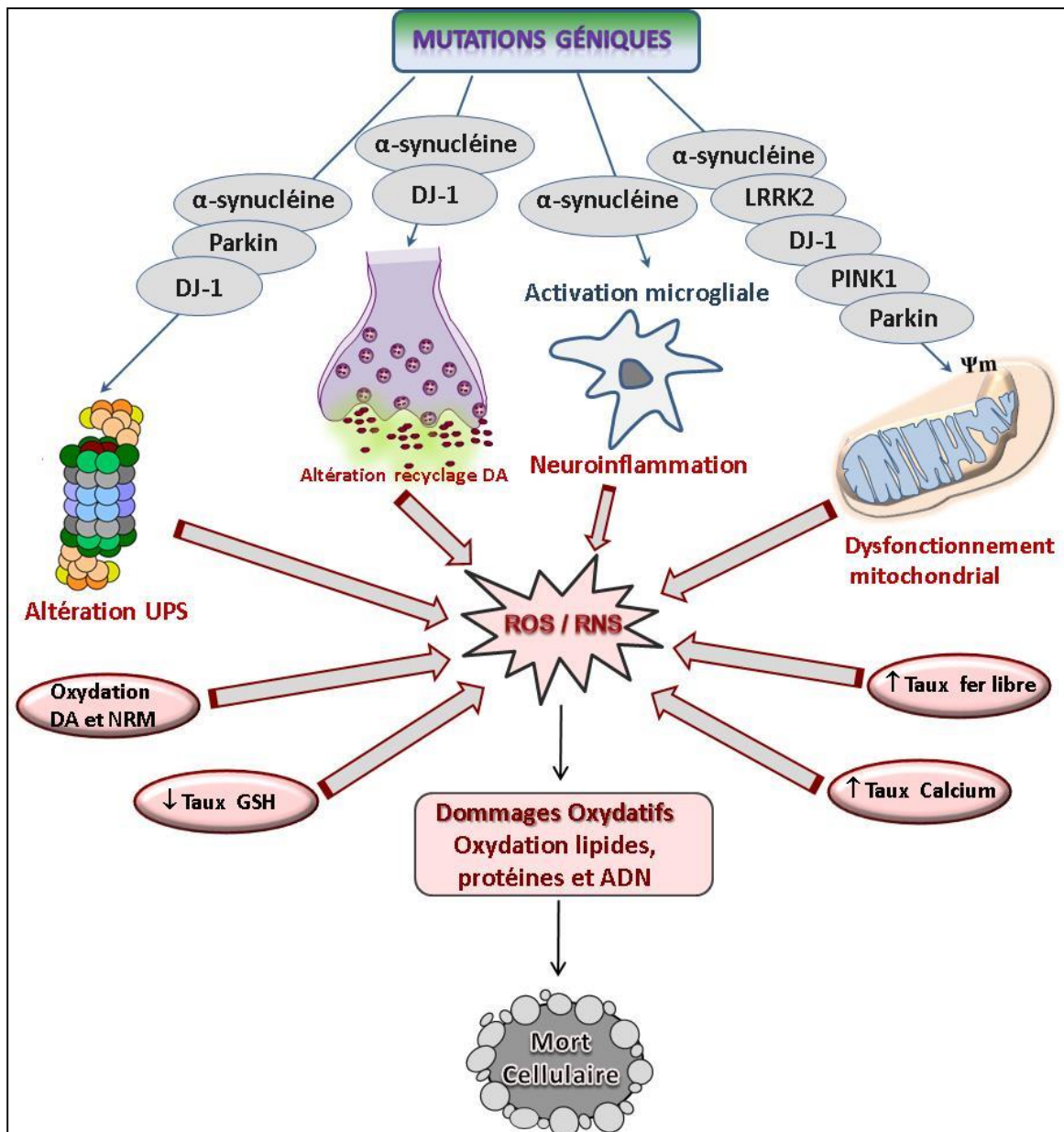


Figure 3 : Représentation schématique des différents mécanismes cellulaires impliqués dans le développement de la maladie de Parkinson et leur interrelation. Des protéines impliquées dans les formes familiales de la MP peuvent interagir entre elles, ce qui peut conduire à la formation d'inclusions ou à leur ubiquitinylation. La mutation de l' α -synucléine et son interaction avec DJ-1 perturbe le stockage et le transport des vésicules synaptiques dans les terminaisons présynaptiques des neurones dopaminergiques de la substance noire. Les différentes mutations sur la parkine induisent une perte de son activité ligase, ce qui affecte l'ubiquitinylation et la dégradation de ses substrats pouvant provoquer leur agrégation et la formation des inclusions intracellulaires. La mutation des

différentes protéines liées à la maladie *i.e.* DJ-1, PINK1, parkine, α -synucléine et LRRK2, affecte de manière irréparable la fonction mitochondriale, entraînant une perturbation des systèmes homéostatiques (calcium, fer), une exacerbation de la production d'espèces oxygénées ou nitrosylées réactives (ROS / RNS), une chute du taux de glutathion réduit (GSH), une oxydation de la sous-unité 26S du protéasome, une altération du fonctionnement du système ubiquitine-protéasome (UPS) et une augmentation de la mitophagie. Tous ces mécanismes au final endommagent des constituants cellulaires et conduisent à la mort cellulaire. Le stress oxydatif et ces dommages cellulaires induisent l'activation des cellules microgliales qui à leur tour répondent par la production de médiateurs de l'inflammation et accentuent la mort neuronale. Modifié d'après (Dias *et al.* 2013).

4.2. Facteurs environnementaux

La forme sporadique de la MP est néanmoins la plus fréquente et de nombreuses études soutiennent l'hypothèse qu'elle pourrait être d'origine environnementale (Baldi *et al.* 2003, Freire and Koifman 2012). L'hypothèse environnementale postule que la neurodégénérescence liée à la MP résulte de l'exposition à des neurotoxines ciblant les neurones dopaminergiques de la SNpc (Bove and Perier 2012, Cannon and Greenamyre 2010, Kaur *et al.* 2007). En accord avec ce postulat, les études épidémiologiques ont établi un lien entre la survenue de la MP et une vie dans un environnement rural et/ou exposée aux pesticides, aux métaux, aux polychlorobiphényles ou encore aux solvants (Brown *et al.* 2005, Elbaz and Tranchant 2007, Moisan *et al.* 2015, Peng *et al.* 2007). De plus, l'analyse *post-mortem* de cerveaux de patients parkinsoniens a révélé la présence de taux élevés de pesticides dans des structures cérébrales notamment la SN et le noyau caudé (Corrigan *et al.* 1996, Corrigan *et al.* 1998, Corrigan *et al.* 2000). A l'échelle intracellulaire, les mécanismes de neurotoxicité de certains pesticides comme la roténone et le paraquat impliquent un dysfonctionnement mitochondrial par action sur les complexes I et/ou III de la chaîne respiratoire (Testa *et al.* 2005). L'altération des fonctionnalités mitochondriales entraîne un déséquilibre redox du couple NADH/NAD⁺, une chute de production d'ATP, une accumulation des espèces oxygénées réactives (ROS), une oxydation et une agrégation de protéines telle que l' α -synucléine, et l'induction de mécanismes apoptotiques par libération de cytochrome C

de l'espace inter membranaire mitochondrial vers le cytosol à l'origine d'une activation de caspases et une altération de l'ADN nucléaire (Greenamyre *et al.* 2001, Sherer *et al.* 2001, Sherer and Greenamyre 2005, Testa *et al.* 2005). Des travaux réalisés sur des cultures de neurones, ont montré que des mutations des gènes α -synucléine, DJ-1 (Park7), Pink1 et Parkin, impliqués dans des formes héréditaires de la MP augmentent la susceptibilité à la neurotoxicité du paraquat et de la roténone (Gao *et al.* 2012, Testa *et al.* 2005).

Par ailleurs, des études réalisées chez des toxicomanes ont montré que la consommation du 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP), une neurotoxine de synthèse, induit l'apparition d'un syndrome parkinsonien en seulement trois jours chez l'homme (Cannon and Greenamyre 2010). La neurotoxicité du MPTP est provoquée par son métabolite, le 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP⁺), qui est un herbicide, le cyperquat, de ressemblance structurale avec le Paraquat (Bove and Perier 2012, Cannon and Greenamyre 2010). Le MPP⁺ induit sa neurotoxicité sur les neurones dopaminergiques en inhibant le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le MPTP est actuellement la drogue la plus utilisée pour induire des modèles de MP *in vitro* et *in vivo*. Durant ma thèse je me suis focalisée sur le modèle murin de la MP induit par l'intoxication au MPTP, modèle qui sera détaillé dans le paragraphe 7. A l'instar du MPP⁺, les pesticides agissent souvent comme des poisons mitochondriaux. C'est ainsi que les complexes de transports d'électrons dans la mitochondrie et la synthèse d'ATP sont inhibés par les herbicides diphényléther, les herbicides thiazoles, les insecticides organochlorés comme le DDT (dichloro-diphényl-trichloroéthane), les insecticides pyréthroïdes et les fongicides benzimidazoles. L'exposition aux pesticides peut avoir lieu directement par contact avec la peau, absorption de nourriture ou d'eau contaminée, mais aussi inhalation de particules d'aérosols ou de fumigènes contenant des pesticides. Il faut noter que la plupart des études regroupent des agents pesticides, herbicides et

insecticides dans la catégorie "pesticides", donc nous ne connaissons pas le risque associé à chaque catégorie d'agents (Huang *et al.* 2003).

En revanche, le tabagisme et la consommation de café semblent être inversement associés au risque de développement de la MP (Hernan *et al.* 2002, Hernan *et al.* 2001), ce qui renforce l'idée selon laquelle divers facteurs environnementaux peuvent modifier la susceptibilité à la MP.

5. Mécanismes de neuropathogénèse de la maladie de Parkinson

Différents mécanismes pourraient être associés à la neuropathogénèse de la MP et en particulier le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, les dommages liés au stress oxydatif, l'apoptose, les processus neuro-inflammatoires qui entretiennent le mécanisme neurodégénératif primaire (Hirsch & Hunot 2009) et l'agrégation de protéines provoquée par des défauts au niveau du système ubiquitine-protéasome (Bose and Beal 2016, Carboni and Lingor 2015, Del Tredici and Braak 2016, Dzamko *et al.* 2015, Ganguly *et al.* 2017, Ryan *et al.* 2015, Vivekanantham *et al.* 2015). Que ce soit dans les cas de formes sporadiques ou de formes familiales, des dysfonctions de ces voies conduisent à la dégénérescence des neurones dopaminergiques.

5.1. Implication du stress oxydatif

Le stress oxydatif est impliqué dans les mécanismes conduisant à la mort des neurones dopaminergiques de la SNpc (Dias *et al.* 2013, Gaki and Papavassiliou 2014, Jenner 2003), mais le rôle étiologique de ce stress dans le développement de la MP reste controversé.

Le stress oxydatif définit un déséquilibre entre les niveaux de ROS et/ou d'espèces réactives azotées (RNS) produites et la capacité d'un système biologique à les détoxifier, créant un état périlleux contribuant aux dommages cellulaires. Les ROS/RNS sont des substances hautement réactives et cytotoxiques telles que l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$), le

peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyl (OH°) ou encore l'anion peroxyinite ($ONOO^-$). Les mécanismes physiologiques de défense anti-radicalaire permettant la détoxification de ces ROS/RNS, sont essentiellement représentés par les enzymes antioxydantes *i.e.* superoxydes dismutases (SODs), catalase, glutathion peroxydases (GPx) et les piègeurs de ROS dont le glutathion réduit (GSH) (Figure 4). Les ROS sont néfastes pour le fonctionnement cellulaire puisqu'elles entraînent l'oxydation des biomacromolécules cellulaires (lipides, protéines et acides nucléiques) conduisant à l'altération de leur fonctionnalité dans la cellule et au final à la mort cellulaire.

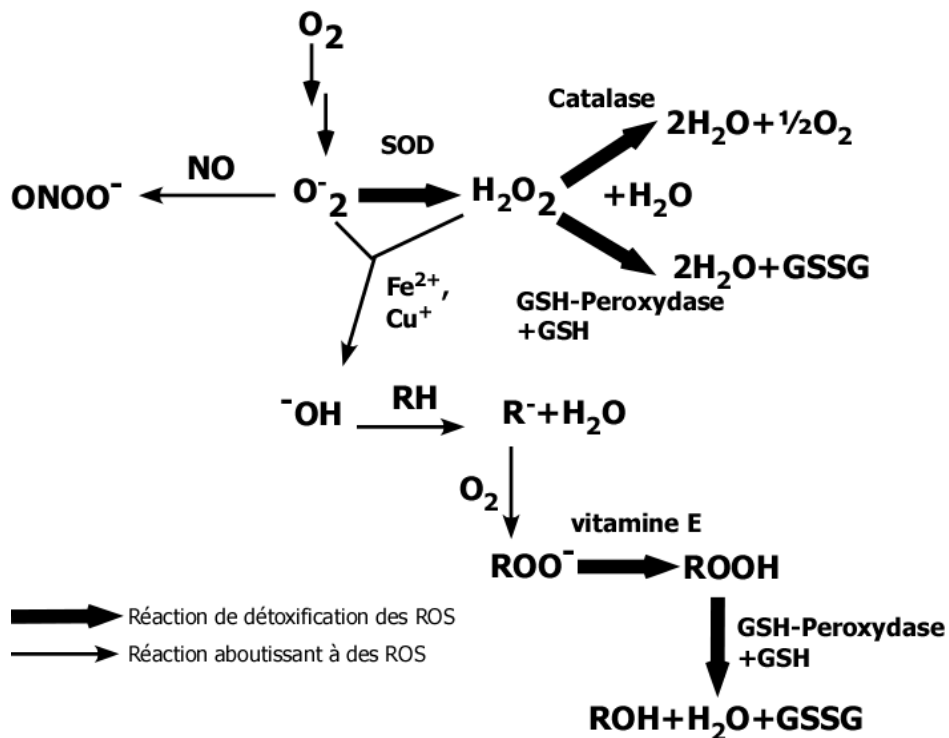


Figure 4 : Représentation schématique des réactions aboutissant à la production de ROS et site d'action des principaux systèmes de défense anti-oxydante. SOD : superoxyde dismutase ; GSH-peroxydase : glutathion peroxydase ; O_2^- , radical superoxyde; H_2O_2 , peroxyde d'hydrogène; HO° , radical hydroxyle; NO, monoxyde d'azote; O_2 , dioxygène; $ONOO^-$, ion peroxyinitrite; ROO^- , radical peroxyde; RO° radical alkoxyde; R, chaîne carbonée.
 Source : [http://fr.wikipedia.org/wiki/Radical_\(chimie\)](http://fr.wikipedia.org/wiki/Radical_(chimie)).

La principale source endogène de ROS est la mitochondrie, *via* la chaîne de transport d'électrons. L' O_2° , principalement produit par les complexes mitochondriaux

I (NADH/ ubiquinone oxydoréductase) et III (ubiquinone –cytochrome c réductase) est hautement réactif et traverse facilement la membrane mitochondriale interne, où il peut être réduit en H_2O_2 sous l'action de la SOD (Figure 5). Le H_2O_2 peut également être généré par les peroxysomes, au niveau desquels il est converti en H_2O et oxygène moléculaire grâce à la catalase, ce qui empêche son accumulation. Cependant, lorsque les peroxysomes sont endommagés, le H_2O_2 est libéré dans le cytosol et en présence de métaux de transition comme l'ion ferreux réduit (Fe^{2+}), il peut être converti par la réaction de Fenton en OH^\bullet hautement réactif, le plus nocif de tous les ROS (Valko *et al.* 2007, Valko *et al.* 2006). Les ROS sont aussi produits en permanence par différents systèmes enzymatiques dont les plus importants sont les NADPH oxydases, la glucose oxydase et les NO synthases (NOS). Les ROS peuvent être générés par la libération de fer libre à partir des protéines chélatrices ferritine et transferrine, et par la dégradation sous l'action de la MAO mitochondriale des neurotransmetteurs aminés, *i.e.* les catécholamines et la sérotonine (Poprac *et al.* 2017, Valko *et al.* 2016).

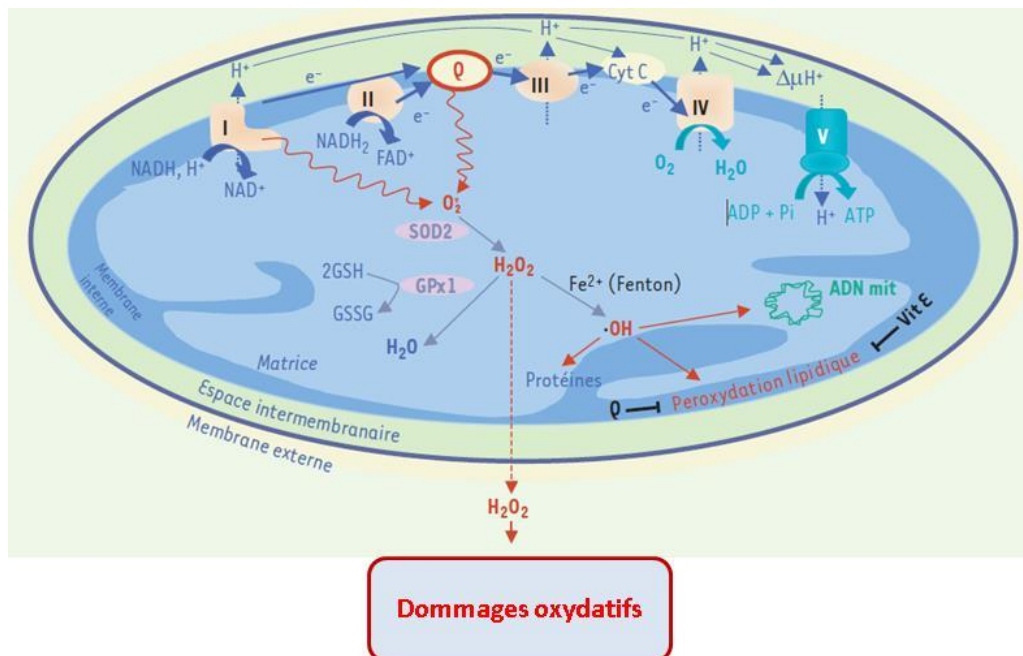


Figure 5 : Représentation schématique des composants protéiques de la chaîne de transport des électrons et des sites de production des ROS. Dans les conditions physiologiques, 2 à 6% d' O_2 moléculaire échappe à la réduction complète en H_2O et subit une réduction mono-électronique au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire, pour donner naissance à l'ion

superoxyde ($O_2^{\circ-}$). Ce dernier est métabolisé par la superoxyde dismutase (SOD2, ou MnSOD, localisée dans la matrice mitochondriale) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui sera à son tour décomposé en H_2O par la glutathion peroxydase (GPx1), qui utilise le glutathion réduit (GSH) comme co-facteur. En présence d'ions ferreux (Fe^{2+}), le H_2O_2 se transforme en radical hydroxyle (OH°) par la réaction de Fenton, au sein de la matrice mitochondriale ou dans le cytoplasme après diffusion. Ces espèces dérivées de l'oxygène (ROS) provoquent une attaque oxydative des biomolécules cellulaires conduisant à la peroxydation lipidique (pouvant-être limitée par des piègeurs de radicaux libres, de nature lipophile, tels que la vitamine E ou le coenzyme Q), mais aussi à l'oxydation des protéines (cytoplasmiques et nucléaires) et de l'ADN (mitochondrial et nucléaire). D'après (Carriere *et al.* 2006).

Le cerveau est particulièrement sensible aux dommages cellulaires que peut causer le stress oxydatif (Dringen 2005, Love 1999, Rice *et al.* 2002, Schipper 2004, Wilson 1997) car il possède *i*) un métabolisme oxydatif élevé (il consomme 20% de l'oxygène total de l'organisme) associé à un système antioxydant endogène faible, ce qui augmente la probabilité d'accumulation de ROS, *ii*) un taux important de lipides polyinsaturés, cible privilégiée de peroxydation lipidique induite par les ROS, et *iii*) un taux élevé en ions ferreux qui réagissent avec le H_2O_2 et l' $O_2^{\circ-}$, pour former l' OH° radical hautement toxique, ou avec l'oxyde nitrique (NO) pour produire l' $ONOO^-$ (Valko *et al.* 2016, Valko *et al.* 2007). Ainsi le cerveau est un organe fortement exposé aux ROS mais peu efficace pour les éliminer et combattre le stress oxydant. Plusieurs études ont démontré que le stress oxydatif est impliqué dans diverses maladies neurodégénératives (Emerit *et al.* 2004, Schipper 2004) et est associé à la perte sélective de neurones dopaminergiques de la SNpc dans la MP (Cole *et al.* 2005, Sherer and Greenamyre 2005). Bien qu'il soit difficile de distinguer le rôle causal du stress oxydatif dans l'initiation ou la progression de la maladie, l'analyse *post-mortem* de cerveaux a révélé des niveaux accrus de produits de la peroxydation lipidique comme le 4-hydroxyl-2-nonenal (HNE) et le malondialdéhyde (MDA), de protéines carbonylées issues de l'oxydation des protéines et d'oxydation de l'ADN et de l'ARN avec un taux accru de 8-hydroxy-désoxyguanosine et de 8-hydroxy-guanosine (8-OH-dG), au niveau de la SN et du

striatum de patients atteints de la MP (Gaki and Papavassiliou 2014, Jenner 2003). Ces altérations sont associées entre autre à une baisse de l'activité cérébrale et plasmatique des enzymes antioxydantes (SOD, catalase, peroxydases...) ((Mythri *et al.* 2011, Venkateshappa *et al.* 2012a, Venkateshappa *et al.* 2012b) et à une diminution du taux du GSH dans la SNpc (Harish *et al.* 2011, Mythri *et al.* 2011). Outre l'attaque des biomolécules, une cible de ces ROS est la chaîne de transport des électrons (Bhat *et al.* 2015, Zhu and Chu 2010), entraînant des dommages mitochondriaux et une production ultérieure de ROS.

Plusieurs études indiquent que les neurones dopaminergiques de la SNpc sont particulièrement vulnérables au stress (Herrera *et al.* 2017, Hirsch *et al.* 1997). En effet, les neurones dopaminergiques sont de façon constitutive, exposés à de fortes quantités de H₂O₂ et de radicaux libres produits par le métabolisme de la dopamine et la grande quantité de mitochondries, site endogène de production de ROS (Hirsch *et al.* 1997, Hirsch 1993, 1992). La dopamine est un catéchol actif, et des ROS peuvent être produits au cours de son oxydation par des processus enzymatique ou non enzymatique. La dégradation oxydative enzymatique de la dopamine implique la monoamine oxydase mitochondriale qui produit du H₂O₂, et la dégradation non enzymatique par auto-oxydation, source de grande quantité de superoxydes, de peroxydes et de quinones qui endommagent les protéines en réagissant avec les groupements thiols (Figure 6). De plus, la présence dans les neurones dopaminergiques de taux élevés en ions ferreux favorise grandement l'accumulation de ROS hautement toxiques (Faucheux *et al.* 2003, Faucheux *et al.* 2002, Hirsch 2009, Hirsch and Faucheux 1998).

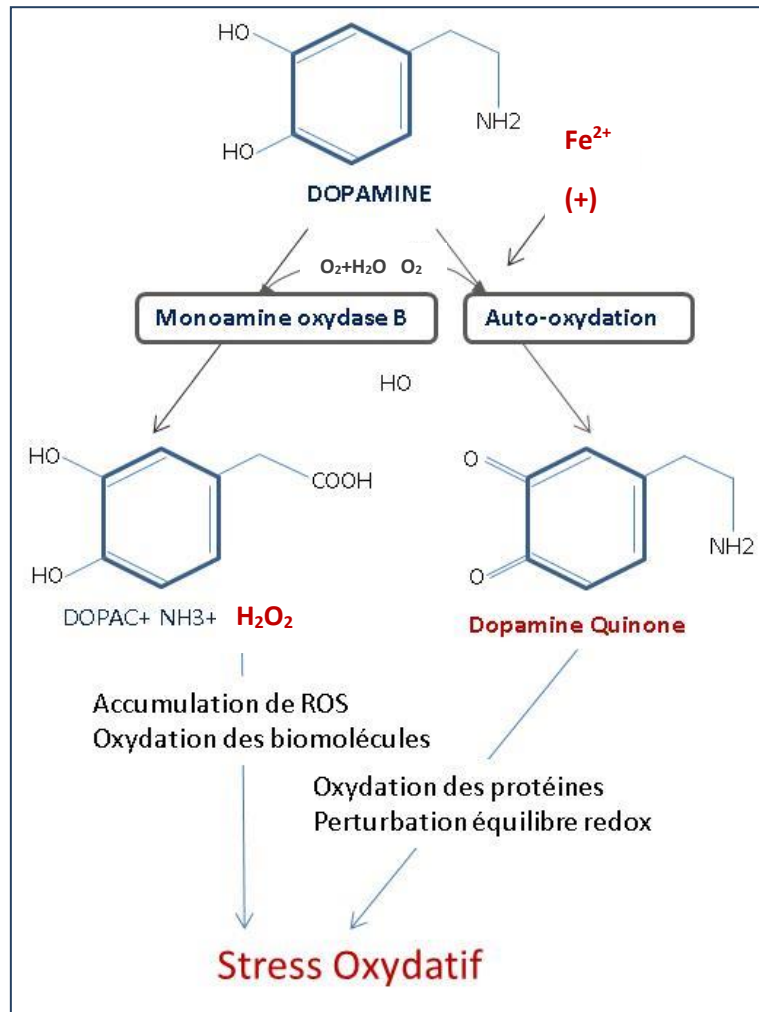


Figure 6 : Métabolisme de la dopamine dans le cerveau. La monoamine oxydase B mitochondriale assure la désamination oxydative de la dopamine, générant du dihydroxyphenylacétique (DOPAC), de l'ammonium (NH_3) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L'auto-oxydation spontanée de la dopamine en présence d'ions tels que le fer (Fe^{2+}) produit des quinones. Ces quinones sont des molécules réactives capables d'endommager les protéines en réagissant avec les résidus cystéines. L'oxydation de la dopamine conduit également à l'accumulation d'espèces oxygénées réactives (ROS) qui sont hautement toxiques pour la cellule, provoquant des dommages aux constituants cellulaires (lipides, protéines et ADN), l'agrégation de protéines et un dysfonctionnement mitochondrial conduisant à la mort cellulaire.

Par ailleurs, les moyens de défenses anti-oxydantes intrinsèques dans la région de la SN sont plus réduits que dans d'autres régions du cerveau (Dias *et al.* 2013, Herrera *et al.* 2017). En effet, l'environnement astrocytaire, cellules impliquées dans l'approvisionnement des neurones en facteurs antioxydants et neuroprotecteurs, est

faible dans la SN au profit d'un nombre important en cellules microgliales, médiateurs de l'inflammation (Niranjan 2014, McGeer and McGeer 2008, Mena *et al.* 2002). Les astrocytes sont les seules cellules à exprimer la GPx, une enzyme déterminante dans la détoxification du H₂O₂ produit par le métabolisme oxydatif de la dopamine. Le GSH représente le principal dissipateur de ROS dans le système nerveux central (SNC) et sa biosynthèse par les neurones est exclusivement dépendante de la fourniture du précurseur Cys-Gly et de l'enzyme glutamylcystéine ligase à partir des astrocytes avoisinants (Gegg *et al.* 2002, Solano *et al.* 2008). L'environnement astroglial réduit dans la SN conditionne des taux faibles en GSH dans les neurones dopaminergiques de la SNpc (Herrera *et al.* 2017, Hirsch 1992), qui limitent la capacité d'élimination des ROS.

Les causes de l'induction du stress oxydatif restent inconnues, cependant le dysfonctionnement de la mitochondrie et de la phosphorylation oxydative, l'augmentation du métabolisme de la dopamine et du taux d'ions ferreux, ainsi que la diminution de l'efficacité des voies de défense anti-oxydantes (Bulteau *et al.* 2017, Hirsch and Faucheux 1998, Ruberg *et al.* 1997) pourraient être source du stress oxydatif capable de détruire les neurones dopaminergiques dans la MP. Ces données sont confortées par la diminution du taux de GSH, l'augmentation du ratio de fer réduit (Fe²⁺) / fer oxydé (Fe³⁺) (Gaki and Papavassiliou 2014) et un déficit en complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale retrouvés dans les neurones dopaminergiques de la SNpc des patients atteints de la MP (Dias *et al.* 2013, Hirsch 1993, Jenner 2003).

5.2. Implication du dysfonctionnement mitochondrial

Les mitochondries jouent une double fonction de source et de cible de ROS, et plusieurs études suggèrent que le dysfonctionnement mitochondrial joue un rôle essentiel dans la pathogenèse de la MP (Bhat *et al.* 2015, Greenamyre *et al.* 2001, Schapira *et al.* 1989, Zhu and Chu 2010, Zhu *et al.* 2012). Les mitochondries sont des organites dynamiques assurant de nombreuses fonctions dans la cellule. Outre leur rôle

dans la production d'énergie, elles contrôlent l'homéostasie calcique, la réponse au stress et les voies de mort cellulaire. Par conséquent, une altération de la fonction mitochondriale entraîne un dommage cellulaire et est liée à la neurodégénérescence (Zhu and Chu 2010). Le dysfonctionnement mitochondrial a été initialement associé à la physiopathogénèse de la MP à la suite du développement du parkinsonisme induit par le MPTP, drogue qui inhibe le complexe I mitochondrial associé à une perte importante de neurones dopaminergiques au niveau du SNpc, comme révélé par l'analyse *post-mortem* chez des toxicomanes ayant consommé cette neurotoxine (Bove and Perier 2012). Depuis ces observations, plusieurs études ont indiqué une diminution de l'activité du complexe I et de l'ubiquinone dans la SN des patients atteints de la MP, associée à une dégénérescence neuronale (Keeney *et al.* 2006, Schapira *et al.* 1989). Les études génomiques ont montré que l'expression des gènes codants pour les protéines mitochondriales est réprimée dans les neurones dopaminergiques des patients atteints de la MP (Eltner *et al.* 2011). Un déficit de l'activité du complexe I de la chaîne mitochondriale a également été observé dans les plaquettes et le muscle squelettique des patients atteints de la MP (Parker *et al.* 1989, Swerdlow *et al.* 1998). L'ensemble de ces données indique que le fonctionnement mitochondrial est fortement altéré dans la MP, processus qui pourrait affecter la biogenèse des organelles, la fusion/fission mitochondriale et leurs fonctions de défense cellulaire (lutte contre le stress oxydatif, mitohagie) (Dias *et al.* 2013). En outre, la mutation de diverses protéines mitochondriales est liée à certaines formes héréditaires de la MP (Plun-Favreau *et al.* 2008, Wood-Kaczmar *et al.* 2008). Ainsi, la mutation de l'ATP13A2, une ATPase de type P induit un syndrome parkinsonien atypique récessif autosomique, associé à un accroissement de la masse mitochondriale responsable d'une augmentation de la consommation d'oxygène et de la production de ROS (Gusdon *et al.* 2012, Zhu *et al.* 2012).

5.3. La Neuroinflammation

Le lien entre la MP et la neuroinflammation a été établi initialement par une étude *post-mortem*, décrivant la présence de cellules microgliales activées exprimant la NO-synthase inducible (iNOS) et des taux élevés en cytokines pro-inflammatoires dans la SNpc (McGeer *et al.* 1988). Les cellules microgliales sont des composants du système immunitaire inné du SNC, cellules qui deviennent activées lors d'une lésion cérébrale. Ainsi, en réponse à la présence de pathogènes ou l'accumulation de protéines anormales dans leur environnement, les cellules microgliales s'activent et présentent ces antigènes aux cellules du système immunitaire telles que les lymphocytes T. Les cellules microgliales activées sont une source importante de superoxydes et de NO, qui à leur tour contribuent au stress oxydatif dans le microenvironnement cérébral. Ces cellules peuvent également favoriser la neurodégénérescence en produisant d'autres agents potentiellement toxiques tels que le glutamate, le *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α), des cytokines pro-inflammatoires et des chémokines (McGeer and McGeer 2004, 2008).

Des travaux récents suggèrent que la production de facteurs inflammatoires par les cellules gliales activées (astrocytes et microglie) serait impliquée dans la perte des neurones dopaminergiques dans la MP (Iannaccone *et al.* 2013). En effet, la surexpression anormale, au cours de la MP, de l' α -synucléine dans les cellules gliales altère les fonctionnalités neurotrophiques de ces cellules, exaspère la réponse inflammatoire gliale (sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires), produit un stress oxydant et précipite la mort des neurones dopaminergiques (Bruck *et al.* 2016, Cao *et al.* 2011, Li *et al.* 2011). Il est intéressant de noter qu'un traitement visant à réduire la réactivité microgliale à l'aide d'agents antioxydant (Brynskikh *et al.* 2010) et anti-inflammatoire (Johnston *et al.* 2008, McGeer and McGeer 2007), atténue le processus inflammatoire et prévient la neurodégénérescence dans la substance noire chez les souris intoxiquées au MPTP. Ces données indiquent que l'activation des

cellules gliales contribuerait à la perte neuronale *via* la production de cytokines pro-inflammatoires et de radicaux libres conduisant à une rupture de l'équilibre RedOx.

Au cours du processus de dégénérescence des neurones dopaminergiques, les cellules microgliales activées reconnaîtraient les neurones endommagés comme des éléments étrangers et agiraient contre eux, ce qui *in fine* précipite la perte neuronale. Cette mort des neurones exacerbe le processus neuro-inflammatoire et déclenche une réponse immunitaire où des chimiokines sont produites sur le site de l'inflammation par les cellules gliales réactives et attirent, au niveau de la zone lésée, des cellules immunitaires circulant dans le sang (Su and Federoff 2014). Les cellules microgliales activées sont particulièrement néfastes pour les neurones dopaminergiques *via* la surproduction de cytokines pro-inflammatoires, de ROS et RNS concomitante à une diminution de la sécrétion de facteurs trophiques nécessaires au maintien de la viabilité neuronale (McNaught and Jenner 1999, McNaught *et al.* 2001). La présence de lymphocytes T associée à la microglie activée a été détectée dans la SN de patients atteints de la MP, ainsi qu'une augmentation des médiateurs pro-inflammatoires *i.e.* interleukines (IL)-1beta, IL-2, IL-4, IL-6 et la forme soluble de Fas dans le striatum et le liquide céphalo-rachidien (Mogi *et al.* 1996a, Mogi *et al.* 1996b, Nagatsu *et al.* 2000b). De plus, le taux des marqueurs neuroinflammatoires tels que l'IL-2, l'IL-6, le TNF- α et la chemokine RANTES est élevé dans le plasma de personnes souffrant de la MP (Hirsch *et al.* 2003a, Hirsch and Hunot 2009).

5.4. Les mécanismes de mort cellulaire

L'augmentation du stress oxydatif, le dysfonctionnement mitochondrial, l'agrégation des protéines, le dépôt de fer ainsi que l'inflammation et l'activation des cellules gliales sont différents facteurs qui *in fine* déclenchent la mort cellulaire programmée ou apoptose (Ruberg *et al.* 1997). Ce phénomène d'apoptose a été mis en évidence par des changements morphologiques observés en microscopie électronique (Kerr *et al.* 1972, Williams and Bell 1985). L'apoptose commence par une perte

d'adhésion de la cellule qui s'isole, suivie par une réduction du volume cellulaire suite à la condensation du noyau et du cytoplasme, puis une fragmentation du réseau mitochondrial. Il s'en suit, une fragmentation de l'ADN et un bourgeonnement de la membrane plasmique qui conduisent à la formation de vésicules appelées corps apoptotiques. Au niveau mécanistique, il existe deux principales voies qui conduisent à l'apoptose, à savoir les voies extrinsèque et intrinsèque (Kerr 2002, Peter *et al.* 1997). L'apoptose par la voie extrinsèque est induite par l'activation des récepteurs de mort (FAS), qui appartiennent à la superfamille des TNFs. La voie intrinsèque est quant à elle activée par différents signaux intracellulaires dont le stress oxydatif, qui vont agir sur l'expression de régulateurs de l'apoptose comme les membres de la superfamille des protéines *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2), aboutissant à une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial et un relargage du cytochrome C dans le cytoplasme. Ces deux voies conduisent à l'activation des caspases qui sont des protéases à cystéine, menant à la fragmentation de l'ADN et à l'activation de protéases comme les calpaïnes.

L'apoptose est une mort cellulaire physiologique contrôlée et parfois génétiquement programmée nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires. L'apoptose joue un rôle primordial dans la formation et la survie de l'organisme. Néanmoins, dans certaines pathologies, le processus se trouve exacerbé. C'est ainsi qu'en 1996, Mochizuki (Mochizuki *et al.* 1997) et ses collaborateurs ont révélé par la technique de *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling* (TUNEL) un profil de dégradation de l'ADN en échelle, spécifique de l'apoptose dans des cerveaux de parkinsoniens *post-mortem*. Une étude par microscopie électronique a aussi identifié la présence de noyaux apoptotiques avec des modifications ultra-structurales typiques chez les patients atteints de la MP (Anglade *et al.* 1997, Ruberg *et al.* 1997). Ces premiers travaux ont été confirmés par la technique du double marquage fluorescent de l'ADN et la présence de chromatine condensée dans les cellules dopaminergiques de personnes souffrants de la MP (Tatton *et al.* 1998). De plus, les

formes actives des caspases-8, -9, -1 et -3, enzymes de la cascade apoptotique, sont fortement exprimées dans les neurones dopaminergiques de la SNpc de patients parkinsoniens (Hirsch *et al.* 1999, Tatton 2000, Tatton *et al.* 2003) (Apop-Mogi *et al.* 2000), confirmant l'implication des mécanismes apoptotiques dans la mort des neurones de la SNpc dans cette pathologie. Une augmentation de l'expression du facteur suppresseur de tumeur p53 et de la protéine *Bcl-2-associated X* (Bax) membre pro-apoptotique de la famille des protéines Bcl-2, a aussi été observée dans la SNpc de cerveaux de patients parkinsoniens et le cerveau de modèles animaux parkinsoniens induit par une administration de MPTP (Hartmann *et al.* 2000, Hirsch *et al.* 1988, Hirsch *et al.* 2003b, Turmel *et al.* 2001). D'autres études *post-mortem* ont également suggéré l'implication de FAS et FADD, deux composants des récepteurs de mort dans les cerveaux de patients parkinsoniens (Hartmann 2004, Hartmann and Hirsch 2001, Hartmann *et al.* 2002). En effet, le blocage de ces récepteurs à l'aide d'anticorps prévient la mort des neurones dopaminergiques (Hurelbrink *et al.* 2001, Hurelbrink and Barker 2001). Ces données indiquent l'implication des voies intrinsèque et extrinsèque dans l'initiation de l'apoptose observée chez les personnes atteintes de la MP.

6. Traitements

A ce jour, il n'existe pas de traitements capables de guérir la MP. Seuls les symptômes de la maladie peuvent être pris en charge par des approches médicamenteuses ou chirurgicales. Les approches médicamenteuses visent à compenser le déficit dopaminergique au niveau du striatum en administrant soit un précurseur de dopamine, soit un agoniste dopaminergique ou en inhibant le métabolisme de la dopamine par la MonoAmine-Oxydase B (MAO B) ou la Cathécol-O-Méthyl Transférase (COMT). Des médications à visée anticholinergiques sont aussi employées pour compenser l'altération de la boucle nigrostriée et la perte du contrôle dopaminergique sur les neurones cholinergiques striataux. Les traitements neurochirurgicaux consistent entre autre en la stimulation à haute fréquence du noyau

subthalamique. Toutefois, ces traitements restent palliatifs et ne protègent pas le bon fonctionnement des neurones dopaminergiques, d'où la nécessité de développer des stratégies capables de protéger les cellules neuronales des processus neurodégénératifs afin de stopper ou de ralentir la progression de la maladie.

6.1. Les traitements chirurgicaux

La thalamotomie, destruction du noyau ventro-latéral de l'un des deux thalamus, a été jusqu'à l'avènement de la dopathérapie, un traitement de choix de la maladie (Cooper 1953, Svinnilson *et al.* 1960). Aujourd'hui, les cliniciens y recourent en cas d'échec médicamenteux. La démonstration d'une hyperactivité du GP et du NST dans la MP à l'origine des symptômes moteurs de la maladie (Crossman 1989) a relancé les perspectives de la neurochirurgie. De fait, la thalamotomie permet de réduire les tremblements chez plus de 85% des patients, mais n'améliore pas la bradykinésie et l'akinésie (Kelly *et al.* 1987a, Kelly *et al.* 1987b). Cependant, la pratique de la thalamotomie bilatérale a souvent pour conséquence de causer des déficiences cognitives et linguistiques.

La destruction de structures cérébrales n'étant pas sans risque, la stimulation cérébrale profonde (SCP) s'est développée au cours des dernières années (Klockgether *et al.* 1994). Cette technique, moins invasive et réversible, consiste à placer des électrodes de stimulation à haute fréquence dans la structure cérébrale à inhiber, comme le thalamus et des noyaux subthalamiques (Henderson and Dunnett 1998, Klockgether *et al.* 1994, Luquin 1997, Rodriguez *et al.* 1998) et reproduit les résultats de la thalamotomie et de la pallidotomie (Benabid *et al.* 2000, Benabid *et al.* 2001, Benabid and Torres 2012, Limousin-Dowsey *et al.* 1999). La SCP est pratiquée surtout chez les patients très handicapés par les tremblements ou par les déficits moteurs associés à la MP (Ewert *et al.* 2017, Guzzi *et al.* 2016).

6.2. Les traitements médicamenteux

Plusieurs approches médicamenteuses pharmacologiques sont utilisées pour compenser le déficit dopaminergique en termes de biodisponibilité et d'activité (Martinez-Martin *et al.* 2015). Ainsi les traitements médicamenteux consistent à :

- apporter le précurseur de la DA, la L-Dopa : c'est la dopathérapie.
- mimer l'action de la dopamine sur les récepteurs dopaminergiques à l'aide d'agonistes dopaminergiques.
- inhiber les enzymes du catabolisme de la DA comme la COMT ou la MAO-B pour diminuer sa dégradation, via l'utilisation d'un inhibiteur de la COMT (ICOMT) ou de la MAO-B (IMAO-B) (LeWitt and Taylor 2008).

6.2.1. La Dopathérapie

En 1911 le biochimiste américain Casimir Funk a synthétisé pour la première fois la L-Dopa, considérée au départ comme une toxine, car source de troubles digestifs sévères. Elle fut redécouverte 40 ans plus tard par Arvid Carlsson qui montra que des injections de L-Dopa dans un modèle animal de MP provoque une amélioration clinique en augmentant le niveau de DA, dont le taux endogène est très fortement réduit dans le striatum des patients atteints de la MP. Mais l'efficacité de ce traitement ne fut pour autant reconnue qu'en 1968, lorsqu'une étude de Georges Cotzias rapporta un bénéfice moteur spectaculaire et prolongé chez des patients parkinsoniens traités par une forte dose de L-Dopa (Cotzias *et al.* 1968).

Le traitement médicamenteux faisant appel à la lévodopa ou L-Dopa connu sous le nom de dopathérapie, consiste en l'administration orale et chronique de L-dopa, le précurseur de la dopamine (Figure 7), qui mime son action dans le cerveau (Cotzias *et al.* 1976, Foley 2000, Lees *et al.* 2015, LeWitt and Fahn 2016). L'administration de la L-Dopa, capable de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE), permet de compenser le manque en DA observé chez les patients souffrants de la MP. En effet,

chez le patient parkinsonien, la capacité de synthèse et de stockage des neurones dopaminergiques nigrostriés n'est pas totalement perdue. Ainsi, la L-Dopa exogène sera captée par les neurones dopaminergiques subsistants et sera ensuite transformée en DA.

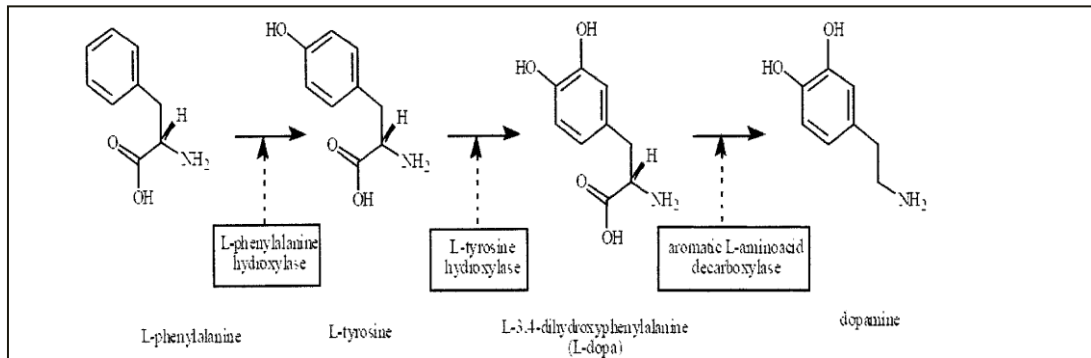


Figure 7 : Voie biochimique de biosynthèse de la dopamine. La dopamine (DA) est synthétisée dans les neurones à partir de la tyrosine. Cet acide aminé essentiel est métabolisé en L-Dopa par la tyrosine hydroxylase, une enzyme limitante contrôlant la production de la DA. La L-Dopa est ensuite transformée en DA par décarboxylation assurée par la DOPA-décarboxylase.

Ce traitement donne des résultats satisfaisants en termes de motricité dans les formes débutantes de la maladie, mais inéluctablement ces améliorations ne se maintiennent pas dans le temps. La période au cours de laquelle la dopathérapie apporte d'importantes améliorations est appelée « lune de miel », suite à laquelle l'efficacité du traitement fluctue et des complications motrices apparaissent (Marti-Masso *et al.* 1996). Les effets indésirables centraux se manifestent par des fluctuations motrices et des dyskinésies liées à la perte inéluctable des neurones nigrostriataux et en conséquence une diminution des capacités de stockage de la DA, ne permettant plus de compenser les variations des concentrations plasmatiques de L-Dopa, ainsi que des troubles psychiatriques (agitation, anxiété, délire interprétatif, hallucinations) qui seraient la conséquence d'une stimulation excessive des récepteurs dopaminergiques centraux (Defebvre 2004, Montastruc *et al.* 2006).

6.2.2. Les agonistes dopaminergiques

Le traitement aux agonistes dopaminergique est l'autre grande approche médicamenteuse (Alonso Canovas *et al.* 2014, Shin *et al.* 2014, Stocchi *et al.* 2016). Au stade des complications motrices, les agonistes dopaminergiques administrés en association avec la L-Dopa permettent d'améliorer l'efficacité thérapeutique de la L-Dopa, d'atténuer les fluctuations motrices et de réduire les dyskinésies (Gallagher and Schrag 2008, LeWitt and Taylor 2008, Yamamoto and Schapira 2008). Ils possèderaient en outre un effet neuroprotecteur lorsqu'ils sont administrés à la phase initiale de la MP, en s'opposant progressivement à la dégénérescence des neurones de la SNpc (Cacabelos 2017, LeWitt and Taylor 2008, Szczudlik and Rudzinska 2007). Des études en imagerie fonctionnelle, par tomographie par émission de positrons (TEP) à l'aide du radiotracteur ¹⁸fluoro-Dopa marquant les terminaisons dopaminergiques de la voie nigrostriée ont montré une progression plus lente de la maladie chez les patients parkinsoniens traités par le Ropinirole, un agoniste des récepteurs dopaminergiques de type D2, D3 et D4 par rapport aux patients traités par L-Dopa (de la Fuente-Fernandez *et al.* 2010, Stocchi 2009).

6.2.3. Les inhibiteurs d'enzymes

Les inhibiteurs d'enzymes sont des molécules permettant de prolonger l'effet de la L-Dopa en inhibant sa dégradation par deux enzymes la COMT et la MAO-B (Dezsi and Vecsei 2017, Muller 2015, Rascol *et al.* 2015). Les ICOMT sont des inhibiteurs compétitifs dont la liaison se fait avec le site actif de l'enzyme. Ils sont toujours administrés en association avec la L-DOPA dont ils prolongent la durée d'action. Les IMAO sont des inhibiteurs non compétitifs de la MAO-B capables en association d'augmenter de 20 à 30% les effets bénéfiques de la dopathérapie. Toutefois, ce type de traitement prolonge aussi les effets indésirables de la L-Dopa (Dezsi and Vecsei 2017, Jankovic and Stacy 2007, Muller 2015).

7. Modèle Expérimental d'étude

Plusieurs modèles expérimentaux de la MP ont été utilisés, tant *in vitro* qu'*in vivo* afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement de la maladie (Bove and Perier 2012, Dauer and Przedborski 2003). Les modèles expérimentaux animaux de la MP idiopathique les plus utilisés et les mieux caractérisés afin d'optimiser son traitement et limiter voire enrayer les effets secondaires sont le MPTP et la 6- hydroxydopamine (6-OHDA). D'autres modèles animaux transgéniques ont été développés visant à reproduire les mécanismes neurodégénératifs observés dans les formes familiales de la MP.

7.1. Caractéristiques du modèle d'intoxication par la 6-OHDA

La 6-OHDA est un analogue hydroxylé de la dopamine, isolé pour la première fois en 1959. Cette toxine est généralement captée de façon sélective par les cellules pourvues d'un système de transport membranaire des catécholamines, appelé aussi dopamine transporters (DAT) où elle est accumulée et rapidement oxydée, produisant de fortes quantités de radicaux libres, responsables d'un stress oxydant sévère (Glinka et al. 1996, Dodel et al. 1999, Chen et al. 2004). La spécificité de la 6-OHDA pour les systèmes catécholaminergiques s'explique par sa structure, très proche de la dopamine et de la noradrénaline (Blum et al. 2001). En dépit de l'absence de DAT sur la membrane des neurones en grain, la vulnérabilité de ce type de neurones à cette toxine a été largement rapportée par plusieurs équipes (Monti et al. 2007, Polazzi et al. 2009). Ainsi, le phénomène d'auto-oxydation non-enzymatique extracellulaire de la 6-OHDA qui génère de fortes quantités de ROS (le H_2O_2 , le O_2^- et le OH^*) et des composés quinoniques, substances hautement toxiques capables de traverser la membrane cellulaire et d'induire la mort par un stress oxydatif (Glinka et al. 1996, Noelker et al. 2005). Cette production de radicaux libres est amplifiée par les ions ferreux qui catalysent la réaction de Fenton dont nous avons parlé dans le chapitre précédent. Des

études *in vivo* ont corrélées ces résultats. En effet, de nombreux effets protecteurs de divers antioxydants, ainsi qu'une grande résistance de souris transgéniques surexprimant la SOD ou la GPx ont été observés (Bensadoun et al. 1998, Blum et al. 2001).

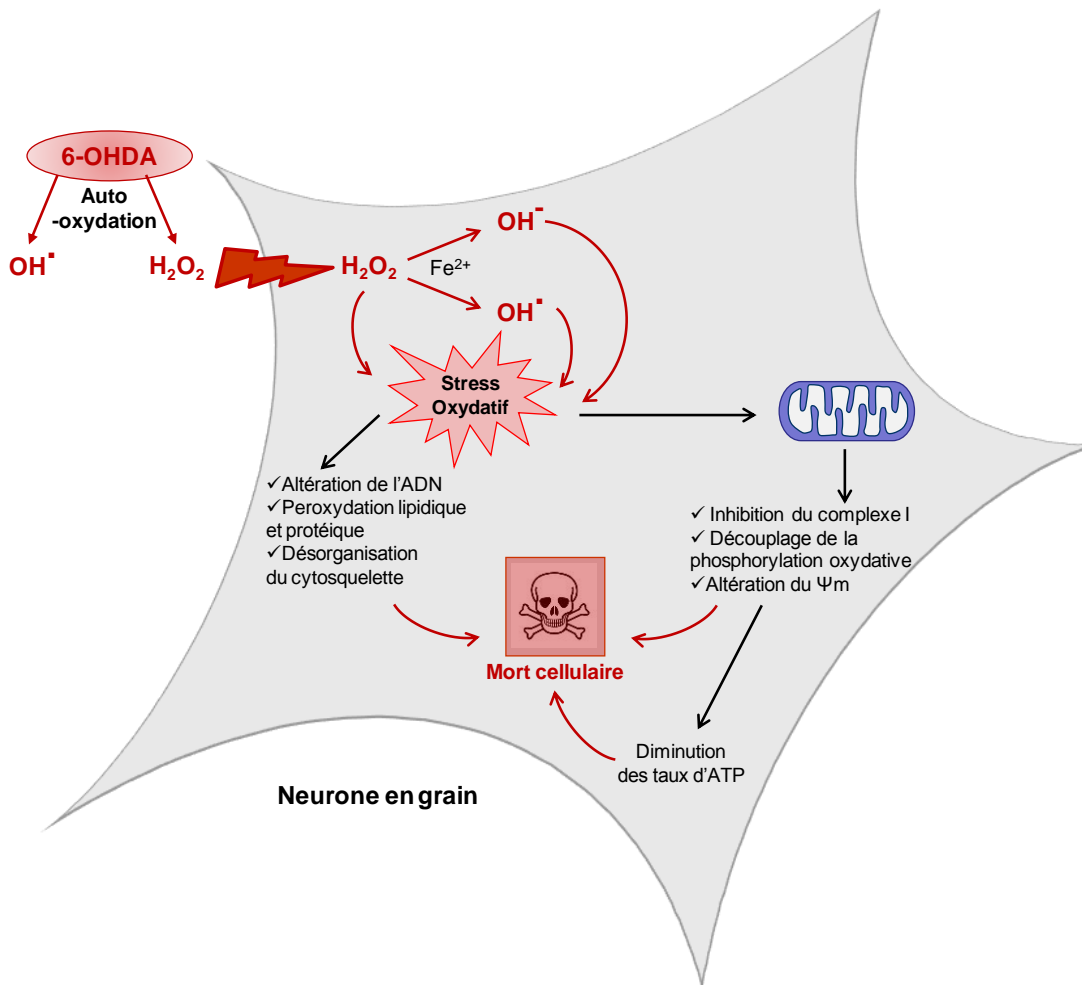


Figure 8 : Mécanismes impliqués dans la toxicité de la 6-OHDA.

L'accumulation des radicaux libres dans les neurones en grain, suite à l'auto-oxydation extracellulaire de la 6-OHDA, conduit à : (i) des modifications mitochondriales (inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, découplage de la chaîne de phosphorylation oxydative et diminution du potentiel membranaire mitochondrial [ψ_m]), qui concourent à la diminution des taux d'ATP ; (ii) la formation d'espèces radicalaires très réactives qui endommagent les macromolécules et participent à la désorganisation de la structure cellulaire. Ces événements conjugués conduisent à la mort des neurones d'après Kadour et al ; 2013

7.2. Caractéristiques du modèle d'intoxication par le MPTP

Le MPTP est une neurotoxine synthétique est connu par sa capacité d'induire le syndrome parkinsonien qui reproduit presque tous les symptômes de la MP : tremblement, rigidité, bradykinésie et instabilité posturale (Doudet *et al.* 1985b, a). D'un point de vue anatomopathologique, le modèle du MPTP provoque des lésions au niveau des systèmes dopaminergiques observées au cours de la MP (Forno *et al.* 1993) notamment une dégénérescence des terminaisons dopaminergiques au niveau du putamen par rapport au noyau caudé ; et une perte neuronale plus importante et progressive au niveau de la SNpc par rapport à l'aire ventrale tegmentale (VTA), avec une perte préférentielle au niveau des segments ventraux et latéraux de la SNpc (Bezard 2006, Sirinathsingji *et al.* 1990, Sirinathsingji *et al.* 1992). Il est connu que les effets toxiques du MPTP ne sont pas limités aux régions dopaminergiques et des lésions des systèmes noradrénergiques et sérotoninergiques ont été rapportées (Mitchell *et al.* 1985, 1986), celles-ci étant néanmoins d'une plus faible ampleur que celles observées dans la voie nigro-striée. Ce modèle ne reproduit pas toutes les caractéristiques de la MP, comme la présence de corps de Lewy, même si des inclusions intra-neurales ont tout de même été décrites (Purisai *et al.* 2005).

Le MPTP n'est pas toxique en soit. Après avoir traversé la barrière hématoencéphalique, il est converti en 1-méthyl-4-phenyl-1,2-dihydropyridinium (MPDP⁺) par la MAO-B (Burns *et al.* 1984, Markey *et al.* 1984), surtout présente dans les astrocytes (Di Monte *et al.* 1996, Mallajosyula *et al.* 2008) et les neurones sérotoninergiques (Levitt *et al.* 1982) mais pas dans les neurones DA (Westlund *et al.* 1985, Westlund *et al.* 1993). Le MPDP⁺ s'oxyde ensuite spontanément en 1-méthyl-4-phenylpyridine (MPP⁺), composé neurotoxique (Castagnoli *et al.* 1985, Di Monte *et al.* 1987, Trevor *et al.* 1987a, Trevor *et al.* 1987b) (Figure 8). Différentes études ont montré que l'inhibition de la MAO-B prévenait la neurotoxicité due au MPTP (Markey *et al.* 1984). Une fois dans l'espace

extracellulaire, le MPP^+ est capté au niveau des terminaisons DA *via* le transporteur membranaire de la dopamine (DAT) (Gash *et al.* 1996, Russ *et al.* 1996). Le MPP^+ peut ainsi être libéré lentement et induire la dégénérescence des neurones DA (Mitchell *et al.* 1986, Bove and Perier 2012).

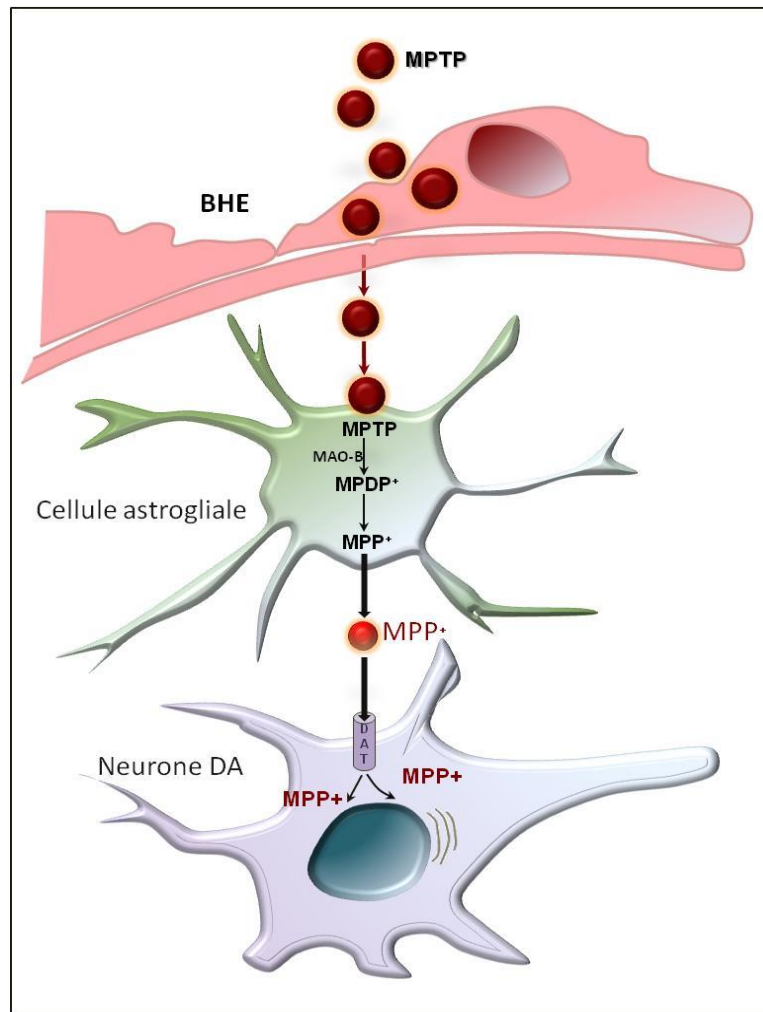


Figure 9 : Métabolisme du MPTP. Après administration systémique, le MPTP, qui est hautement lipophile, traverse la barrière hémato-encéphalique (BHE) en quelques minutes. Une fois dans le cerveau, la protoxine MPTP est oxydée en premier métabolite 1-méthyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium - (MPDP), par la monoamine oxydase B (MAO-B) seulement présente dans les cellules astrogliales et neurones sérotoninergiques (non représentés), puis complètement en MPP^+ . Une fois relargué dans le milieu extracellulaire, le MPP^+ est spécifiquement capté par les neurones dopaminergiques grâce aux transporteurs dopaminergiques (DAT).

Dans le cytosol des neurones dopaminergiques, le MPP^+ se retrouve soit: 1) séquestré dans des vésicules synaptiques par l'intermédiaire du transporteur vésiculaire

des monoamines (VMAT, *vesicular monoamine transporter*) qui réduisent sa concentration cytosolique et par conséquent ses effets délétères (Staal *et al.* 2000, Staal and Sonsalla 2000, Staal *et al.* 2001), 2) complexé avec la neuromélanine retardant ainsi sa libération cytoplasmique (D'Amato *et al.* 1987a, b, D'Amato *et al.* 1986) ou 3) en interaction avec un certain nombre d'enzymes, en particulier celles liées à des flavines et chargées négativement. Le MPP⁺ cytosolique est ensuite transporté de manière active vers les mitochondries. Une fois à l'intérieur des mitochondries, le MPP⁺ inhibe l'activité du complexe I de la chaîne de transport d'électrons, qui conduit rapidement à une diminution de la teneur en ATP tissulaire en particulier dans le striatum et le mésencéphale ventral, les régions cérébrales les plus sensibles au MPTP (Fabre *et al.* 1999). Une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial, une perturbation de l'homéostasie calcique et la production de radicaux libres sont les conséquences de la perturbation du flux d'électrons à travers le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale induit par le MPTP (Przedborski *et al.* 2000, Rojas *et al.* 2000). Le MPP⁺ peut également stimuler indirectement l'accumulation des ROS en induisant le relargage de la DA à partir des vésicules synaptiques dans le cytosol, probablement en raison de l'incapacité des transporteurs VMAT2 à maintenir les gradients de concentration à la suite de la chute d'ATP (Figure 9).

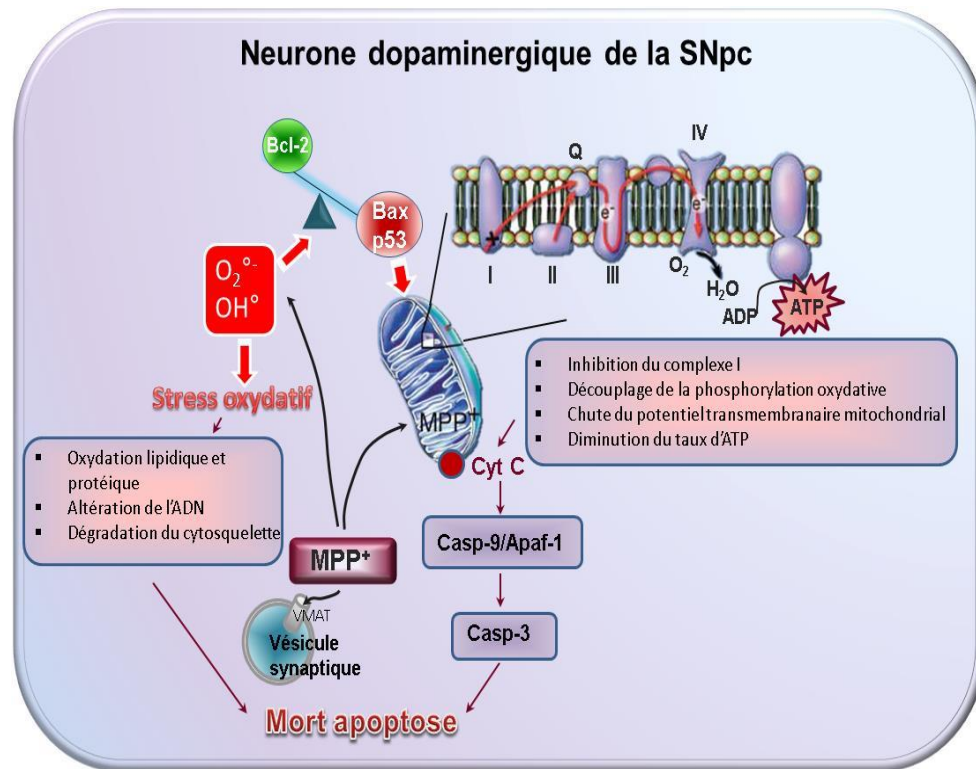


Figure 10 : Mécanismes intracellulaires impliqués dans la neurotoxicité du MPTP dans les neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* (SNpc). L'accumulation de MPP⁺ dans les neurones dopaminergiques conduit (1) à l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, au découplage de la chaîne de phosphorylation oxydative et à la diminution du potentiel membranaire mitochondrial qui concourent à la diminution des taux d'ATP, et (2) à la formation d'espèces radicalaires très réactives qui endommagent les macromolécules et participent à la désorganisation de la structure cellulaire. L'accumulation des superoxydes (O₂^{•-}) et peroxydes (OH[•]) ainsi que la dégradation des constituants cellulaires induisent l'expression de p53 ainsi que la surexpression de Bax et sa translocation vers la membrane mitochondriale, au profit d'une inhibition du membre anti-apoptotique Bcl-2. Ceci provoque la perméabilisation de la membrane mitochondriale et la libération dans le cytosol du cytochrome c (Cyt C) qui interagit avec la molécule Apaf-1 pour provoquer l'activation de la caspase-9, puis de la caspase-3, effectrice du processus apoptotique. Le MPP⁺ pourrait être transporté dans les vésicules synaptiques, par les transporteurs vésiculaires des monoamines (VMAT), ce qui retarde sa libération dans le cytoplasme.

Des études *in vivo* indiquent que les souris transgéniques surexprimant la SOD-1, sont résistantes à la dégénérescence des neurones dopaminergiques induite par le MPTP (Przedborski *et al.* 1992a, Przedborski *et al.* 1992b, Przedborski and Levivier 1992), confirmant l'importance du stress oxydatif dans la neurodégénérescence liée au MPTP.

L'administration chronique de MPTP induit la mort des neurones dopaminergiques de la SNpc par apoptose. En effet, une stimulation de l'expression du gène Bax et de l'activité des caspases-9 et -3 a été détectée dans ces neurones, avec en parallèle une inhibition de l'expression du gène anti-apoptotique Bcl-2 alors que les souris *knock out* (KO) pour le gène Bax et les souris transgéniques surexprimant Bcl-2 sont résistantes à la neurotoxicité du MPTP (Przedborski and Vila 2003, Vila and Przedborski 2003). Il a été également démontré que l'administration de MPTP conduit à l'accumulation et à la nitration de l' α -synucléine dans le cytosol des neurones dopaminergiques SNpc (Mandir *et al.* 1999), et les souris mutantes n'exprimant pas la α -synucléine sont résistantes à la neurodégénérescence dopaminergique induite par le MPTP (Dauer *et al.* 2002).

Ce type de modèle d'intoxication chronique est particulièrement adapté pour les études de neuroprotection, de neuroréparation et des mécanismes compensatoires mis en place, raison pour laquelle nous avons développé un modèle expérimental animal de la MP qui s'inspire des modèles chroniques cité plus haut dans ce travail de thèse.

II. La Neuroprotection : Implication des facteurs de susceptibilité astrogliale

Les thérapies actuelles de la MP n'empêchent pas la progression de la maladie et l'efficacité de ces traitements diminue au cours du temps, ce qui conduit inexorablement à la mort du patient. Des études cliniques et de tomographie par émission de positrons ont montré qu'au début des symptômes il y a déjà une réduction de 80% de la teneur en dopamine dans le striatum, mais qu'environ 50% des cellules dopaminergiques de la SNpc sont encore vivantes (Leenders 1997, Leenders *et al.* 1990, Linazasoro and Leenders 2004), d'où l'importance de développer des thérapies basées sur la neuroprotection et la neurorestauration. Le concept de la thérapie par neuroprotection est de créer et/ou modifier l'environnement physiopathologique de la région nigrostriée

vers un environnement qui préserve les fonctionnalités des neurones DA (Airavaara *et al.* 2012). La neurorestauration pourrait passer par un repeuplement en neurones dopaminergiques grâce à une transplantation en neurones dopaminergiques fœtaux ou en cellules neuroprogénitrices endogènes (Sawle *et al.* 1992). Une approche pour le neuroprotection serait d'identifier des facteurs neurotrophiques et/ou neuroprotecteurs (Airavaara *et al.* 2012, Voutilainen *et al.* 2015) capables de stopper ou limiter des processus menant à la mort cellulaire tels que le stress oxydatif et la neuroinflammation. En raison de leur capacité à agir directement sur les mécanismes d'apoptose des neurones dopaminergiques de la SN et la connaissance de leur mode d'action, les facteurs neurotrophiques endogènes représentent des candidats sérieux pour le développement de stratégies de neuroprotection (Airavaara *et al.* 2012, LeWitt and Taylor 2008, Lindholm *et al.* 2007, Sarkar *et al.* 2016). D'ailleurs, certains agents neuroprotecteurs endogènes de nature peptidiques ont déjà fait l'objet d'essais cliniques (Voutilainen *et al.* 2015).

Il est clairement admis que les astrocytes représentent la principale source de neurotrophines et de facteurs antioxydants et neuroprotecteurs dans le cerveau, ils contribuent, entre autres, à la neuroprotection et au ralentissement de la progression des processus de neurodégénérescence (Miyazaki and Asanuma 2017) (Garzon *et al.* 2016, Rappold and Tieu 2010, Sarkar *et al.* 2016). De ce fait, nous décrivons dans les paragraphes suivants les principales activités biologiques des astrocytes dans le SNC et leur implication dans la physiopathogenèse de la MP.

1. Caractéristiques fonctionnelles des astrocytes

Les astrocytes (ou cellules astrogliales) font partie de la famille des cellules gliales et représentent les cellules les plus abondantes du cerveau des mammifères (Freeman 2010). Les astrocytes possèdent un corps cellulaire d'environ 40-60 μm de diamètre, duquel partent de nombreux prolongements diversement ramifiés, leur conférant une

forme étoilée, qui se termine le plus souvent par des parties élargies appelées pieds astrocytaires (Oberheim *et al.* 2012). En raison de leurs interactions anatomiques avec les différents types cellulaires du SNC, *i.e.* les neurones, les cellules épendymaires, les cellules endothéliales et les péricytes, mais aussi les autres types de cellules gliales, les astrocytes sont des éléments indispensables au bon fonctionnement cérébral ((Garzon *et al.* 2016, Oberheim *et al.* 2012) (Figure 10).

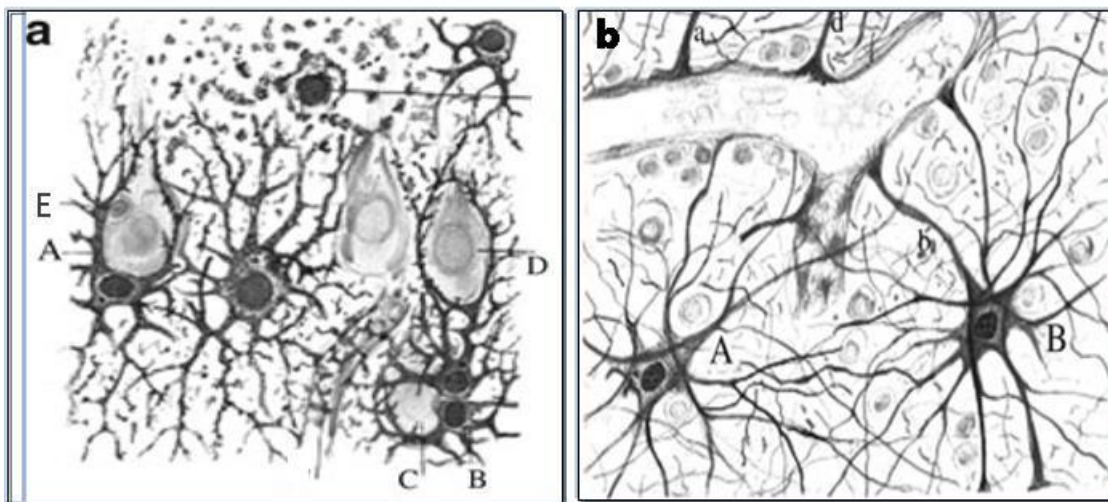


Figure 11 : Représentations schématiques des propriétés morphologiques des astrocytes et de leurs interactions avec des cellules du SNC. (a) Les astrocytes protoplasmiques (A, B et C) caractérisés par de nombreux prolongements courts et ramifiés. Leurs terminaisons appelées pieds astrocytaires entourent les corps cellulaires des neurones (D et E) dans la couche pyramidale de l'hippocampe. (b) Astrocytes fibrillaires (A et B) présentent de longs prolongements avec des ramifications peu nombreuses mais qui s'étendent sur de grandes distances rentrant en contact avec la paroi des vaisseaux sanguins au sein du cortex cérébral humain. Reproduction du schéma de Cajal d'après (Garcia-Marin *et al.* 2007).

Grâce à leur interaction anatomique et dynamique avec les différentes autres cellules du cerveau, les cellules astrogliales assurent de multiples activités biologiques (tableau 1); en particulier *i)* dans le développement et l'histogenèse du cerveau ainsi que dans la mise en place de la BHE (Sweeney *et al.* 2016), *ii)* dans la formation et la maturation des synapses ainsi que la plasticité et la transmission synaptique (Parpura *et*

al. 2017, Parpura and Verkhratsky 2012b, c, a, Verkhratsky *et al.* 2017b , Pekny and Pekna 2016, Pekny *et al.* 2016), *iii*) dans la régulation du du débit sanguin cérébral, du métabolisme énergétique et hydrique (Rich and Brown 2016), ainsi que de l'homéostasie hydrique, ionique et en neurotransmetteurs du milieu cérébral (Dallerac and Rouach 2016), et *iv*) assurent la protection des neurones *via* la production de molécules antioxydantes et de facteurs neurotrophiques et neuroprotecteurs (Cabezas *et al.* 2016).

Tableau 1 : Principales activités biologiques des cellules astrogliales dans le cerveau**FONCTIONS****Fonctions homéostatiques**

- Maintien de l'homéostasie ionique (K^+ , Cl^- , HCO_3^-)
- Régulation du pH extracellulaire
- Régulation du volume extracellulaire

(Florence *et al.* 2012, Gee and Keller 2005, MacAulay *et al.* 2004, Rose and Chatton 2016, Rose and Verkhatsky 2016, Verkhatsky *et al.* 2015)

Fonctions énergétiques et métaboliques

- Absorption du glucose à partir de la circulation
- Fourniture des intermédiaires du cycle tricarboxylique aux neurones (lactate)
- Synthèse et stockage du glycogène
- Régulation du DSC
- Biosynthèse du cholestérol cérébral

(Falkowska *et al.* 2015, Hertz *et al.* 2015, Bastide *et al.* 2007, Biagini *et al.* 2012, Guizzetti and Costa 2007, Hayashi 2011)

Régulation de la transmission et plasticité synaptique

- Homéostasie en neurotransmetteurs (glutamate, GABA, glycine et monoamines) par système de capture et dégradation enzymatique

(Perea *et al.* 2014, Rose and Chatton 2016, Zorec *et al.* 2016)

- Apport de glutamine (précurseur de glutamate et GABA)

(Dvorzhak *et al.* 2017, Kirischuk *et al.* 2016, Mameczur *et al.* 2015)

- Production de gliotransmetteurs (D-sérine, ATP, glutamate, adénosine)

(Gundersen *et al.* 2015, Halassa *et al.* 2007, Halassa and Haydon 2010)

- Régulation des processus de LTP (Stoltenburg-Didinger *et al.* 1996)

Fonction protectrice

- Production d'agents antioxydants (GSH et ses précurseurs, cystéine, ascorbate)

(Gegg *et al.* 2002, Mythri *et al.* 2011, Sandhu *et al.* 2009, Vargas *et al.* 2006)

- Production d'agents neurotrophiques et neuroprotecteurs (NGF, BDNF, FGF-2, PDGF, GDNF, MANF)

(Cabezas *et al.* 2016, Lu *et al.* 1991, Mishra *et al.* 2007, Shinoda *et al.* 1990)

- Production de facteurs anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β)

(Muranyi and Lacza 2007, Salmina 2009, Verkhatsky *et al.* 2017a)

- Clairance d'ammonium et d'agents neurotoxiques ($A\beta$ et α -synucléine agrégés). (Chen and Swanson 2003)

$A\beta$, peptide β -peptide; BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*; DSC, débit sanguin cérébral; FGF, *fibroblast growth factor*; GDNF, *glial cell-derived neurotrophic factor*; GSH, glutathion réduit; IL, interleukine; MANF, *mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor*; NGF, *nerve growth factor*; PDGF, *platelet-derived growth factor*; TGF β , *glial cell-derived neurotrophic factor*.

Par ailleurs, les astrocytes réagissent à de multiples formes d'agressions et lésions cérébrales aiguës, telles que les accidents vasculaires ou les traumatismes, ou évolutives *i.e.* les tumeurs cérébrales et les maladies neurodégénératives (Lee *et al.* 2010c, Pekny and Pekna 2016, Pekny *et al.* 2014, Sidoryk-Wegrzynowicz *et al.* 2011) par un processus communément appelé astrogliose réactionnelle (Parpura and Verkhratsky 2012b, Pekny and Pekna 2016, Pekny *et al.* 2014). L'astrocyte « réactif » est caractérisé par des changements morphologiques, transcriptionnels, moléculaires et fonctionnels, se traduisant par une hypertrophie du corps cellulaire et des prolongements, une surexpression des protéines du cytosquelette comme la protéine gliale fibrillaire acide (GFAP, *glial fibrillary acidic protein*) et la vimentine (Ding *et al.* 2014). Les astrocytes activés produisent aussi toute une série de facteurs normalement absents ou faiblement exprimés par les cellules astrogliales quiescentes comme des molécules d'adhésion, des facteurs de croissance, des cytokines ou encore des récepteurs de neuropeptides, qui confèrent aux astrocytes réactifs de nouvelles potentialités biologiques déterminantes pour leur action au niveau du foyer lésionnel (Middeldorp and Hol 2011).

2. Rôle des astrocytes dans les processus neurodégénératifs de la maladie de Parkinson

Dans le cerveau des malades atteints de la MP une augmentation significative de l'expression de la GFAP, témoignant d'une activation des astrocytes, a été observée au niveau de la SN (McGeer and McGeer 2008). Le degré de réactivité des astrocytes varie en fonction de la gravité de la pathologie (Colangelo *et al.* 2014), et de l'environnement moléculaire au sein du foyer lésionnel. Ainsi, selon l'ampleur de la lésion les astrocytes « réactifs » peuvent exercer une protection vis-à-vis des dommages en produisant des molécules neurotrophiques, anti-inflammatoires et/ou antioxydantes (Pekny *et al.* 2016, Pekny and Pekna 2016, Sandhu *et al.* 2009), ou à l'inverse exacerber les dommages *via* l'induction d'une réponse pro-inflammatoire, d'une excitotoxicité et d'une libération d'agents toxiques, pour au final précipiter la mort des neurones dopaminergiques de la

SNpc (Finsterwald *et al.* 2015, Miyazaki and Asanuma 2017, Sidoryk-Wegrzynowicz *et al.* 2011).

2.1. Effets bénéfiques des astrocytes réactifs

Les astrocytes produisent une variété de molécules trophiques et antioxydantes ainsi que des substrats métaboliques tels que le GSH et la cystéine qui peuvent soutenir et entretenir les fonctionnalités du neurone (Astro-Finsterwald *et al.* 2015, F *et al.* 2010, Sidoryk-Wegrzynowicz *et al.* 2011). De nombreuses neurotrophines sont secrétées par les astrocytes réactifs telles que le *nerve growth factor* (NGF), le *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF), le *brain derived growth factor* (BDNF), le *fibroblast growth factor* (FGF2), le *basic fibroblast growth factor* (bFGF), la neurotrophine 3 ou encore le facteur *astrocyte-derived neurotrophic factor* (MANF), qui sont impliquées dans les effets neurprotecteurs des astrocytes. L'analyse *post-mortem* de cerveaux de parkinsoniens a révélé chez eux un taux particulièrement faible en facteurs trophiques, *i.e.* NGF, GDNF et BDNF dans la SN et le striatum (Chauhan *et al.* 2001, Mogi and Nagatsu 1999, Mogi *et al.* 1999, Nagatsu *et al.* 2000a), indiquant que la privation du support neurotrophique et neuroprotecteur pourrait exacerber la mort des neurones DA de la SNpc. Inversement, l'approvisionnement en ces facteurs exerce une protection contre la neurodégénérescence des neurones dopaminergiques nigrostriataux dans des modèles animaux ou cellulaires de la MP. Ainsi, des études *in vivo* effectuées sur le modèle murin de la MP induit par l'intoxication à la 6-OHDA ont montré que l'injection intra-striatale de MANF ou de GDNF exerce des effets neuroprotecteurs et assure une répartition tissulaire (Airavaara *et al.* 2012, Lindholm *et al.* 2007, Voutilainen *et al.* 2009). La sur-expression du récepteur *protease-activated receptor-1* (PAR1) dans les astrocytes réactifs de la SN de parkinsoniens induit l'augmentation de l'expression et de la production à la fois du GDNF et de l'enzyme antioxydante GPx, fournissant une neuroprotection contre la dégénérescence cellulaire et la mort des neurones dopaminergiques de la SNpc (Ishida *et al.* 2006). Des études *in vivo* ont montré

que la surexpression dans les astrocytes de la SN du facteur de transcription *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* (Nrf-2) protège les neurones dopaminergiques de la mort induite par le MPTP (Chen *et al.* 2009), prévient l'agrégation de l' α -synucléine et les déficits moteurs associés à la MP (Gan *et al.* 2012). Cette résistance des neurones dopaminergiques de la SNpc vis-à-vis du MPTP serait liée à l'activation dans les astrocytes de gènes impliqués dans les mécanismes de détoxification antioxydante et de mort cellulaire par la liaison du Nrf-2 sur sa séquence cible *antioxidant response element* (ARE) (Cavin *et al.* 2008, van Muiswinkel and Kuiperij 2005).

Les astrocytes réactifs peuvent également exercer des effets neuroprotecteurs dans la MP en participant à la clearance de composés neurotoxiques comme l' α -synucléine agrégée (Lee *et al.* 2010a). Des études *in vivo* menées sur des souris transgéniques surexprimant l' α -synucléine sous le contrôle du promoteur neuronal PDGF- β ont montré la présence d' α -synucléine neuronale dans les astrocytes, indiquant que cette protéine peut être transférée des neurones aux astrocytes (Lee *et al.* 2010b). Une fois à l'intérieur des astrocytes, l' α -synucléine est dégradée par la voie lysosomale. Ainsi, les astrocytes peuvent conférer une neuroprotection aux neurones dopaminergiques de la SNpc en éliminant l'excès d' α -synucléine extracellulaire agrégée neurotoxique (Lee *et al.* 2010a, Lee *et al.* 2010b). Les stratégies visant à améliorer l'élimination et la dégradation de l' α -synucléine par les astrocytes, pourrait donc constituer une cible thérapeutique prometteuse (Figure 11).

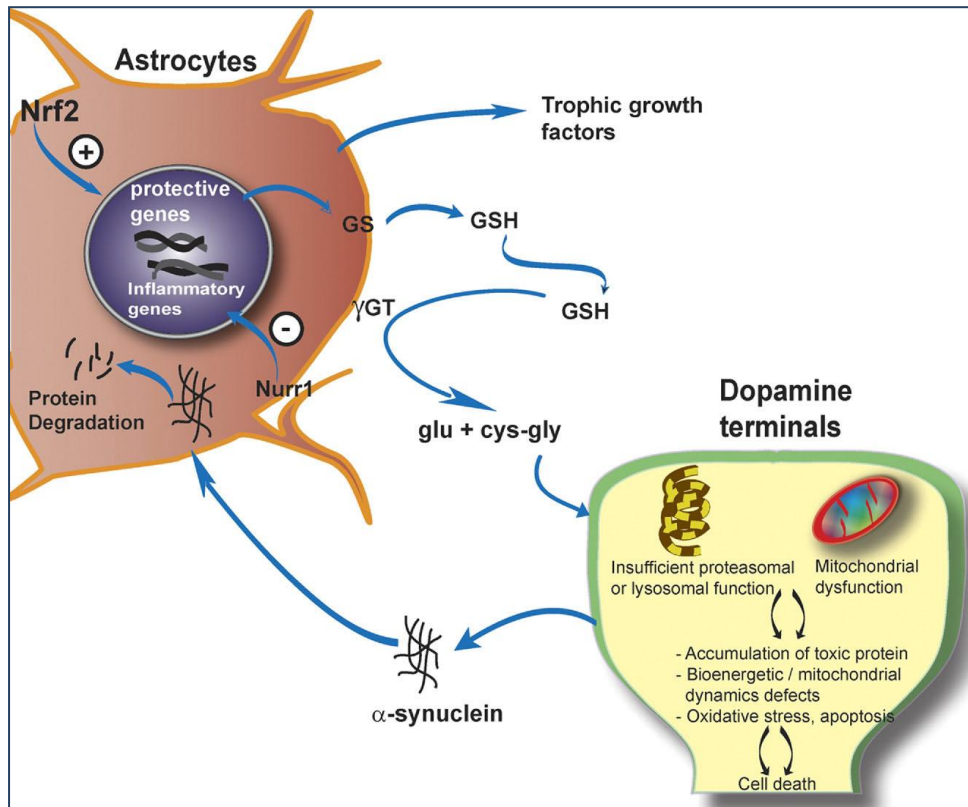


Figure 12 : Rôle neuroprotecteur de l'astrocyte réactif contre la dégénérescence des neurones dopaminergiques. Les astrocytes exercent des effets neuroprotecteurs *via* plusieurs mécanismes à savoir 1) la production de facteurs neurotrophiques tels que le bFGF, le GDNF et le MANF, 2) la libération du glutathion (GSH), qui est ensuite clivé par la γ -glutamyltranspeptidase située dans la membrane plasmique astrocytaire pour générer du glutamate et de la cysteinylglycine, précurseurs pour la biosynthèse de GSH dans le neurone, 3) la surexpression de gènes codant pour des enzymes de détoxification anti-oxydante par l'activation du facteur de transcription Nrf2, 4) la suppression de l'expression de cytokines inflammatoires par l'activation du facteur de transcription Nurr1 et 5) l'élimination et la dégradation des molécules cytotoxiques, telles que la α -synucléine agrégée. D'après (Rappold and Tieu 2010).

2.2. Rôle dégénératif des astrocytes dans la MP

Des travaux récents suggèrent que la production de facteurs inflammatoires par les cellules gliales activées (astrocytes et microglie) serait impliquée dans la perte des neurones dopaminergiques dans la MP (Hirsch and Hunot 2009, Iannaccone *et al.* 2013, Lee *et al.* 2010a, Niranjan 2014, Vivekanantham *et al.* 2015). En effet, la surexpression anormale, au cours de la MP, d' α -synucléine dans les cellules gliales altère les

fonctionnalités neurotrophiques de ces cellules, exaspère la réponse inflammatoire gliale (sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires), produit un stress oxydant et précipite la mort des neurones dopaminergiques (Aoki *et al.* 2009, Hirsch and Hunot 2009, Li *et al.* 2011, McGeer and McGeer 2004). Il est intéressant de noter qu'un traitement ciblant la réduction de la réactivité astrogliale à l'aide d'agents antioxydants atténue le processus inflammatoire et prévient la neurodégénérescence dans la substance noire chez les souris intoxiquées au MPTP (Brynskikh *et al.* 2010). Ces données indiquent que l'activation des cellules gliales contribuerait à la neurodégénérescence *via* la production de cytokines pro-inflammatoires et de radicaux libres conduisant à une rupture de l'équilibre RedOx (Airavaara *et al.* 2012, Rappold and Tieu 2010, Sarkar *et al.* 2016).

L'ensemble de ces données indique que les cellules astrogliales, en contrôlant le processus neuro-inflammatoire et le niveau de production de facteurs neurotrophiques, d'agents neuroprotecteurs et de molécules antioxydantes, paramètres qui pourraient avoir une influence décisive sur la rapidité de la neurodégénérescence observée dans la MP, jouent un rôle important dans la progression de la MP (F *et al.* 2010, Fenoy *et al.* 2014, Rappold and Tieu 2010). Récemment, des travaux conjoints entre les unités INSERM 1239, dirigé par le Dr David Vaudry, et UR11ES09, dirigé par le Pr Mohamed Amri, ont montré que l'octadecaneuropeptide ODN, qui appartient à une famille de peptides exclusivement produits par les cellules astrogliales (Tonon M. C. *et al.* 2006), présente une activité anti-apoptotique à la fois sur les astrocytes corticaux en culture exposés à un stress oxydatif et les neurones traités à la 6-OHDA (Hamdi *et al.* 2012a, Kaddour *et al.* 2013). L'étude du mécanisme d'action a révélé que l'ODN exerce son effet protecteur en bloquant toutes les étapes clés du stress cellulaire oxydant et de l'apoptose. L'ODN agirait en stimulant la biosynthèse de GSH, l'expression et l'activité des enzymes anti-oxydantes (SOD et catalase), et en réduisant la surproduction de ROS induite par le H₂O₂ (Hamdi *et al.* 2012b, Hamdi *et al.* 2011). De plus, l'administration

de milieu conditionné de cellules astrogliales, traitées par un agent inducteur de la sécrétion d'ODN, empêche la mort apoptotique des neurones granulaire du cervelet provoquée par le H₂O₂ (Masmoudi-Kouki *et al.* 2011). L'ensemble de ces données indique que le gliopeptide ODN, auquel nous nous sommes plus particulièrement intéressés, pourrait contribuer à limiter la vulnérabilité neuronale et la production d'ODN et représenterait un mécanisme endogène puissant de protection lors d'un stress oxydatif.

III. L'endozépine, ODN

Les endozépines (EZs) désignent une famille de peptides capables de se lier aux récepteurs des benzodiazépines (BZs), qui fut de ce fait initialement considérée comme les ligands endogènes de ces récepteurs. Toutes les endozépines dérivent d'un même précurseur, un polypeptide de 11 KDa qui a été baptisé *diazepam-binding inhibitor* (DBI), pour sa capacité à déplacer de façon compétitive le diazepam tritié sur des préparations de synaptosomes (Costa *et al.* 1983). Le DBI est également connu, sous le nom d'*acyl-CoA binding protein* (ACBP) pour sa capacité à lier les esters d'acyl-coenzyme A et à stimuler la synthèse d'acides gras (Mogensen *et al.* 1987). La structure primaire du DBI, caractérisée dans de nombreuses espèces allant des bactéries aux mammifères, a été hautement conservée au cours de l'évolution (Tonon M. C. *et al.* 2006, Tonon *et al.* 2013b), suggérant que les peptides de la famille des EZs exercent des activités biologiques importantes. La séquence du DBI contient plusieurs résidus de lysine, et trois d'entre eux délimitent les séquences correspondant à des fragments biologiquement actifs, à savoir le triakontatétraneuropeptide (TTN, DBI17-50) et l'octadécaneuropeptide (ODN, DBI33-50). Bien que les enzymes responsables du clivage du DBI ne soient pas complètement caractérisées, le TTN et l'ODN ont été identifiés dans des extraits de divers tissus et organes notamment le cerveau de souris,

du singe et de l'homme (Farzampour *et al.* 2015, Ferrero *et al.* 1984, Ferrero *et al.* 1986, Slobodyansky *et al.* 1989).

1. Organisation et régulation de l'expression du gène du DBI

Le clonage et la caractérisation des ADN complémentaires (ADNc) codant le DBI ont été réalisés pour la première fois à partir d'une banque d'ADNc de cerveau de rat (Gray *et al.* 1986, Mocchetti *et al.* 1986). Les ADNc codant le DBI ont depuis été caractérisés dans le cerveau, les glandes surrénales, le foie et le testicule humain (Gersuk *et al.* 1995, Gray *et al.* 1986, Webb *et al.* 1987), dans le cerveau et le foie bovin (Todaro *et al.* 1991, Webb *et al.* 1987), et dans le cerveau, le foie et les reins murins (Mocchetti and Santi 1991, Owens *et al.* 1989). L'ADNc codant le DBI a aussi été cloné chez des vertébrés inframammaliens, tels que le canard (Rose *et al.* 1994), la grenouille (Lihmann *et al.* 1994) et la carpe (Chang and Tsai 1996), mais également des invertébrés comme la drosophile *Drosophila melanogaster* (Kolmer *et al.* 1994), le papillon *Bombyx mori* (Matsumoto *et al.* 2001) et le ver du tabac *Manaduca sexta* (Snyder and Feyereisen 1993) et la chenille *Helicoverpa armigera* (Liu *et al.* 2005), et même des végétaux (Chye 1998, Chye *et al.* 1999, Guerrero *et al.* 2006). Ces études confirment la haute conservation du gène du DBI au cours de l'évolution.

L'analyse par Southern-blot de l'ADN génomique de l'homme (Gray *et al.* 1986), du rat (Mocchetti *et al.* 1986) et de la souris (Owens *et al.* 1989) a révélé l'existence de plusieurs gènes codant le DBI dont un seul est fonctionnel. Chez l'homme, le gène actif est localisé sur la région q12-21 du bras long du chromosome 2 (DeBernardi *et al.* 1988) et les pseudogènes sont situés sur les chromosomes 5, 6, 11 et 14 (Gersuk *et al.* 1995, Todd and Naylor 1992). Les gènes humain et murin sont organisés en quatre exons (E1-E4), codant respectivement les régions 1-2, 3-41, 42-62 et 63-86 du DBI (Mandrup *et al.* 1992, Kolmer *et al.* 1993, Swinnen *et al.* 1996), alors que chez la drosophile il ne comporte que trois exons (Kolmer *et al.* 1994). Plus récemment, chez l'homme et le rat,

un nouvel exon, nommé E1c, a été identifié dans le gène du DBI, qui code avec les 3 autres exons un transcrite de forme plus longue au niveau des adipocytes. L'analyse de l'ADN génomique a révélé que l'exon E1c se situe dans l'intron entre les exons E1 et E2, et que son expression serait sous le contrôle d'un deuxième promoteur (P2) (Nitz *et al.* 2005). Ces données renforcent les travaux de l'équipe de Mandrup (Helledie *et al.* 2002) qui montrent que le gène du DBI, cloné à partir d'adipocytes humain et murin, renferme au niveau de son intron 1 une séquence consensus fonctionnelle, le *peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-response element (PPRE)*, capable de lier les facteurs de transcription PPAR γ et *retinoid X receptor α* . L'ensemble de ces données indique que l'expression du gène du DBI est sous le contrôle de deux régions promotrices P1 et P2 situées en amont et en aval de l'exon E1 initialement décrites chez l'homme et le rat (Figure 12).

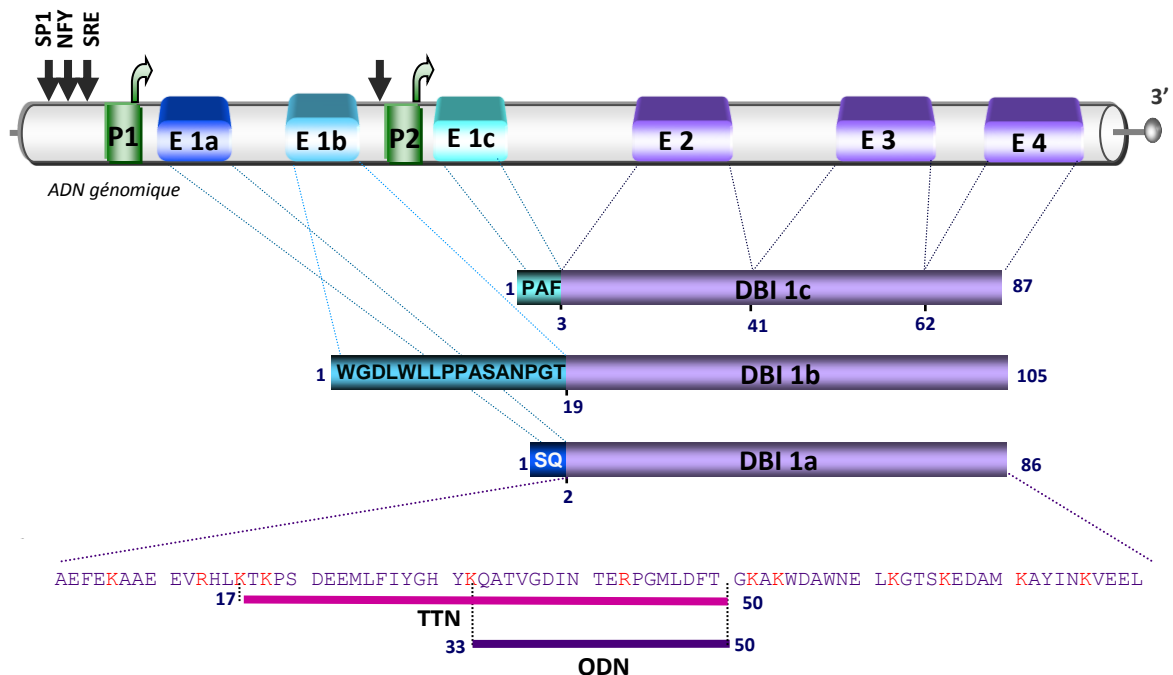


Figure 13 : Représentation schématique de l'organisation du gène du DBI chez l'homme. Les exons sont numérotés de 1 à 4. L'épissage alternatif de l'exon 1, qui est composé de 3 sous-exons E1a, E1b E1c, génère le DBI 1a, le DBI 1b, et le DBI 1c de 86, 105 et 87 acides aminés, respectivement. Les lettres représentées dans les rectangles des 3 séquences du DBI correspondent à la séquence en acide aminés des régions traduites par E1a, E1b et E1c. La région promotrice P1 contrôle l'expression

du DBI 1a et 1b. Le promoteur P2 contrôle l'expression du DBI 1c. Les sites de fixation des facteurs transcriptionnels sont indiqués par des flèches noires. Les flèches vertes correspondent aux sites d'initiation de la transcription à partir des promoteurs P1 et P2. La séquence en acides aminés des régions traduites des exons E2, E3 et E4 est indiquée. Les acides aminés communs aux 3 isoformes du DBI sont représentés en violet et les résidus basiques en rouge. Les acides aminés soulignés correspondent aux séquences du TTN (DBI₁₇₋₅₀ ; —) et de l'ODN (DBI₃₃₋₅₀ ; —)

L'absence de boîtes TATA et CCAAT, la présence de plusieurs éléments initiateurs de la transcription et la forte teneur en acides nucléotides C et G dans la séquence promotrice du gène du DBI, constituent autant de caractéristiques d'un gène domestique. Néanmoins ce n'est pas le cas puisque le niveau d'expression du DBI est variable dans différents types cellulaires (Alho *et al.* 1989, Mocchetti *et al.* 1986). Les régions P1 et P2 du gène du DBI présentent plusieurs séquences consensus dont une séquence *glucocorticoid-response element* (GRE), un *CAAT-binding transcription factor/nuclear factor 1* (CTF/NF1), un *hepatocyte nuclear factors* (HNF), un *sterol regulatory element-like sequence* (SRE) et une PPAR. Il a d'ailleurs été rapporté que le glucose et des hormones comme l'insuline ou les androgènes régulent l'expression du gène du DBI (Hansen *et al.* 1991, Rosen *et al.* 2005, Sandberg *et al.* 2005, Swinnen *et al.* 1996). Plusieurs équipes ont aussi montré que certaines conditions expérimentales modifient les niveaux d'expression cérébrale du gène d'EZ. Ainsi une diminution des taux d'ARNm a été observée chez des rats affamés (Bhuiyan *et al.* 1995) et castrés (Ettinger *et al.* 2004), tandis qu'une stimulation vestibulaire à haute fréquence augmente l'expression d'EZ, chez le lapin (Barmack *et al.* 2004). Il a également été montré qu'une dépendance aux drogues *i.e.* l'alcool, la morphine ou la nicotine conduit à une augmentation de l'expression du gène du DBI dans le cerveau des rongeurs (Katsura and Ohkuma 2005, Katsura *et al.* 2004, Ohkuma *et al.* 2001). De plus, chez ces mêmes animaux, l'interruption brutale de la consommation de ces substances, induit une augmentation excessive des taux d'ARNm du DBI (Katsura *et al.* 2004). Des études *in*

in vitro sur des astrocytes en culture indiquent que l'expression du gène DBI est stimulée par différents agents inducteurs de stress cellulaire comme le peptide β -amyloïde (Tokay *et al.* 2005) et le H_2O_2 (Ghouili *et al.* 2017). Toutes ces observations indiquent que le gène du DBI ne peut pas être considéré comme un «*housekeeping gene*».

2. Sources d'endorzépines dans le SNC

Les EZs sont exprimées dans divers tissus et organes, mais le SNC constitue la principale source de peptides de la famille de l'ODN chez les mammifères. Les études par hybridation *in situ* et immunohistochimie indiquent que les EZs sont largement distribuées dans le cerveau (Tonon M. C. *et al.* 2006, Yanase *et al.* 2002), avec des niveaux particulièrement élevés dans certaines régions telles que bulbe olfactif, l'hypothalamus, l'hippocampe, le cervelet, le striatum, le cortex cérébral et les organes circumventriculaires (Alho *et al.* 1989, Miachon *et al.* 1991, Tonon *et al.* 1990) (Tableau 2).

Tableau 2 : Teneur en ODN dans des structures cérébrales. D'après (Tonon *et al.* 1990)

Structure cérébrale	Taux ODN (ng/région)
Bulbe olfactif	57.2
Cortex cérébral	427.8
Hippocampe	55.7
Striatum	28.5
cervelet	258.6
Hypothalamus	73.6

Quelques études immunohistochimiques réalisées à l'aide d'anticorps dirigés contre le DBI ont montré une localisation des EZs dans les neurones (Alho *et al.* 1985,

Christian *et al.* 2013), toutefois, la majorité des données de la littérature indique que les EZs sont principalement exprimées dans les cellules astrogliales (Christian and Huguenard 2013, Lanfray *et al.* 2013, Yanase *et al.* 2002). A titre d'exemple, une immunoréactivité de type ODN et/ou DBI a été détectée dans les astrocytes du cortex cérébral, de l'hippocampe, de l'amygdale, du bulbe olfactif. On retrouve aussi du marquage au niveau des épendymocytes bordant les ventricules cérébraux, des tanocytes de l'hypothalamus (Alho *et al.* 1988, Lanfray *et al.* 2013, Tong *et al.* 1991, Tonon *et al.* 1990), des cellules de Bergmann du cervelet et des Gomori-positives astrocytes du noyau arqué (Young 1994). De même au niveau du système nerveux périphérique, l'immunomarquage de type ODN et/ou DBI est lié aux cellules de Schwann (Lacor *et al.* 1999). Enfin dans la rétine, les EZs sont exclusivement exprimées par des cellules gliales spécialisées, les cellules de Müller.

L'analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) combinée au dosage radio-immunologique (RIA) a révélé qu'au niveau de l'hypothalamus, l'immunoréactivité correspond essentiellement au DBI (Malagon *et al.* 1992), alors que dans le cortex cérébral, l'hippocampe et le striatum, des quantités significatives d'ODN et de TTN sont retrouvées (Rouet-Smih *et coll.*, 1992; (Malagon *et al.* 1993, Rouet-Smih *et al.* 1992), indiquant que la maturation du DBI diffère d'une région cérébrale à l'autre.

3. Structure, maturation et régulation de la libération des endozépinés

3.1. Structure et maturation

A ce jour 10 variants de transcription du gène du DBI ont été identifiés chez différentes espèces de mammifères avec des niveaux d'expression variables et tissus dépendants (Ludewig *et al.* 2011a, Ludewig *et al.* 2011b). Les différents isoformes correspondent à des protéines de nature hydrophile, de taille variant entre 85 et 135

acides aminés. Chez l'homme, il existe 3 formes de 86, 88 et 104 acides aminés (Nitz *et al.* 2005). La protéine de 88 acides aminés diffère de la forme plus courte par ses 4 acides aminés N-terminaux et résulte de la transcription du gène à partir d'un promoteur alternatif (Nitz *et al.* 2005), tandis que la forme longue, qui présente une extension de 18 résidus en position N-terminale, résulte d'un épissage alternatif du transcrit primaire (Kolmer *et al.* 1995). La forme longue du DBI composée de 135 acides aminés est retrouvée chez l'homme et la souris. Chez la souris, elle résulte de l'épissage alternatif de l'exon 1, qui diffère de la forme courte par son extrémité N-terminale (Ludewig *et al.* 2011b, Nitz *et al.* 2005, Nitz *et al.* 2011). Les ARNm codant les différentes isoformes du DBI sont majoritairement exprimés dans les tissus où l'on retrouve un métabolisme lipidique important, comme le cerveau, le foie et le tissu adipeux (Ludewig *et al.* 2011a, Nitz *et al.* 2011, Vock *et al.* 2010).

La structure primaire du DBI comporte de nombreux résidus lysine, dont des sites de clivage protéolytique en positions 17, 33 et 50, qui encadrent les séquences du TTN et de l'ODN. D'autres fragments peuvent également être générés dans le cerveau des mammifères sans pour autant être délimités par des résidus lysines tels que le triakontaseptaneuropeptide (DBI₃₉₋₇₅), l'eicosapentaneuropeptide (DBI₂₆₋₅₀) et l'eicosaneuropeptide (DBI₅₁₋₇₀) (Guarneri *et al.* 1990, Slobodyansky *et al.* 1994). Les enzymes responsables du processus de maturation post-traductionnelle du DBI ne sont pas encore identifiées. Les seules informations disponibles concernent le clivage endoprotéolytique de l'ODN, par l'enzyme endopeptidase à proline, au niveau des séquences Ala²-Thr³ and Val⁴-Gly⁵ générant respectivement deux produits biologiquement inactifs, l'ODN₃₋₁₈ et l'ODN₅₋₁₈ (Leprince *et al.* 2006). Enfin, des données plus récentes indiquent que le DBI pourrait être clivé dans le milieu extracellulaire par une protéase de type trypsine, générant du TTN et de l'ODN (Loomis *et al.* 2010). L'analyse conformationnelle du DBI, obtenue par modélisation moléculaire sous contraintes issues d'expériences de résonance magnétique nucléaire, montre

l'existence de quatre hélices α , H1 (entre les résidus Glu⁴-Leu¹⁵), H2 (entre les résidus Asp²²-Val³⁵), H3 (entre les résidus Gly⁵²-Lys⁶⁰) et H4 (entre les résidus Ser⁶⁸-Tyr⁸⁵). Le TTN conserve l'hélice H2 du DBI (Berkovich et coll., 1990) alors que l'ODN, correspond à une région non structurée du précurseur située entre les hélices H2 et H3 (Cinone *et al.* 2000) (Figure 13).

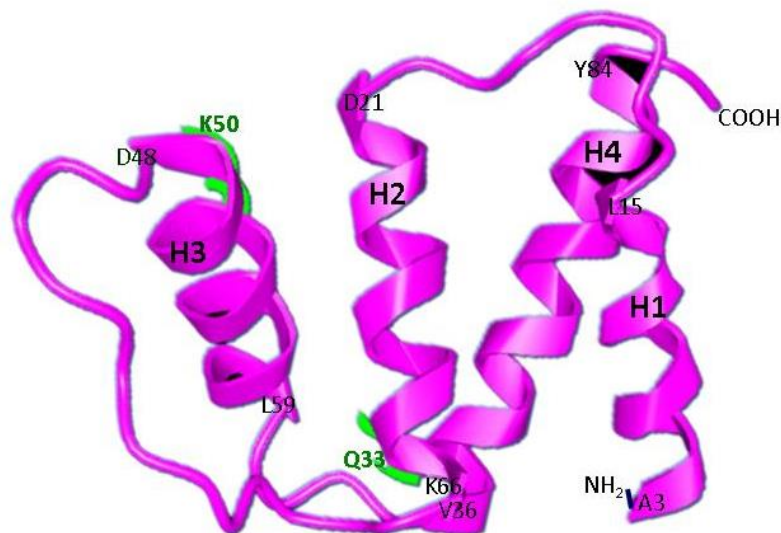


Figure 14 : Modélisation structurale tridimensionnelle du DBI humain. Les lettres H1- H4 désignent les 4 hélices α comprises entre la région N-terminale (NH₂) et la partie C-terminale (COOH) de la protéine. Les lettres en vert délimitent la séquence de l'ODN située dans une région non structurée s'intercalant entre la seconde et la troisième hélice. Les acides aminés correspondants aux extrémités de chaque hélice sont désignés par les lettres en noir. Les numéros correspondent à la position des acides aminés dans la séquence du DBI. D'après <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

3.2. Contrôle de la libération de l'ODN

L'absence de séquence signal nécessaire à l'adressage des protéines vers le réticulum endoplasmique, ne permet pas l'empaquetage du DBI et de ses dérivés dans des vésicules de sécrétion. En accord avec cette constatation, des études de microscopie électronique confirment un immunomarquage diffus pour les peptides apparentés à l'ODN dans l'ensemble du cytoplasme des cellules gliales du cervelet (cellules de Bergman). Néanmoins, l'analyse protéomique par spectrométrie de masse du sécrétome

des cellules astrogliales de rat a révélé la présence de DBI dans le surnageant de culture (Lafon-Cazal *et al.* 2003), mais cette sécrétion est insensible à la bréfeldine A, un inhibiteur de transport vésiculaire golgien (Lafon-Cazal *et al.* 2003). Parallèlement, l'induction de l'autophagie provoque une libération non conventionnelle de DBI par les astrocytes de rat en culture (Loomis *et al.* 2010). Ces données indiquent que le DBI et ses dérivés peuvent être libérés par un mécanisme indépendant de la voie vésiculaire d'exocytose classique.

Bien que le mode de sécrétion du DBI et de ses dérivés ne soit pas encore clairement élucidé, la sécrétion d'EZ est régulée par de nombreux facteurs et elle est modulée dans différentes situations physiopathologiques. Le dosage RIA à l'aide d'anticorps dirigés contre l'ODN révèle que les taux des peptides apparentés à l'ODN (ODN-LI) dans le plasma sont élevés chez les individus souffrant de choc septique (Clavier *et al.* 2014). Des études *in vitro* montrent que la libération d'ODN-LI est régulée positivement par des neuropeptides tels que le *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP) ((Masmoudi *et al.* 2003, Masmoudi-Kouki *et al.* 2006)), l'urotensine II (UII) et l'*UII-related peptide* (URP) (Jarry *et al.* 2010), le peptide β -amyloïde (Tokay *et al.* 2008, Tokay *et al.* 2005), des hormones stéroïdiennes (le cortisol, la pregnenolone ou la progestérone) (Loomis *et al.* 2010), des cytokines (le *TNF- α* et l'*IL1- β*) (Clavier *et al.* 2016), ou encore des concentrations élevées en ion K^+ (Farzampour *et al.* 2015), mais négativement par le neuropeptide somatostatine (Masmoudi *et al.* 2005) et le neurotransmetteur GABA (Patte *et al.* 1999). Les études pharmacologiques indiquent que la libération d'EZ par les cellules astrogliales et rétiniennes met en jeu l'activité des transporteurs ABC par un mécanisme dépendant de la phosphorylation des protéines kinases (PK) PKA et PKC (Masmoudi *et al.* 2003, Masmoudi *et al.* 2005, Qian *et al.* 2008, Tokay *et al.* 2005).

4. Activités Biologiques de l'ODN dans le SNC

En tant que ligands naturels des récepteurs des BZs, l'EZ ODN est connue pour interagir avec les récepteurs de ces molécules de type central, CBR (*Central type benzodiazepine receptor*), qui font partie intégrante du complexe récepteur R-GABA_A / canal Cl⁻ (Costa *et al.* 1983, Ferrero *et al.* 1986). Comme le DBI, l'ODN a démontré sa capacité à déplacer le diazépam et à moduler la transmission GABAergique *via* une réaction allostérique (Guidotti *et al.* 1983). Les études électrophysiologiques et de fonctionnalité cellulaire indiquent que l'ODN peut agir comme un agoniste ou un modulateur allostérique positif (MAP), favorisant l'action du GABA, ou comme un agoniste inverse ou modulateur allostérique négatif (MAN), réduisant l'action du GABA, selon la composition en sous-unités du récepteur GABA_A (Bormann 1991, Farzampour *et al.* 2015).

Il a été démontré que l'ODN est également le ligand endogène d'un récepteur métabotropique couplé à une protéine G, qui se distingue des récepteurs classiques des BZs sur le plan fonctionnel et pharmacologique (Guzzi *et al.* 2016, Gandolfo *et al.* 1997). Il a ainsi été montré que l'ODN stimule le métabolisme des polyphosphoinositides (PIPs) dans les cultures d'astrocytes de rat et des neurones en grain du cervelet, *via* une phospholipase C (PLC) couplée à une protéine G sensible à la toxine pertussique (Kaddour *et al.* 2013, Patte *et al.* 1995). Sur des cultures d'astrocytes corticaux de rat, l'ODN augmente la concentration de calcium intracellulaire [Ca²⁺]_i en mobilisant les pools intracellulaires (Gach *et al.* 2015, Gandolfo *et al.* 1999, Lamacz *et al.* 1996, Leprince *et al.* 2001). Sur ce même modèle cellulaire, l'ODN stimule l'activité de l'adénylyl cyclase (AC) et ainsi la formation d'AMPc (Gach *et al.* 2015, Gandolfo *et al.* 1999, Lamacz *et al.* 1996, Leprince *et al.* 2001). Enfin, la capacité de l'ODN à stimuler la phosphorylation des protéines *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) 1 et ERK2 a été retrouvée à la fois dans les astrocytes et les neurones en grain du cervelet

(Hamdi *et al.* 2012a, Kaddour *et al.* 2013). Ces données indiquent que l'ODN est le ligand naturel et spécifique d'un récepteur couplé à une protéine $G_{i/o}$ et G_s .

4.1. Effets de l'ODN relayés par l'activation des CBR

Des études *in vivo* réalisées chez le rongeur montrent que l'administration intracérébroventriculaire (i.c.v) d'ODN (10 à 100 ng) provoque des effets pro-conflictuels, anxiogènes, agressifs et pro-convulsivants (De Mateos-Verchere *et al.* 1998, Ferrero *et al.* 1986, Kavaliers and Hirst 1986) (Budry *et al.* 2016). Les effets de l'ODN sur les comportements sociaux sont liés à l'interaction avec le R-GABA_A en tant que MAN, à la réduction de la conduction de chlore et donc à l'augmentation de l'excitabilité neuronale (Bormann 1991). Par une modulation similaire sur les R-GABA_A, l'administration centrale d'ODN chez la souris engendre une réduction du temps de sommeil induite par une injection de pentobarbital (Dong *et al.* 1999), bloque la prise de boisson et augmente l'aversion des animaux pour les solutions salées (Manabe *et al.* 2001). L'incubation d'explants d'hypothalamus de grenouille en présence de doses croissantes d'ODN (10^{-10} M et 10^{-5} M) induit par une action de type MAN, une stimulation dose-dépendante de la synthèse de neurostéroïdes (17-hydroxyprégnenolone), de progestérone et de dihydrotestostérone (Do-Rego *et al.* 2001).

Il a également été démontré que l'ODN, *via* l'activation des récepteurs CBR / R-GABA_A, stimule l'incorporation de thymidine tritiée dans les astrocytes de rat en culture (Gandolfo *et al.* 1999). En accord avec cet effet prolifératif, l'ODN favorise la prolifération des cellules souches neuronales progénitrices de la zone germinative sous-ventriculaire chez le rat adulte (Alfonso *et al.* 2012). Inversement, l'inhibition de la transcription du gène du DBI par transfection de shARN *in vivo*, conduit à un arrêt de la croissance des neuroblastes associé à une réduction du nombre de neurones néoformés au niveau du bulbe olfactif (Alfonso *et al.* 2012). L'ensemble de ces données indique que l'EZ ODN pourrait exercer un effet neurotrophique et renforce l'idée que

ce gliopeptide est impliqué dans les processus de prolifération, de survie et/ou de différenciation cellulaire.

Enfin, des études récentes indiquent que le DBI et ses dérivés régulent l'activité du noyau réticulé du thalamus et la transmission thalamo-corticale (Christian *et al.* 2013, Christian and Huguenard 2013) (Christian *et al.* 2013) en provoquant un renforcement de la transmission GABAergique *via* une action du type MAP (Christian *et al.* 2013).

4.2. Effets de l'ODN relayés par le récepteur métabotrope

Des études *in vivo* montrent que l'ODN agit sur le comportement alimentaire et reproducteur en modifiant l'activité des noyaux hypothalamiques. Des études pharmacologiques indiquent que ces effets de l'ODN ne sont ni mimés par des agonistes des CBR, ni bloqués par les antagonistes CBR (Tonon *et al.* 2013a). En revanche, le cyclo₁₋₈[DLeu₅] OP, un antagoniste du récepteur de type métabotrope de l'ODN ((Leprince *et al.* 2001), bloque les effets du gliopeptide sur le système hypothalamique (Matsuda *et al.* 2010, Tonon *et al.* 2013b). Injecté par voie i.c.v, l'ODN provoque une réduction de la prise alimentaire chez les rongeurs ainsi que chez le poisson rouge (De Mateos-Verchere *et al.* 1998, Matsuda *et al.* 2010, Matsuda *et al.* 2007). Cet effet anorexigène de l'ODN met en jeu une augmentation des taux des ARNm codant la pro-opiomélanocortine (POMC), précurseur d'un peptide anorexigène l'*α-melanocyte-stimulating hormone* (Compere *et al.* 2003), et une réduction de l'expression d'un neuropeptide orexigène, le neuropeptide Y (NPY) dans le noyau arqué de l'hypothalamus (Compere *et al.* 2005). Injecté par voie i.c.v, l'ODN stimule l'expression du gène codant la *corticotropin-releasing hormone* (CRH) dans les noyaux paraventriculaires (Compere *et al.* 2005) et réduit l'expression du gène codant la gonadolibérine GnRH (Compere *et al.* 2004) dans les noyaux supraoptiques. Le cyclo₁₋₈[D-Leu₅] OP, supprime les effets de l'ODN sur l'expression des gènes codant le NPY, la CRH et la GnRH. De plus, administré seul, le cyclo₁₋₈[DLeu₅] OP augmente le taux

d'ARNm codant le NPY et la GnRH, et inhibe l'expression de ceux codant la CRH, indiquant que l'ODN endogène exerce un tonus inhibiteur ou stimulateur sur les populations neuronales hypothalamiques. Ces données mettent en évidence un effet neuroendocrinien des EZs notamment *via* l'ODN et une modulation directe de l'activité des neurones hypothalamiques.

4.3. Effets protecteurs de l'ODN sur les cellules nerveuses

Quelques études cliniques révèlent que les taux d'EZ sont significativement plus élevés dans le liquide céphalorachidien (LCR) de patients atteints de pathologies cérébrales telles que l'épilepsie, l'encéphalopathie d'origine hépatique (Barbaccia *et al.* 1986, Rothstein *et al.* 1989) ou la maladie d'Alzheimer (Ferrarese *et al.* 1990). Les sujets atteints de la MP présentent eux aussi des concentrations élevées d'EZ dans le LCR (Ferrarese *et al.* 1990, Ferrero *et al.* 1988). De plus, des études *in vitro* réalisées sur des cultures de cellules astrogliales et de neurones en grain du cervelet montrent que l'ODN agit comme un puissant agent neuroprotecteur (Hamdi *et al.* 2012a, Hamdi *et al.* 2011, Kaddour *et al.* 2013), suggérant que la surproduction d'ODN observée dans les maladies cérébrales pourrait être un mécanisme compensatoire pour limiter la progression du processus de neurodégénérescence. Administré à des doses subnanomolaires (sur les astrocytes) et subpicomolaires (sur les neurones), l'ODN prévient la mort cellulaire par apoptose en bloquant *i)* la surproduction de ROS intracellulaire, *ii)* la chute du taux de GSH, *iii)* la surexpression du membre proapoptotique Bax et la répression du membre antiapoptotique Bcl-2, et *iv)* la chute du potentiel mitochondrial ainsi que la stimulation de l'activité de la caspase-3 induits par le stress oxydant (Hamdi *et al.* 2012a, Hamdi *et al.* 2011, Kaddour *et al.* 2013) (Figure 14). De plus, au niveau des cellules astrogliales, l'ODN stimule l'activité des enzymes antioxydantes SOD et catalase et prévient les effets du H₂O₂ sur l'inhibition de l'expression et de l'activité de ces deux enzymes (Hamdi *et al.* 2012b, Hamdi *et al.* 2011) ainsi que sur l'attaque oxydative de biomolécules cellulaires (peroxydation lipidique et oxydation des protéines). Les effets

antioxydant et anti-apoptotique de l'ODN sur les neurones et les astrocytes ne sont pas abolis par le flumazénil, antagoniste des CBR, mais complètement bloqués par l'antagoniste du récepteur métabotrope, le cyclo₁₋₈[DLeu₅] OP. De plus, deux agonistes du récepteur métabotrope de l'ODN, l'octapeptide (OP) et le cyclo OP, testés dans la même gamme de concentrations que l'ODN, reproduisent les actions protectrices de l'ODN sur les neurones et les astrocytes (Hamdi *et al.* 2012a, Kaddour *et al.* 2013).

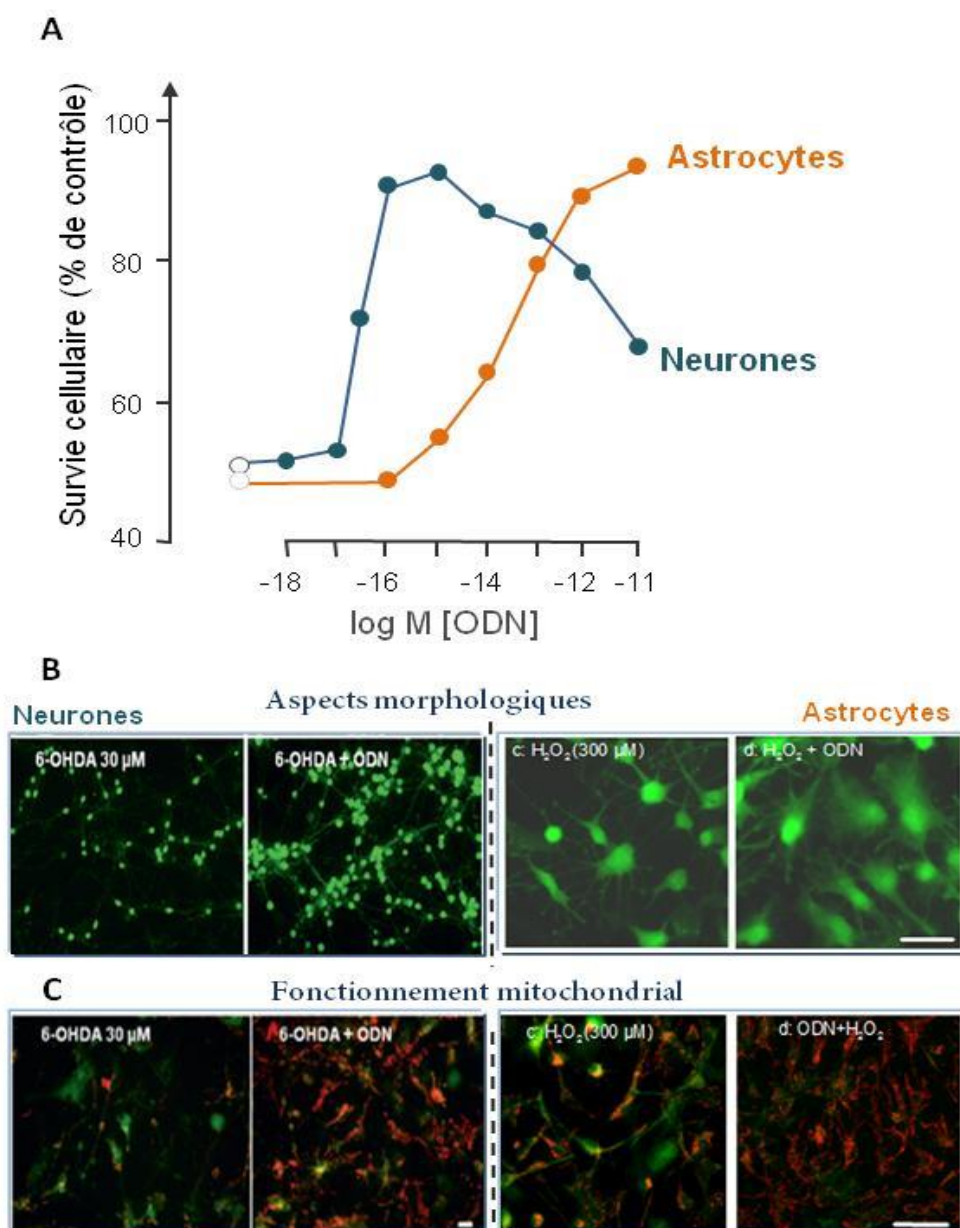


Figure 15 : Effets protecteurs de l'ODN contre la mort cellulaire induite par le stress oxydatif. A. Les neurones (courbe bleue) les astrocytes (courbe orange) sont

cultivés en conditions de stress oxydatif aigu, responsable d'une apoptose d'environ 50% des cellules (cercles ouverts noirs et gris). Dans ces conditions, l'ajout de très faibles concentrations d'ODN (0,1 fM à 10 pM) dans le milieu de culture augmente le nombre de cellules vivantes de manière dose-dépendante. **B.** Les observations au microscope à fluorescence révèlent que l'ODN prévient les transformations morphologiques (atrophie du corps cellulaire et rétraction des prolongements cytoplasmiques) induites par le stress oxydant dans les neurones et les astrocytes. **C.** L'évaluation du fonctionnement mitochondriale à l'aide de la sonde JC-1 révèle que l'ODN empêche le dysfonctionnement des mitochondries (sonde forme monomérique avec émission dans le vert) et maintient des mitochondries actives (sonde forme agrégée avec émission dans le rouge) dans les neurones et les astrocytes. D'après (Hamdi *et al.* 2012a, Kaddour *et al.* 2013).

L'étude des voies de transduction montre que l'effet glioprotecteur de l'ODN contre les dommages oxydatifs induits par le H₂O₂ fait intervenir l'activation de la voie AC/AMPC/PKA. En revanche, l'action protectrice de l'ODN sur les neurones en grain du cervelet, lors d'une mort apoptotique induite par la toxicité oxydative de la 6-OHDA, met en jeu l'activation de la voie PLC/IP3/PKC. En aval de l'activation de la PKA et de la PKC, l'ODN stimule la phosphorylation des protéines ERK1 et ERK2. L'activation de la voie de signalisation des *mitogen-activated protein kinases* MAPK/ERKs serait responsable des effets de l'ODN sur la stimulation du système antioxydant endogène et du blocage de toutes les étapes clé de l'apoptose (Figure 15).

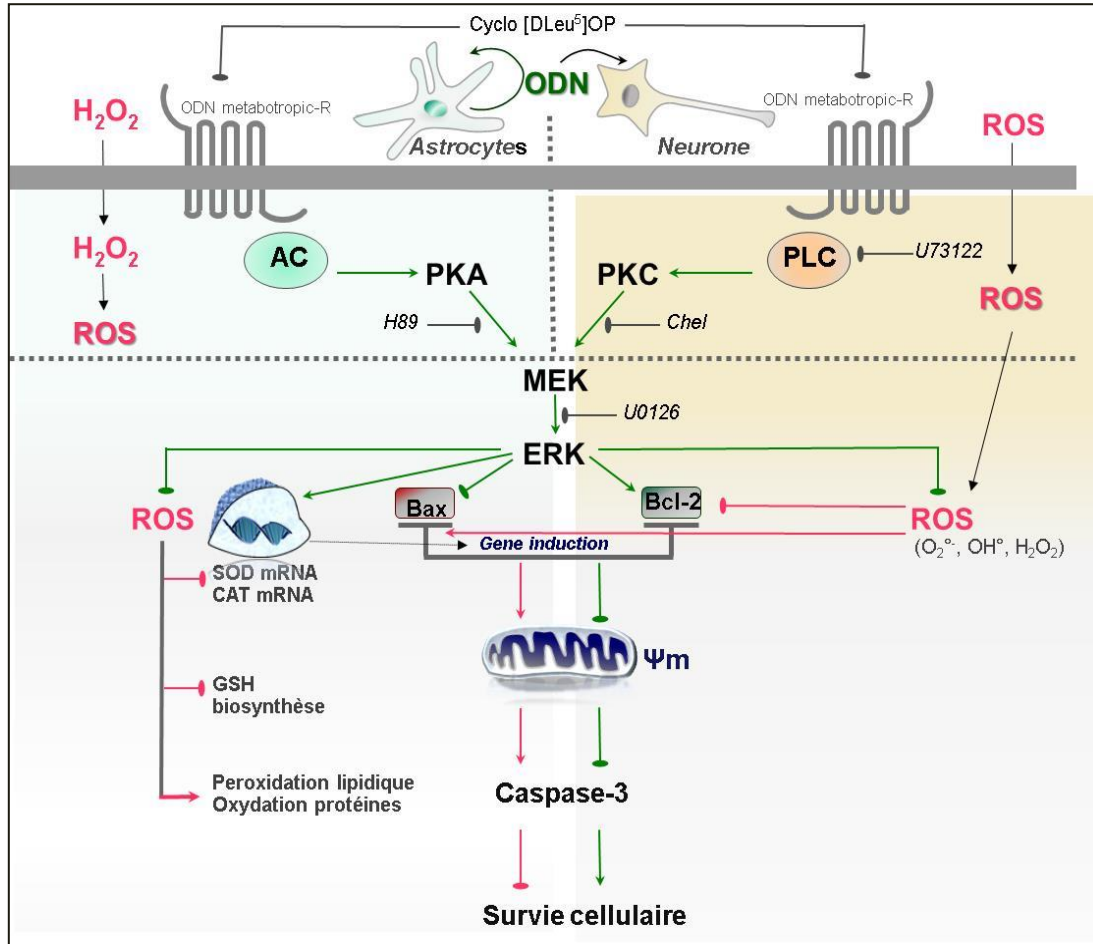


Figure 16 : Représentation schématique récapitulative des mécanismes intracellulaires mis en jeu dans de l'effet protecteur de l'ODN dans les neurones et les astrocytes contre la cytotoxicité oxydative. L'ODN, en interagissant avec son récepteur métabotropique (ODN métabotropique-R), sensible à l'antagoniste cyclo₁₋₈[DLeu₅]OP, active la voie de signalisation AC/PKA et PLC/PKC dans les astrocytes et les neurones, respectivement. La phosphorylation d'ERK contrecarre *i*) l'altération de l'activité du système antioxydant enzymatique, *ii*) la déplétion du taux de glutathion (GSH), *iii*) l'inhibition de l'expression du gène Bcl-2 et la stimulation du gène proapoptotique Bax et *iv*) l'oxydation des lipides et des protéines induite par des espèces réactives d'oxygène (ROS). De plus, l'ODN bloque toutes les étapes clé de l'apoptose *i.e.* la chute du potentiel de la membrane mitochondriale (ψ_m) et la stimulation de l'activité caspase-3 responsables de la mort cellulaire. AC, adénylyl cyclase; Chel; Chelerythrine; H₂O₂, peroxyde d'hydrogène; MEK, protéine activée par mitogène (MAP) kinase kinase ou MAPKK; PLC, phospholipase C, Cat, catalase; GSH, glutathion réduit; H89, inhibiteur de protein kinase A (PKA); PKC, protéine kinase C; SOD, superoxyde dismutase; U7312, inhibiteur de la PLC ; U0126, inhibiteur de la MAP kinase kinase. →, action de l'ODN; →, action des ROS.

Objectifs



Les données de la littérature présentées lors de cette introduction montrent que le stress oxydatif, l'apoptose et la neuro-inflammation sont des paramètres importants dans la physiopathogenèse de la MP et la progression des processus de neurodégénérescence associés à cette pathologie (Dias *et al.* 2013, Hirsch and Hunot 2009). Des études expérimentales ont démontré que les cellules astrogliales permettent de lutter contre les processus neurodégénératifs et exercent des effets protecteurs *via* la production de diverses molécules solubles ou membranaires qui confèrent un environnement propice à la survie neuronale (McGeer and McGeer 2008, Sarkar *et al.* 2016). Parmi les molécules produites par les astrocytes réactifs, on trouve des facteurs antioxydants et/ou neurotrophiques pouvant contribuer à la neuroprotection et au ralentissement de la progression de la neurodégénérescence. Par exemple, les cellules astrogliales synthétisent et libèrent de l'ODN, un peptide qui présente un potentiel protecteur puissant contre les dommages causés par le stress oxydatif, tant sur les neurones que les astrocytes en culture. Ces résultats obtenus *in vitro* ont établi la capacité de l'ODN à prévenir la surproduction des ROS, les dommages oxydatifs des constituants cellulaires, le dysfonctionnement mitochondrial et l'apoptose induits par le stress oxydant (Hamdi *et al.* 2015, Kaddour *et al.* 2013). De plus, inhiber la production ou l'activité de l'ODN entraîne une plus grande vulnérabilité des astrocytes et des neurones face au stress oxydatif (Ghouili *et al.* 2017). Des études menées chez l'homme indiquent que les taux d'EZ (peptides de la famille de l'ODN) mesurés dans le LCR sont plus importants chez les individus atteints de la MP que chez les personnes en bonne santé (Ferrarese *et al.* 1990, Ferrero *et al.* 1988). L'ensemble de ces données renforce l'hypothèse selon laquelle la production d'ODN par les cellules astrogliales représenterait un mécanisme endogène puissant de neuroprotection. Néanmoins, à ce jour, aucune étude *in vivo* n'a été réalisée afin de déterminer si les données obtenues sur les modèles cellulaires *in vitro* peuvent être transposées *in vivo*.

Dans ce contexte, mon projet de thèse a été *i)* d'étudier la capacité de l'ODN, injecté par voie i.c.v à bloquer la neurodégénérescence, *i.e.* la perte des neurones dopaminergiques de la SNpc, la neuro-toxicité oxydative et la neuro-inflammation, observée dans un modèle murin de la MP, à savoir des souris C57Bl6J intoxiquées par du MPTP; et *ii)* de rechercher les conséquences de l'invalidation du gène du précurseur de l'ODN sur les processus neurodégénératifs, en utilisant une lignée de souris transgéniques KO DBI (DBI^{-/-}) traitées au MPTP.

Matériels & Méthodes



I. Modèle animal

Les expérimentations de ce travail de thèse sont réalisées sur deux souches de souris mâles. Des souris mâles de type Black C57BL/6 (laboratoire Janvier, Le Genest-SaintIsle), pesant entre 22 et 25 g, sont utilisées pour la première partie du projet. Des souris C57BL/6J BomTac de type sauvage (ACBP/DBI^{+/+}), DBI hétérozygote (ACBP/DBI^{+/-}) et DBI homozygotes KO (ACBP/DBI^{-/-}) provenant de la reproduction des hétérozygotes de cette souche dans notre animalerie sont utilisées pour la deuxième partie du projet. Les animaux sont placés par groupes de 5 par cage, avec un accès libre à un régime standard (UAR, Villemoisson-sur-Orge) et à l'eau. Ils sont maintenus dans un local ventilé à une température de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ sous un cycle de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité (lumière entre 7 h et 19 h). Les animaux sont traités suivant les consignes directrices de l'Union Européenne et le protocole expérimental a été approuvé par le Comité d'éthique CENOMAX et le Ministère de la Recherche Française.

II. Génotypage des animaux ACBP/DBI

Les souris transgéniques KO (ACBP/DBI^{-/-}) issues des lignées C57Bl/6J Bom ont été fournies par le Dr S. Mandrup (University of Southern Denmark). L'invalidation est la conséquence du remplacement de l'exon 2 et des introns 1 et 2 du gène ACBP/DBI par une cassette de 2 kb résistante à la néomycine grâce au système LoxP sous le contrôle du promoteur phosphoglycerate kinase 1 (Neess *et al.* 2011). Les souris ACBP/DBI^{-/-} sont viables, fertiles et nées dans un Ratio Mendélien normal, démontrant que l'ACBP/DBI n'est pas indispensable aux fonctions physiologiques essentielles (Neess *et al.* 2011).

1. Extraction d'ADN génomique

Un millimètre de queue des souris à génotyper est prélevé puis plongé dans du tampon de lyse (Tris HCL 1 mM, NaCl 5 M, CaCl₂ 20 mM, SDS (dodécylsulfate de sodium), 10% pH 8) additionné à la protéinase K (Invitrogen). L'ensemble est incubé

toute la nuit à 56°C sous agitation 400 rpm. Le lendemain, le lysat est centrifugé 10 min à 15000 x g et le surnageant de chaque échantillon est récupéré. Un volume de 750 µl d'isopropanol (Sigma) est ajouté au surnageant pour précipiter l'ADN. L'ensemble est finement mélangé par des mouvements de rotation afin de conserver les liaisons phosphodiester. L'échantillon est centrifugé 5 min à 15000 x g. L'isopropanol est éliminé et le culot remis en suspension dans 100 µl d'eau.

2. Réaction de polymérisation en Chaîne (PCR)

La PCR est réalisée avec le kit *GoTaq DNA polymerase* (Promega). Dans un tube de PCR, l'ADN issu de la digestion est ajouté à 20 µl de mix contenant la Taq polymérase, les deoxynucleotides et les amorces. La PCR est réalisée sur un thermocycleur AB Veriti (Applied Biosystems).

3. Electrophorèse

Le produit de PCR migre sur un gel d'agarose 2% contenant du Bromure d'éthidium, à 100 Volts pendant 25 min. Puis le résultat du génotypage est visualisé sur un analyseur de gel UV (BioRad).

III. Procédure des injections

1. Injection intra-péritonéale

Afin de minimiser les problèmes secondaires qui peuvent se produire lors de l'injection par voie i.p, l'animal est maintenu de manière à ce que la tête ne puisse bouger pendant la procédure et placé tête vers le bas pour faire descendre les organes par gravité afin de ne pas les toucher. Une fois immobilisé, l'aiguille est insérée dans le cadran inférieur de l'abdomen avec un angle de 45°. Un volume de 100 µl d'une solution saline (0.9% ; pour les groupes contrôle et ODN) ou d'une solution de MPTP (20 mg/Kg; pour les groupes MPTP et OPN+MPTP) est injecté 3 fois dans la même journée à deux heures d'intervalle.

2. Injection intra-cérébroventriculaire

L'injection i.c.v de 10 µl d'une solution saline ou d'une solution d'ODN (10 ng/animal) est effectuée à mains levées, dans le ventricule latéral de la souris selon la procédure de Haley et McCormick (1957). L'injection est faite avec une microseringue Hamilton de 50 µl (Hamilton Bonaduz ; Suisse) reliée à une aiguille de 3,5 mm (diamètre intérieur de 0,5 mm). La vérification de la précision du site d'injection i.c.v est contrôlée à l'aide d'un colorant, le bleu de méthylène, sur des coupes frontales du cerveau, montrant que plus de 95 % des animaux testés présentent des ventricules marqués par le colorant. Il est également vérifié sur plusieurs animaux après sacrifice les coordonnées du site d'injection au niveau de l'os pariétal qui se trouve à au moins 1,5 mm derrière le bregma et à au moins 2,5 mm avant le point lambda, avec une latéralité entre 1 et 2 mm de la ligne médiane du cerveau. Ces coordonnées stéréotaxiques correspondent au ventricule latéral gauche dans l'atlas de Lehmann pour les souris : antériorité entre 2,95 et 4,15 mm ; latéralité entre 0,95 et 2 mm ; et une profondeur comprise entre 3 et 4,5 mm. Cette technique d'injection i.c.v a été approuvée par le comité d'éthique régional pour l'expérimentation animale (Normandie ; n ° : N / 10-04-04-12).

IV. Procédures de traitement

1. Souris de la lignée Sauvage

Quatre Groupes d'animaux ont été constitués, le groupe contrôle (n=12), le groupe MPTP (3 x 20 mg/kg) (n=12), le groupe ODN (10 ng/animal) (n=12) et le groupe MPTP + ODN (n=12). Les animaux ont reçu 3 injections i.p par jour, soit d'une solution saline (groupe contrôle et groupe ODN) ou d'une solution MPTP (groupe MPTP et groupe ODN+MPTP) intercalées de deux heures. Une heure après la dernière administration de MPTP, une injection par voie i.c.v d'une faible dose d'ODN (10 ng/animal) a été effectuée aux souris des groupes ODN et ODN+MPTP. Les souris contrôle et MPTP ont été traitées de manière similaire avec une solution de NaCl 0.9%.

Le poids corporel des animaux a été relevé chaque jour tout au long de la durée de l'étude.

2. Souris transgéniques

Les expériences réalisées chez les souris transgéniques avaient pour but d'étudier les conséquences de l'inactivation de l'expression du gène précurseur d'ODN sur la vulnérabilité des neurones dopaminergiques de la SNpc vis-à-vis de la neurotoxicité du MPTP. De ce fait, trois groupes d'animaux ont été constitués ; groupe ACBP/DBI^{+/+} (n=8), groupe ACBP/DBI^{+/-} (n=12) et groupe ACBP/DBI^{-/-} (n=8). Afin de minimiser la mortalité des animaux transgéniques, la dose de MPTP a été réduite de moitié si bien que les souris ont reçu trois doses de MPTP (10 mg/kg) par voie i.p, intercalée de deux heures. Le poids corporel des animaux a été relevé chaque jour tout au long de la durée du traitement.

V. Procédures expérimentales

1. Prélèvement et préparation des tissus

Dans le cas des analyses transcriptomiques, les animaux, préalablement endormis à l'isoflurane (Piramal Healthcare) sont sacrifiés par décapitation. Le striatum et la substance noire du cerveau d'un hémisphère sont rapidement disséqués sur glace et plongés dans du TriReagent (Sigma) afin de lyser le tissu et de préserver les acides ribonucléiques messagers (ARNm). Pour les dosages biochimiques, un hémisphère est broyé sur glace dans un tampon de lyse composé de PBS (*phosphate buffered saline*), KCl (chlorure de Potassium) 140 mM, EDTA 1 mM et d'inhibiteurs de protéases. Le broyat est centrifugé à 960 x g pendant 10 min et soniqué, le surnageant est congelé pour servir ultérieurement aux dosages. Pour les analyses histologiques, les animaux sont anesthésiés avec de l'isoflurane (Piramal Healthcare). Après ouverture de la cage thoracique, une incision est réalisée au niveau de l'apex du cœur et une canule métallique est insérée dans le ventricule gauche. Par l'intermédiaire de l'oreillette droite,

les animaux sont perfusés avec 100 ml de PBS 0,1 M jusqu'à élimination complète du sang, puis les tissus sont perfusés avec 70 ml de paraformaldéhyde 4% (PFA). Les cerveaux sont alors prélevés et fixés 24 h dans du PFA (4%, 4°C, 24 h) puis placés dans une solution de Saccharose (15%, 4°C, 24 h) et enfin dans une solution de saccharose (30%, 4°C, 24 h). Afin de réaliser les différents marquages immunohistochimiques, des coupes transversales de 14 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un cryostat (Leica Microsystems) et stockées à 4°C dans du PBS jusqu'à utilisation.

2. Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (RT-PCR)

2.1. Extraction des ARNm

Au moment de la décapitation, le striatum et la substance noire sont plongés dans 1 ml de réactif TriReagent (Sigma). Les ARNm totaux sont extraits après ajout de 220 µl de chloroforme, centrifugés à 12000 x g pendant 5 min à 4°C. La phase aqueuse, contenant les ARNm, est récupérée et un volume de 350 µl d'éthanol (100 %) est ajouté à cette phase puis centrifugée de nouveau à la même vitesse. Les ARNm sont ensuite purifiés dans une colonne après traitement à la DNase I avec le kit d'extraction *Nucleospin RNA Extract II* selon les recommandations du fournisseur (Macherey-Nagel).

2.2. Dosage de la quantité et qualité de l'ARN

Cette étape est réalisée grâce à un Nanodrop par lecture de la densité optique (DO) à 230, 260 et 280 nm. Les ratios DO 260 nm/DO 280 nm et DO 260 nm/DO 230 nm sont calculés comme indicateurs de la contamination en protéines, et en sels ou éthanol, respectivement. Ces rapports doivent être compris entre 1,6 et 2,0 pour poursuivre l'expérience.

2.3. Transcription inverse

La transcription inverse correspond à la rétro transcription des ARN de l'échantillon en ADNc par le biais d'une enzyme de transcription inverse (RT) au moyen

du kit Improm-II (Promega). La RT est réalisée sur un thermocycleur (AB Veriti, Applied Biosystems).

2.4. Les étapes de la q-PCR

Chaque cycle de PCR comprend la dénaturation des deux brins d'ADN, hybridation des amorces spécifiques sur les molécules simple brin d'ADN et enfin élongation permettant la synthèse du brin complémentaire.

La détermination des niveaux d'expression des gènes d'intérêt est réalisée par q-RT-PCR en plaques 96-puits en présence de couples d'amorces spécifiques de chaque cible génique (Tableau 3). Pour cela, les ADNc obtenus à partir de la rétrotranscription des ARNm issus des hémisphères cérébraux sont dilués au 1/20^{ème} et utilisés comme matrice dans les réactions de RT-PCR. Ces réactions sont réalisées en présence de *Fast SYBR Green PCR Mastermix* (Applied Biosystems), complété des amorces sens et anti-sens des gènes cibles, utilisées à la concentration de 100 nM. La RT-PCR est réalisée sur un thermocycleur ABIprism 7500 en suivant ce programme :

- 2 min à 50°C
 - 10 min à 95°C
 - 15 sec à 95°C
 - 1 min à 60°C
- } 40 Cycles
- pause à 4°C

Des gènes de « ménage » (Actb et GAPDH) sont utilisés comme standards internes pour corriger les variations de quantité d'ARNm entre chaque échantillon. Les variations d'expression entre les différents groupes expérimentaux sont déterminées selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Cq}$.

Tableau 3 : Liste des gènes utilisés en PCR.

Gene	GenBank accession number	Sequence		Blast E value
		Forward	Reverse	
<i>IL-6</i>	NM_031168.1	Forward	GAAACCGCTATGAAGTTCCTCTCTG	0.00003
		Reverse	TGTTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA	0.0001
<i>IL-β</i>	NM_008361.3	Forward	GAAGAAGAGCCCATCCTCTGT	0.005
		Reverse	TGTTTCATCTCGGAGCCTGTA	0.013
<i>TNF-α</i>	NM_013693.2	Forward	CACCGTCAGCCGATTTGC	0.14
		Reverse	TGAGTTGGTCCCCCTTCTCC	0.013
<i>Caspase-3</i>	NM_009810	Forward	GAGGCTGACTTCCTGTATGCTT	0.001
		Reverse	AACCACGACCCGTCCTTT	0.14
<i>Bax</i>	NM_007527	Forward	GTGAGCGGCTGCTTGTCT	0.14
		Reverse	GGTCCCGAAGTAGGAGAGGA	0.013
<i>Bcl-2</i>	NM_009741	Forward	GTACCTGAACCGGCATCTG	0.035
		Reverse	GGGGCCATATAGTTCCACAA	0.013

3. Immunohistochimie

Les coupes de tissus sont incubées 1 h 30 dans du PBS (1 M, pH7.4), 5% de NDS (Normal donkey sérum) (Sigma) et 0,3% de Triton X-100 (Prolabo) afin de saturer les sites de liaison non spécifiques. Les coupes sont ensuite incubées une nuit (15 h) à 4°C avec l'anticorps primaire (Tableau 4) dans du PBS 1% BSA, et 0,3% Triton. Après trois rinçages au PBS (1 M, pH 7.4), les coupes sont incubées 1 h 30 à température ambiante avec l'anticorps secondaire adapté (Tableau 4) mélangé dans une solution de BSA / Triton (1% / 0,3%). Les coupes sont à nouveau rincées trois fois dans du PBS puis montées en Mowiol (Calbiochem) sur des lames porte-objet et recouvertes d'une lamelle couvre-objet. Les lames sont finalement séchées pendant une nuit à l'obscurité

puis observées au microscope confocal à balayage laser TCS SP2 (Leica Microsystems, Nanterre).

Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés en immunohistochimie.

Anticorps Primaire	Espèce	Dilution	Fournisseur	Anticorps Secondaire
Anti-TH	Lapin	1/1000	Millipore, Molsheim	DAR-488
Anti-GFAP	Lapin	1/400	Dako, Les Ulis	DAR-546

4. Western blot

La quantité de protéines totales dans l'extrait tissulaire est normalisée en utilisant le réactif de Bradford. L'homogénat de chaque échantillon est centrifugé (14 000 x g, 4°C, 15 min). Les protéines contenues dans le surnageant sont précipitées à 4°C par addition d'acide trichloroacétique glacé (TCA ; 10%). Les protéines précipitées sont ensuite récupérées par centrifugation (12 000 x g, 4°C, 15 min) et lavées trois fois avec une solution alcool / éther (30:70; v / v). Les protéines sont finalement dénaturées dans du Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) contenant 20% de glycerol, 0,7 M de 2-mercaptoéthanol, 0,004% (w/v) de bleu de bromophénol et 3% (v/v) de SDS à 100°C pendant 5 min. Une quantité d'environ 20 µg de chaque échantillon est migrée par électrophorèse sur gel SDS-polyacrylamide (SDS-PAGE, 12%) puis transférée sur une membrane de nitrocellulose (Amersham, Les Ulis). Afin de bloquer les sites non spécifiques, la membrane est d'abord incubée à température ambiante pendant 1 h dans une solution contenant 5% de lait écrémé diluée dans du tampon Tris Salin contenant 0.5% de BSA (TBS). Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire dilué dans du TBS avec 0.1 % de Tween 20 (Tableau 5) pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, les membranes sont lavées trois fois avec du TBST puis incubées dans du TBS contenant 5% de lait écrémé avec l'anticorps secondaire (1/5000^{ème}, Santa Cruz) pendant 1 h à température ambiante. Après trois lavages, les protéines sont révélées à l'aide d'un kit de détection de chimioluminescence (ECL

System, GE Healthcare, Aulnay-Sous-Bois) et mesurées avec un système d'analyse d'image (BioRad, Châtillon).

Tableau 5 : Liste des anticorps primaires utilisés en Western blot.

Anticorps Primaire	Espèce	Dilution	Fournisseur
Anti-TH	Lapin	1/1000	Millipore, Molsheim, France
Anti-GFAP	Lapin	1/1000	Dako, Les Ulis, France
Anti-GAPDH	Lapin	1/4000	Santa Cruz, Nanterre, France

5. Mesure des dommages oxydatifs

Les dommages oxydatifs sont évalués en mesurant les produits d'oxydation des lipides et des protéines. Les protéines totales des extraits tissulaires sont obtenues utilisant un tampon de lyse constituée de Tris-HCl (50 mM, pH 8), EDTA (10 mM, w/v), phenylmethyl-sulfonylfluoride (0.1 mM, w/v) et Triton X-100 (1%, v/v). L'homogénat est par la suite centrifugé (16 000 x g, 20 min, 4°C). Le surnageant est conservé à -20°C en vue du dosage des produits issus de l'oxydation des biomacromolécules.

5.1. Dosage du taux du malondialdéhyde (MDA)

Le malondialdéhyde (MDA), ou aldéhyde malonique est un produit de peroxydation lipidique, issu de l'attaque des acides gras polyinsaturés par les ROS. Le taux de MDA est déterminé selon la méthode de Drapper et Hadley 1990 en suivant les procédures décrites dans le kit commercial (SIGMA MAK 085). Les échantillons sont mélangés avec une solution contenant de l'acide trichloracétique (TCA, 20%) et de l'acide thiobarbiturique (TBA, 0.67%). Après incubation à 95°C pendant 30 min le mélange est refroidi rapidement en plaçant les tubes à 4°C. Après addition de n-butanol, le mélange est vortexé puis centrifugé (3 000 x g, 10 min, 4°C). Un volume de 100 µl de la phase supérieure contenant le MDA est soigneusement récupéré et placé dans une microplaque de 96 puits. L'absorbance est mesurée à la longueur d'onde 532 nm à l'aide d'un

spectrophotomètre. Les taux de MDA sont calculés selon la loi de Beer-Lambert en utilisant le coefficient d'extinction du complexe MDA-TBA de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

5.2. Evaluation de l'accumulation des ROS

La teneur intracellulaire en ROS est déterminée par la mesure de la fluorescence du 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH), dérivé d'un composé non fluorescent, le 5-6-Chloromethyl 2'-7'dichlorodihydrofluorescein (DCFH₂-DA), obtenu par déacétylation et oxydation de ce dernier au niveau intracellulaire. Pour cela 10 µl des extraits tissulaires sont incubés en présence d'une solution de DCFH₂-DA (10 µM, 30 min, 37°C) puis l'intensité de la fluorescence (λ excitation = 485 nm et λ émission = 535 nm) est mesurée à l'aide d'un lecteur de plaques (Bio-Tek FL800TBI).

5.3. Mesure de l'activité de la Caspase-3

Le dosage de l'activité de la caspase-3 est réalisé à l'aide du kit Apo-ONE Caspases-3/7 (Promega). Ce dosage est basé sur la mesure de l'intensité de la fluorescence rhodamine 110 ; bis-(N-CBZL-aspartyl-Lglutamyl-L-valyl-L-aspartic acid amide (Z-DEVD-R110) ; à la suite de son clivage spécifiquement par la forme active des capsases-3 et -7. 100 µl d'extrait tissulaire sont incubés avec 100 µl de tampon caspases-3/7 (99 µl de tampon + 1 µl de substrat). L'activité de la caspase-3 (seule exprimée dans le cerveau) est calculée à partir de la pente de la fluorescence mesurée toutes les 15 min pendant 3 h (λ excitation = 485 nm and λ emission = 530 nm) à l'aide d'un lecteur de plaques Flexstation III (Molecular Devices).

VI- Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software). Les données sont exprimées en moyenne (\pm SEM) d'au moins 5 animaux indépendants. Un test Two-way ANOVA suivi d'un post-test de Bonferroni est utilisé pour la comparaison de l'expression des gènes en RT-PCR, les analyses issues

des expériences d'immunohistochimie et l'activité de la caspase-3. Les différences sont considérées statistiquement significatives quand $P < 0.05$.

Résultats



Neuroprotective effects of the gliopeptide ODN in an in vivo model of Parkinson's disease

Seyma Bahdoudi^{1,2} · Ikram Ghouili² · Mansour Hmiden² · Jean-Luc do Rego^{3,4} · Benjamin Lefranc^{1,3} · Jérôme Leprince^{1,3} · Julien Chuquet¹ · Jean-Claude do Rego⁴ · Ann-Britt Marcher⁵ · Susanne Mandrup⁵ · Hubert Vaudry^{1,3} · Marie-Christine Tonon¹ · Mohamed Amri² · Olfa Masmoudi-Kouki² · David Vaudry^{1,3}

Received: 7 July 2017 / Revised: 13 November 2017 / Accepted: 5 December 2017
© Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2017

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by a progressive loss of dopamine (DA) neurons through apoptotic, inflammatory and oxidative stress mechanisms. The octadecaneuropeptide (ODN) is a diazepam-binding inhibitor (DBI)-derived peptide, expressed by astrocytes, which protects neurons against oxidative cell damages and apoptosis in an in vitro model of PD. The present study reveals that a single intracerebroventricular injection of 10 ng ODN 1 h after the last administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) prevented the degeneration of DA neurons induced by the toxin in the substantia nigra pars compacta of mice, 7 days after treatment. ODN-mediated neuroprotection was associated with a reduction of the number of glial fibrillary acidic protein-positive reactive astrocytes and a strong inhibition of the expression of pro-inflammatory genes such as *interleukins 1β* and *6*, and *tumor necrosis factor-α*. Moreover, ODN blocked the inhibition of the anti-apoptotic gene *Bcl-2*, and the stimulation of the pro-apoptotic genes *Bax* and *caspase-3*, induced by MPTP in the substantia nigra pars compacta. ODN also decreased or even in some cases abolished MPTP-induced oxidative damages, overproduction of reactive oxygen species and accumulation of lipid oxidation products in DA neurons. Furthermore, DBI knockout mice appeared to be more vulnerable than wild-type animals to MPTP neurotoxicity. Taken together, these results show that the gliopeptide ODN exerts a potent neuroprotective effect against MPTP-induced degeneration of nigrostriatal DA neurons in mice, through mechanisms involving downregulation of neuroinflammatory, oxidative and apoptotic processes. ODN may, thus, reduce neuronal damages in PD and other cerebral injuries involving oxidative neurodegeneration.

Keywords Neuropeptide ODN · MPTP · Parkinson's disease · Neurodegeneration · Neuroprotection · Inflammation and oxidative response

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00018-017-2727-2>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Olfa Masmoudi-Kouki
olfa.masmoudi@fst.utm.tn

✉ David Vaudry
david.vaudry@univ-rouen.fr

¹ Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Communication and Differentiation, Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), Normandy University, UNIROUEN, INSERM, U1239, 76821 Mont-Saint-Aignan, France

² University Tunis El Manar, Faculty of Science of Tunis, UR/11ES09, Laboratory of Functional Neurophysiology and Pathology, 2092 Tunis, Tunisia

Abbreviations

ACBP Acyl-CoA binding protein
CNS Central nervous system

³ Regional Cell Imaging Platform of Normandy (PRIMACEN), Normandy University, UNIROUEN, INSERM, 76821 Mont-Saint-Aignan, France

⁴ Behavioral Analysis Platform (SCAC), Normandy University, 76183 Rouen, France

⁵ Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, 5230 Odense M, Denmark

Published online: 20 December 2017

Springer

DA	Dopamine
DBI	Diazepam-binding inhibitor
GSH	Glutathione
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
<i>i.c.v.</i>	Intracerebroventricular
IL	Interleukin
<i>i.p.</i>	Intraperitoneal
KO	Knockout
MAO	Monoamine oxidase
MDA	Malondialdehyde
MPP ⁺	1-Methyl-4-phenylpyridinium
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
ODN	Octadecaneuropeptide
PD	Parkinson's disease
SNpc	Substantia nigra pars compacta
TH	Tyrosine hydroxylase
TNF- α	Tumor necrosis factor- α

Introduction

Parkinson's disease (PD), a chronic neurodegenerative disorder that affects around 2% of people aged over 65 years worldwide [1, 2], is characterized by motor deteriorations such as postural instability, rigidity and bradykinesia [3, 4]. The pathological hallmarks of PD include a loss of dopaminergic neurons within the substantia nigra pars compacta (SNpc), responsible for a decrease of striatal dopamine (DA) levels and associated dysfunction of neuronal network integrity [5, 6]. It is generally accepted that PD develops as a result of interplay between genetic and environmental factors [7–9] and involves inflammatory and oxidative stress processes [10–12]. In particular, increased levels of pro-inflammatory mediators and free radicals in the SNpc, as observed in both PD models and PD patients, exacerbate DA neuron degeneration [10, 13]. Various treatments are used to improve motor functions in PD patients, including administration of levodopa, surgical approaches and electrical stimulation [7, 14, 15]. However, all the current therapeutic approaches remain palliative and do not cure the disease [16]. Furthermore, these treatments have drawbacks and, in some cases, can produce disabling side effects [17]. Thus, there is a need to find efficient neuroprotective agents which could lead to the development of new therapies for effective treatments of the disease.

It is well established that astrocytes play an important role in the protection of brain damages induced by inflammation and oxidative stress, and recent studies have highlighted the neuroprotective effect of various factors expressed by astrocytes in PD models [18, 19]. Concurrently, several findings have provided evidence that reactive astrocytes can exert beneficial effects and confer endogenous neuroprotection by secreting neurotrophic factors such as glial cell line-derived

neurotrophic factor (GDNF) [20], ciliary neurotrophic factor (CNTF) [21] and mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) [22]. Therefore, investigation of the beneficial effects of reactive astrocytes, particularly the capability of the factors they express to limit inflammatory damages, oxidative stress insults and apoptosis, appears crucial to protect DA neurons. It is notably important to identify new factors expressed by astrocytes, which can prevent both oxidative stress and proinflammatory mediators responsible for apoptosis-induced DA neuron degeneration. In this context, the octadecaneuropeptide (ODN), which is exclusively produced by astroglial cells in the central nervous system (CNS) of mammals [23–27] and exerts a potent neuroprotective activity against 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced oxidative stress on cultured cerebellar granule cells [28], could be a promising factor. ODN is a gliopeptide generated through proteolytic cleavage of an 86-amino acid precursor called diazepam-binding inhibitor (DBI) [29, 30], also known as acyl-CoA binding protein (ACBP) [31]. The primary structure of DBI has been well preserved during evolution [32, 33], suggesting that DBI-derived peptides play important biological functions. Indeed, DBI and its derived products regulate food intake, behavioral activities and energy metabolism [34–37]. In addition, ACBP/DBI regulates brain lipid metabolism, and fatty acid metabolism-related gene expression is compromised in brain slices and astrocytes cultured from ACBP/DBI-deficient mice [38]. Interestingly, ODN has been shown to stimulate neurogenesis in the adult mouse brain [39], to increase glutathione (GSH) biosynthesis and antioxidant enzyme activity in cultured neurons and astroglial cells [28, 40, 41], and to prevent oxidative stress-induced reactive oxygen species (ROS) accumulation and cellular damages in cultured astrocytes [40, 42]. Experimental and clinical studies have also shown that ODN concentrations are increased in the plasma of rats and humans subjected to systemic inflammation [43]. Consistent with these observations, we have recently shown that ODN release, as well as expression of its precursor DBI, are induced in astrocytes in response to mild oxidative insult, and contribute to prevent cell death [44]. Altogether, these data suggest that ODN acts as a neurotrophic factor regulating proliferation and/or survival of neuronal cells, and may, thus, contribute to prevent pro-inflammatory and oxidative damages under injury conditions.

The prodrug 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), which replicates in human and non-human mammals clinical hallmarks of PD syndrome [45–47], is widely used to induce DA neuronal cell death in animal models [48, 49]. MPTP per se is not deleterious, but it is oxidized by monoamine oxidase B expressed by astrocytes into 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺), which is toxic. MPP⁺ is then released into the extracellular fluid and conveyed by DA transporters into nerve terminals of DA neuron.

MPP⁺ induces DA neuron apoptosis through the production of ROS, causing inhibition of complex I of the mitochondrial respiratory chain [50–52] associated with the expression of the pro-apoptotic protein Bax and activation of caspase-3 [53].

Although there is clear evidence that ODN exerts a strong protective activity against oxidative stress-induced apoptosis on cultured neurons and glial cells, the potential neuroprotective activity of ODN *in vivo* has not been tested so far. Therefore, the aim of the present study was to investigate whether intracerebroventricular (*i.c.v.*) injection of ODN could prevent DA neuron degeneration in a MPTP-induced mouse model of PD, and to explore the vulnerability of ODN precursor knockout (KO) mice to MPTP-induced neurotoxicity.

Materials and Methods

Animals

Animals used in this study were 10-week-old C57BLJ/6 male mice purchased from Charles Rivers Laboratories (L'Obrestle, France), and C57BL/6J BomTac wild-type (ACBP/DBI^{+/+}), DBI heterozygous (ACBP/DBI^{+/-}) and DBI homozygous KO (ACBP/DBI^{-/-}) mice obtained from the intercross of heterozygous animals after characterization by PCR analysis of DNA isolated from tail biopsies [54]. Primers used for the genotyping were: rev: 5'GTATCTGCTCATCTATTTCGGCTTGG3'; fwd: 5'CCGCTGAGGAGGTGAAGCGCC3'. One week before the beginning of the treatments, animals were housed four per cage on a 12-h light/dark cycle at 21 °C with free access to food and tap water for acclimatization. Experiments were approved by the regional ethic committee for animal experimentation (CENOMEXA) and conducted by authorized investigators according to the recommendations of the European Union.

I.c.v. Injections

I.c.v. injections of saline or ODN solutions (10 µl/mouse) were conducted according to the procedure of Haley and McCormick [55], using a microsyringe (50 µl; Hamilton, Bonaduz, Switzerland) connected to a needle (diameter 0.5 mm), of which the bevel protruded only 3.5 mm from a guard, limiting its penetration into the brain. The free-hand *i.c.v.* injections in immobilized mice lasted approximately 5 s and were conducted as previously described [35]. *I.c.v.* injections were performed by an experienced investigator who frequently controlled the regularity and success of the injections, using methylene blue dye, and who observed (after killing and frontal brain sectioning) that the injection was successful in more than 95% of the trials.

In vivo treatment and experimental design

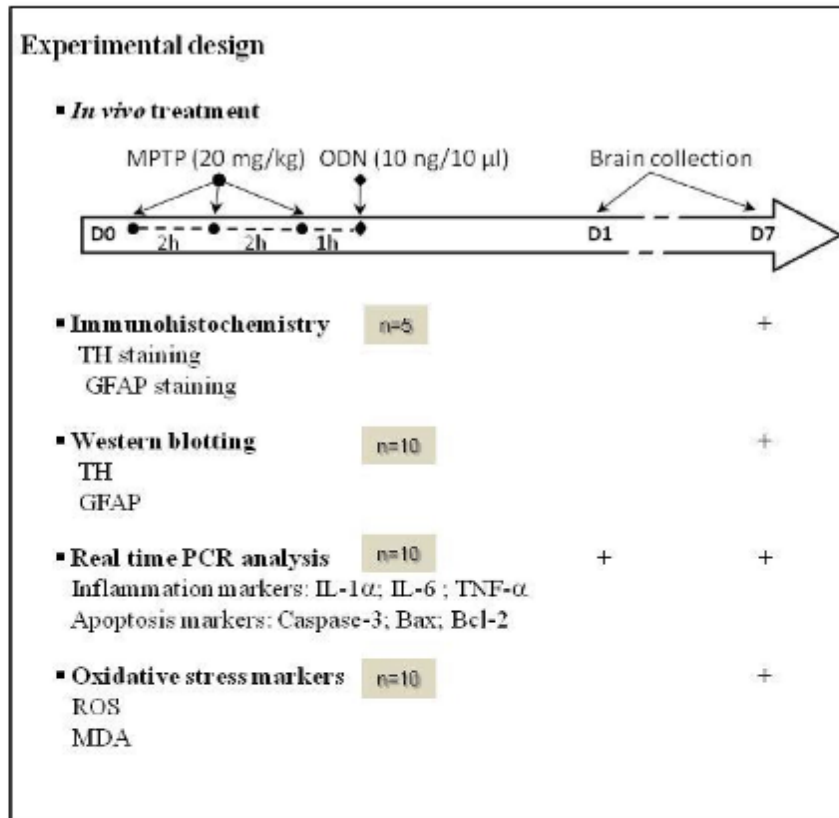
Animals were divided into four groups, i.e. control ($n = 15$), MPTP ($n = 15$), ODN ($n = 15$) and MPTP plus ODN ($n = 15$). On the first day of treatment (D0), each mice received three intraperitoneal (*i.p.*) injections of MPTP (20 mg/kg) in 100 µl of 0.9% NaCl at 2-h intervals, and a 10 µl *i.c.v.* injection of ODN (10 ng) 1 h after the last injection of MPTP (Table 1). Control animals received saline solution instead of MPTP with or without ODN. Seven days after the beginning of the treatment (D7), mice were deeply anesthetized and killed to collect brains for real-time PCR, Western blot, immunohistochemistry and biochemical experiments (see Table 1). For experiments using mice with targeted deletion of ACBP/DBI (DBI^{-/-} and DBI^{+/-}), since the objective was to observe a difference of toxicity between wild-type and DBI^{-/-} animals, the experimental design was similar except the doses of MPTP, which were reduced to 10 mg/kg.

Mice were exposed to MPTP (20 mg/kg, 3 times at 2 h interval), ODN (10 ng/10 µl), MPTP and ODN or saline solution (NaCl 0.9%, Sham). On Day 0 (D0), animals received three intraperitoneal injections of 100 µl MPTP at 2-h intervals and 1 h after the last injection of MPTP, mice received 10 µl of intracerebroventricular injection of ODN (10 ng; ODN and MPTP + ODN treated mice) or saline solution (control and MPTP-treated mice). On D7, mice were killed and striatum as well as substantia nigra tissues were removed and analyzed by immunofluorescence, Western blotting and RT-qPCR approaches to assess tyrosine hydroxylase (TH), glial fibrillary acidic protein (GFAP), apoptotic and proinflammatory gene and protein expression. Tissue samples were also used to measure ROS and MDA abundance. Brain from each group was also collected at D1 for real-time PCR analysis. The number of animals used in each experiment (n) is indicated.

Immunohistochemistry

Animals were anesthetized with isoflurane and intracardially perfused with 0.9% NaCl to rinse blood vessels, and then with 4% paraformaldehyde (PFA; Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) to fix tissues. After decapitation, the brains were removed and post-fixed overnight in a 4% PFA solution at 4 °C. The brains were then immersed for cryopreservation in 15 and 30% sucrose solution for 24 h each. Frozen brains were sectioned in the frontal plane at the levels of the SNpc and striatum into 10 µm thick slices with a cryomicrotome (CM3050; Leica Microsystems, Nanterre, France), and mounted onto chromium potassium sulphate and gelatine-coated glass slides. Three to four tissue sections from each brain were preincubated for 90 min in blocking solution containing

Table 1 Experimental design of the study showing treatments and assays



1:50 normal donkey serum, 1% bovine serum albumin, and 0.3% Triton X-100 (VWR International, Strasbourg, France) in phosphate buffered saline (PBS). Three-four tissue sections from each brain were then incubated overnight with an anti-tyrosine hydroxylase (TH) rabbit primary antibody (1:1000 dilution; Millipore, Molsheim, France) and others with glial fibrillary acidic protein (GFAP) rabbit primary antibody (1:1000 dilution; Dako, Les Ulis, France) at 4 °C. After three washes in PBS, the tissues were incubated with secondary antibodies for 90 min at room temperature, i.e., Alexa 488-conjugated donkey anti-rabbit IgG or Alexa 594-conjugated donkey anti-rabbit IgG (1:400 dilution each; Invitrogen Life technologies, Longjumeau, France). Finally, the slices were rinsed thrice in PBS and cover slipped with Mowiol to perform image acquisition using a TCS SP2 upright confocal

laser-scanning microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France). Fluorescence quantification was conducted with the video imaging software ImageJ.

Preparation of brain tissue extracts for Western blot and biochemical experiments

Animals were deeply anesthetized with pentobarbital (Sigma Aldrich, 40 mg/kg body weight *i.p.*). After decapitation, SNpc and striatum from each animal were dissected, homogenized in 1 ml lysis buffer containing 1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA plus Pierce EDTA free protease inhibitor tablets (Thermo Scientific, Paris, France) and centrifuged (14,000g, 4 °C, 15 min).

Western blot

Whole protein content in brain tissue extracts was measured by using the Bradford reagent method and normalized. The homogenate was centrifuged (14,000g, 4 °C, 15 min) and the proteins contained in the supernatant were precipitated at 4 °C by addition of ice-cold 10% trichloroacetic acid (TCA). Precipitated proteins were then recovered by centrifugation (12,000g, 4 °C, 15 min) and washed thrice with an alcohol/ether solution (30:70; v/v). The proteins were finally denatured in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 20% glycerol, 0.7 M 2-mercaptoethanol, 0.004% (w/v) bromophenol blue and 3% (v/v) SDS at 100 °C for 5 min.

Protein samples (~ 20 µg) were subjected to a 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and the gel was transferred onto a nitrocellulose membrane (Amersham, Les Ulis, France). The membrane was first incubated at room temperature for 1 h in a blocking solution containing 5% skim milk in 50 mM Tris-buffered saline solution completed with 0.1% Tween 20 (TBST). The membranes were then incubated with primary antibodies against TH (1:1000 dilution; Millipore, Molsheim, France), GFAP (1:1000 dilution; Dako, Les Ulis, France) or glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; 1:4000 dilution; Santa Cruz, Nanterre, France) overnight at 4 °C. The next day, membranes were washed with TBST and then incubated in TBS containing 5% skim milk with a goat anti-rabbit secondary antibody (1:5000 dilution; Santa Cruz) for 1 h at room temperature. After washing, proteins were revealed using a chemiluminescence detection kit (ECL System, GE Healthcare, Aulnay-Sous-Bois, France) and measured with an image analysis system (BioRad, Châtillon, France).

Caspase-3 activity

An aliquot of 100 µl of brain tissue extract was incubated with the Apo-ONE™ homogeneous caspase-3/7 assay kit (Promega). Fluorescence intensity was measured over a 3-h period with a FlexStation III microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm.

Measurement of oxidative stress markers

Measurement of intracellular ROS formation

ROS were detected by measuring the fluorescence of 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) which is derived from the deacetylation and oxidation of the non-fluorescent compound DCFH₂-DA. An aliquot of 100 µl of brain tissue extract (0.24 ± 0.02 mg/ml from SNpc and 0.6 ± 0.03 mg/ml from striatum) was incubated with 10 µM DCFH₂-DA at 37 °C for 30 min in the dark and fluorescence was measured

with a fluorescence microplate reader FL800TBI (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) using 485- and 538-nm excitation and emission filters, respectively.

Measurement of malondialdehyde formation

Malondialdehyde (MDA, i.e. a lipid oxidation product) content was determined using an MDA kit (Sigma Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 200 µl of brain tissue extract (~ 0.24 mg/ml from SNpc and ~ 0.6 mg/ml from striatum) was mixed with a solution containing 1% butylhydroxytoluene and 20% TCA, and then centrifuged (1000g, 5 min, 4 °C). The supernatant was mixed with a solution containing 0.5 M HCl, 120 mM 2-thio-barbituric acid plus 26 mM Tris-HCl (pH 7.5) and heated at 95 °C for 60 min. After cooling, the absorbance was measured at 532 nm (FlexStation III Molecular Devices, Sunnyvale, USA).

Real-time PCR analysis

Total RNAs from the mouse SNpc or striatum, obtained at 1 and 7 days after MPTP treatment, were extracted using Tri-Reagent (Sigma Aldrich) and purified with the NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France). The concentration of RNA was measured with a Thermo-Scientific Nanodrop 2000 spectrophotometer (Labtech, Palaiseau, France) at an absorbance of 260 nm. One micro gram of total RNA from each sample was converted into single stranded cDNA using the Improm-II reverse transcriptase kit (Promega, Madison, WI, USA) with random primers (0.5 µg/ml). Three ng cDNA were then amplified in the presence of 1X SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) containing preset concentrations of dNTPs and MgCl₂ with forward and reverse primers (Table 2), using an ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The relative amount of cDNA in each sample was calculated using the comparative quantification cycle (Cq) method and expressed as 2^{-ΔΔCq} using GAPDH, which was constant in all treatment conditions, as an internal standard for variations in amounts of input mRNA.

Statistical analysis

The data are presented as the mean ± SEM of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using the PRISM software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A two-way ANOVA, followed by a Bonferroni's post hoc test was used, and differences were considered statistically significant when *P* ≤ 0.05.

Table 2 Sequences of the primers used for real-time PCR experiments

Gene	GenBank accession number	Sequence	Blast E value
<i>IL-6</i>	NM_031168.1		
	Forward	GAAACCCGCATGAAGTTCCTCTCTG	0.00003
	Reverse	TGTTGGGAGTGGTATCCCTCTGTGA	0.0001
<i>IL-β</i>	NM_008361.3		
	Forward	GAAGAAGAGCCCATCCTCTGT	0.005
	Reverse	TGTTTCATCTCGGAGCCCTGTA	0.013
<i>TNF-α</i>	NM_013693.2		
	Forward	CACCGTCAGCCGATTTGC	0.14
	Reverse	TGAGTTGGTCCCCTCTCC	0.013
<i>Caspase-3</i>	NM_009810		
	Forward	GAGGCTGACTTCTGTATGCTT	0.001
	Reverse	AACCACGACCCGTCCTTT	0.14
<i>Bax</i>	NM_007527		
	Forward	GTGAGCGGCTGCTTGTCT	0.14
	Reverse	GGTCCCGAAGTAGGAGAGGA	0.013
<i>Bcl-2</i>	NM_009741		
	Forward	GTACCTGAACCGGCATCTG	0.035
	Reverse	GGGGCCATATAGTCCACAA	0.013

Results

ODN protects dopaminergic neurons against MPTP-induced degeneration

MPTP administration induced a significant decrease in body weight within 2 days after the beginning of the treatment, while ODN administration, which had no effect compared to control, counteracted body weight loss during all the period of treatment in MPTP-treated mice (Fig. 1). Although the body weight of MPTP-treated animals remained slightly lower than in the other groups over the following 6 days, the differences were no longer significant (Fig. 1). To evaluate the efficiency of MPTP administration, immunohistochemical and Western blot experiments were performed (Fig. 2). Consistent with previous reports [56, 57], acute administration of MPTP (20 mg/kg, 3 times at 2 h interval) induced a massive loss of DA neurons in the SNpc within 7 days after intoxication when compared to saline-treated animals (Fig. 2A-a,b). Quantification of the fluorescence mean intensity of TH expression in the SNpc revealed a 43% decrease in MPTP-treated animals compared to sham animals (Fig. 2B). Western blot analysis also confirmed that the TH protein level was decreased in the SNpc (− 62%; Fig. 2C-a) and the striatum (− 58%; Fig. 2C-b) of MPTP-treated mice. We next examined whether ODN could prevent MPTP-induced cell death of DA neurons. While *i.c.v.* injection of ODN (10 ng/10 μl) alone had no effect on TH expression (Fig. 2A-c, B), administration of ODN to MPTP-treated mice suppressed the loss of DA neurons induced by the toxin

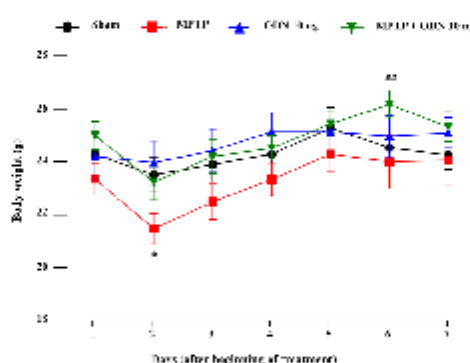
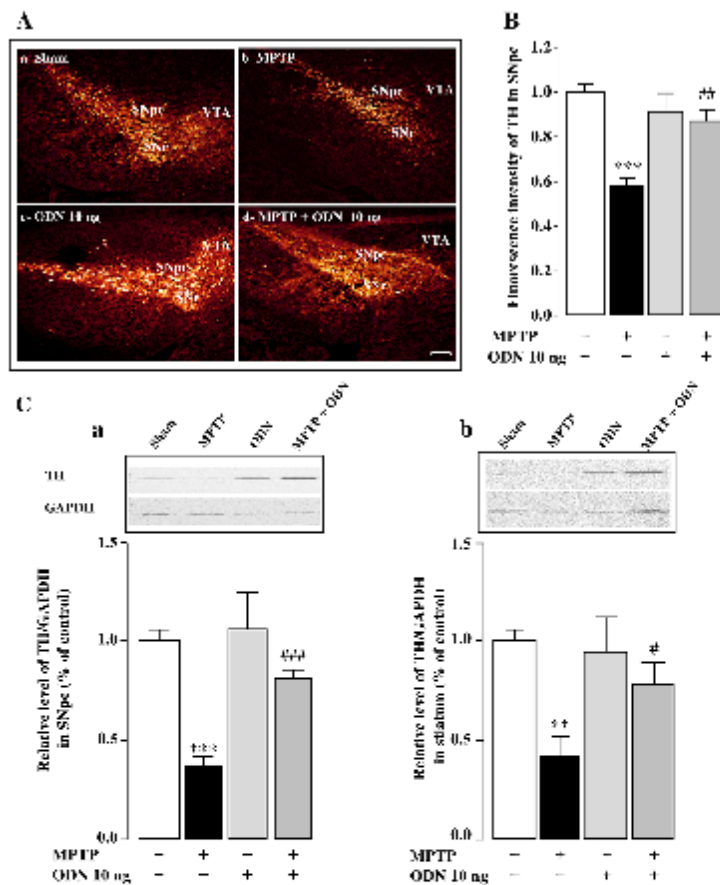


Fig. 1 Time-course of the effect of ODN on body weight of MPTP-treated mice. On day 1, mice received 3 intraperitoneal (*i.p.*) injections of saline solution (0.9% NaCl; Sham filled circle) or MPTP (20 mg/kg; red square) at 2 h of interval, followed by intracerebroventricular (*i.c.v.*) injection of saline or ODN (10 ng/10 μl) 1 h after the last *i.p.* injection of saline (blue triangle) or MPTP (green inverted triangle) solution. Body weight of each mouse was measured daily from day 1 to day 7 after MPTP treatment. Each value represents the mean (±SEM) from 15 animals and statistical analysis was conducted by ANOVA followed by Bonferroni's test. **P* < 0.05 vs saline-treated mice; ***P* < 0.01 vs MPTP-treated mice

in the SNpc and prevented the degeneration of nerve fibers in the striatum (Fig. 2A-d, C). Quantification of the fluorescence mean intensity of TH expression in the SNpc revealed that ODN counteracted by 86% (*P* < 0.01) the decrease of

Neuroprotective effects of the gliopeptide ODN in an *in vivo* model of Parkinson's disease

Fig. 2 ODN reverses the reduction of tyrosine hydroxylase expression in MPTP-treated mice. **A** Representative images of tyrosine hydroxylase (TH) immunostaining in the substantia nigra pars compacta (SNpc) 7 days after treatment with NaCl (Sham; A-a), MPTP (3 × 20 mg/kg; A-b), ODN (10 ng/10 µl; A-c) and MPTP + ODN (A-d). Scale bar = 100 µm SNpc (substantia nigra pars compacta), SNr (substantia nigra pars reticulata), VTA (ventral tegmental area). **B** Relative TH immunofluorescence intensity of surviving dopaminergic neurons in the SNpc 7 days after MPTP treatment alone or with ODN. **C** Densitometric analysis of TH protein levels in the SNpc (C-a) and striatum (C-b) of sham-, MPTP-, ODN-, and MPTP + ODN-treated mice. Digital photographs illustrate the expression of TH after immunoblotting, and graphs display the relative abundance of TH measured by densitometry of the bands obtained in immunoblots and standardized with GAPDH. All values are expressed as mean ± SEM from 5 animals and statistical analysis was conducted by ANOVA followed by Bonferroni's test. ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs saline-treated mice; #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01, ###*P* < 0.001 vs MPTP-treated mice



TH-immunoreactive neurons induced by MPTP (Fig. 2B). Western blot experiments confirmed that ODN administration to MPTP-treated mice significantly prevented the reduction of TH protein expression in the SNpc (116% vs MPTP group) and in the striatum (86% vs MPTP group) within 7 days after treatment (Fig. 2C). ODN alone had no effect on TH expression in the SNpc (Fig. 2C-a) and the striatum (Fig. 2C-b) when compared to sham-treated animals.

In agreement with previous results [58], a strong increase in GFAP immunostaining, a hallmark of astrogliosis, was detected throughout the SNpc 7 days after MPTP intoxication, paralleling the loss of DA neurons (Fig. 3A-a, b). Administration of ODN alone did not modify the expression of GFAP compared to sham animals (Fig. 3A-a, c), but administration of ODN to MPTP-treated mice completely blocked the astrogliosis induced by the toxin (Fig. 3A-d).

Observation of GFAP-positive cell morphology at high magnification in the SNpc revealed that, in MPTP-treated mice, astrocytes display a hypertrophic and activated phenotype (data not shown). Quantification of the fluorescence mean intensity of GFAP expression in the SNpc showed a significant increase (+133%) of activated glial cells in MPTP-treated mice compared with saline-treated animals (Fig. 3B). This increase in GFAP expression induced by MPTP was totally blocked by ODN treatment.

ODN Inhibits MPTP-induced pro-inflammatory and pro-apoptotic gene expression

Since MPTP induces an inflammatory response that facilitates neurodegeneration, we examined the effect of ODN on the expression of pro-inflammatory genes in MPTP-treated

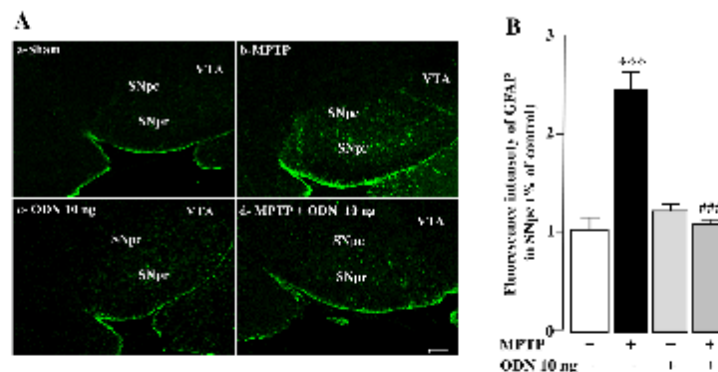


Fig. 3 ODN suppresses astrogliosis in MPTP-treated mice. **A** Representative images of GFAP immunostaining in the substantia nigra pars compacta (SNpc) 7 days after treatment with NaCl (Sham; A-a), MPTP (3 × 20 mg/kg; A-b), ODN (10 ng/10 µl; A-c) and MPTP + ODN (A-d). Scale bar = 100 µm. SNpc (substantia nigra pars compacta), SNr (substantia nigra pars reticulata), VTA (ventral

tegmental area) **B** Relative GFAP immunofluorescence intensity in the SNpc 7 days after sham, MPTP, ODN, and MPTP + ODN treatment. All values are expressed as mean ± SEM from five animals and statistical analysis was conducted by ANOVA followed by Bonferroni's test. ****P* < 0.001 vs saline-treated mice; ****P* < 0.001 vs MPTP-treated mice

mice by means of real-time PCR. Consistent with the literature [10, 59], the mRNA levels of *interleukin 6 (Il-6)*; + 76.9% vs sham group) and *tumor necrosis factor-α (Tnf-α)*; +115% vs sham group) were markedly increased in the SNpc of MPTP-treated mice 7 days after the beginning of the treatment (Fig. 4a, b). An *i.c.v.* injection of ODN to MPTP-treated animals abolished the stimulatory effect of MPTP on *Il-6* (-32.8% vs MPTP group) and *Tnf-α* (-67.4% vs MPTP group) mRNA levels (Fig. 4a, b). While *Il-1β* gene expression was not increased on day 7 in MPTP-treated animals (Fig. 4c), it was significantly enhanced 1 day after administration of the toxin (supplementary data, Fig. 1A), showing a time-dependent evolution of the pro-inflammatory response. This early increase of *Il-1β* expression was also blocked by ODN injection to MPTP-treated animals (supplementary data, Fig. 1A).

To explore the effect of ODN on MPTP-induced apoptosis, the expression of several anti- and pro-apoptotic genes was investigated. The results showed that Bax and caspase-3 mRNA expression levels were increased by 76 and 91%, respectively, in the SNpc (Fig. 4d, e), and that ODN totally blocked the MPTP-induced increase of Bax and caspase-3 expression (- 81 and - 77%, respectively, vs MPTP group; Fig. 4d, e). No change in Bcl-2 mRNA expression level was detected 7 days after MPTP treatment (Fig. 4f) but a significant decrease of the gene expression (- 48% vs sham group) was observed 1 day after administration of the toxin, and this effect was blocked in animals that received ODN (supplementary data Fig. 1B). Besides its effect on gene expression, ODN also prevented MPTP-induced stimulation

of caspase-3 activity within 7 days of treatment, in both the SNpc and striatum (- 89 and - 96% vs MPTP group, respectively; Fig. 5a, b).

ODN prevents the effect of MPTP on ROS accumulation and on oxidative damages

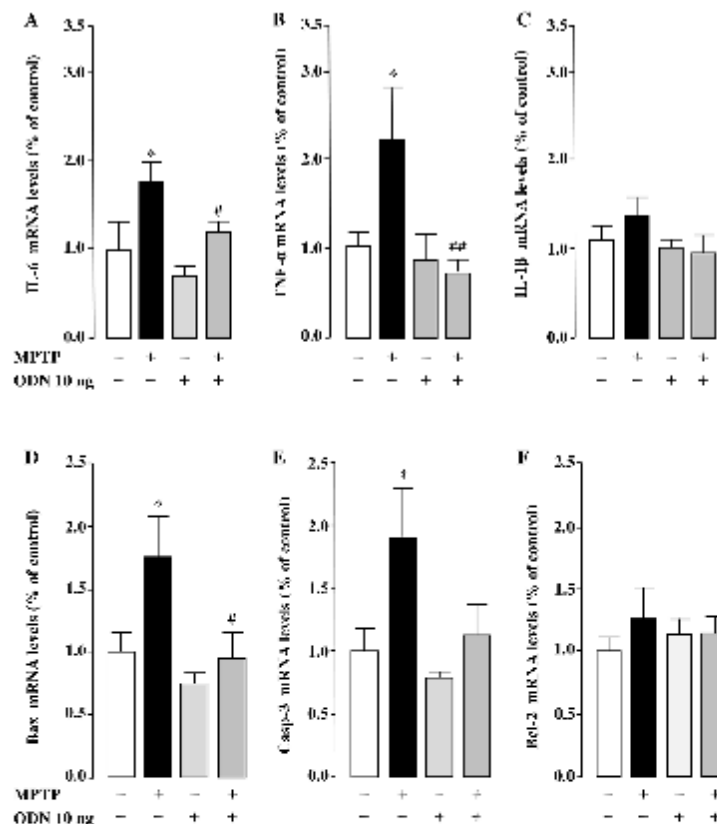
To investigate the ability of ODN to block MPTP-induced oxidative stress, ROS content in SNpc and striatum homogenates was measured with the CM-H₂DCFDA probe, which becomes fluorescent upon oxidation by ROS. Seven days after MPTP treatment, the level of ROS was significantly increased in comparison to saline-treated animals both in the SNpc (+ 44%; Fig. 6a) and in the striatum (+ 77%; Fig. 6b). The action of MPTP on ROS accumulation was associated with a significant increase of MDA, a product of the oxidative breakdown of highly unsaturated fatty acids, both in the SNpc (+43%; Fig. 6c) and the striatum (+66%; Fig. 6d). ODN administration totally prevented the increase of ROS and MDA levels induced by MPTP intoxication in both SNpc and striatum (Fig. 6).

MPTP induced toxicity is enhanced in DBI-KO mice

We next investigated the impact of the deficiency of the ODN precursor, i.e, DBI, on DA neuron loss, glial activation, and expression of pro-inflammatory and apoptotic mediators in the SNpc and striatum of MPTP-treated mice. For these experiments, DBI^{+/+}, DBI^{+/-} and DBI^{-/-} mice received 3 injections of MPTP (10 mg/kg) at 2 h interval on

Neuroprotective effects of the gliopeptide ODN in an *in vivo* model of Parkinson's disease

Fig. 4 ODN prevents pro-inflammatory and pro-apoptotic gene expression in MPTP-treated mice. Quantification of *Il-6* (a), *Tnf- α* (b), *Il-1 β* (c), *Bax* (d), *Caspase-3* (e) and *Bcl-2* (f) mRNA levels in the substantia nigra pars compacta (SNpc) of the mouse brain 7 days after treatment with NaCl (Sham), MPTP (3 \times 20 mg/kg), ODN (10 ng/10 μ l) and MPTP + ODN. Data were normalized using the *GAPDH* housekeeping gene as an internal control and the results are expressed as a percentage of control. Data are mean \pm SEM obtained from 10 animals and statistical analysis was conducted by ANOVA followed by Bonferroni's test. * P < 0.05 vs saline-treated mice; # P < 0.05, ## P < 0.01 vs MPTP-treated mice



day 0, and were killed on day 7. As illustrated on Figs. 7A, DA neurons of *DBI^{-/-}* mice were more sensitive to MPTP than *DBI^{+/-}* and *DBI^{+/+}* animals. In particular, a deficiency in *DBI* strongly potentiated MPTP-induced DA neuron apoptosis in the ventral tegmental area (VTA), indicating that the endogenous *DBI*-derived peptide ODN may be involved in the wounding and protection of DA VTA neurons. Western blot quantification of *TH* expression levels in the SNpc (Fig. 7B-a) and striatum (Fig. 7B-b) confirmed that MPTP induced a greater loss of DA neurons in *DBI^{-/-}* mice than in wild-type animals. Furthermore, Q-PCR analysis revealed that *i.c.v.* injection of ODN (10 ng) prevented MPTP-evoked inhibition of *TH* gene expression in wild-type mice (supplementary data, Fig. 2A) and that ODN deficiency in *DBI^{-/-}* mice leads to a decrease of *TH* mRNA level in *DBI^{-/-}* mice (supplementary data, Fig. 2B). GFAP immunostaining and Western blot analysis showed that MPTP treatment significantly increased the number

of activated GFAP-positive cells (Fig. 8A) and the GFAP expression level (Fig. 8B) in the SNpc and striatum of *DBI^{-/-}* mice when compared to wild-type animals.

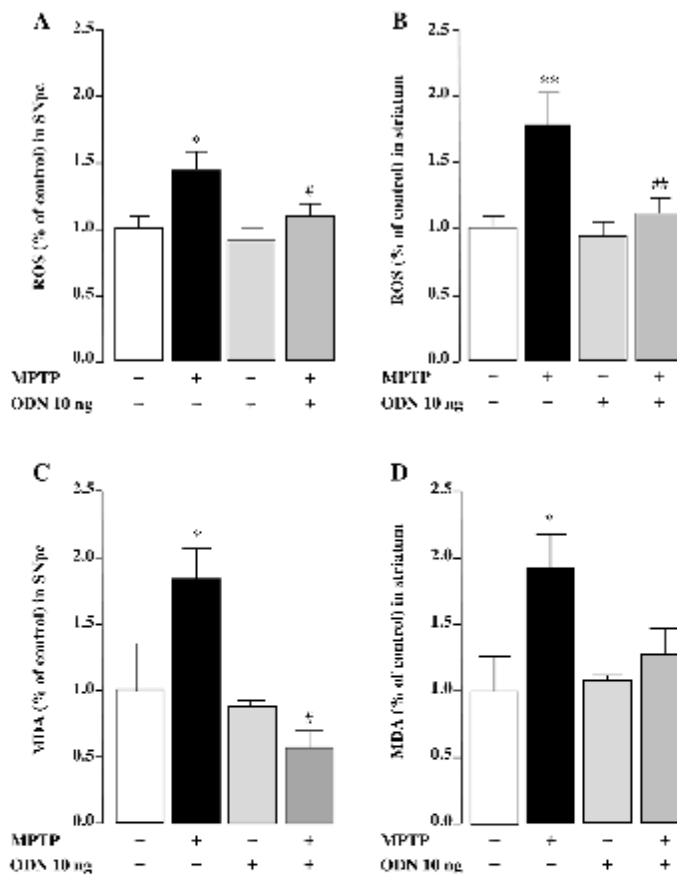
In addition to astroglial activation, 7 days after injection, MPTP treatment induced a significant increase of *Il-6* mRNA level in *DBI^{-/-}* animals (Fig. 9a) while *Tnf- α* mRNA level was not significantly modified. Concurrently, a significant increase of *Bax* (+ 92% vs *DBI^{+/+}* group) and *caspase-3* (+ 40% vs *DBI^{+/+}* group) gene expression occurred (Fig. 9c, d). Finally, the level of activated caspase-3 is higher in *DBI^{-/-}* mice than in wild-type mice (Fig. 9e).

Discussion

Previous studies performed on cultured neurons and astrocytes have established the antiapoptotic activity of ODN against oxidative insults and cell death [28, 40, 42], but the

Neuroprotective effects of the gliopeptide ODN in an in vivo model of Parkinson's disease

Fig. 6 ODN inhibits reactive oxygen species and lipid oxidation product malondialdehyde accumulation in MPTP-treated mice. Quantification of the levels of reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) in the substantia nigra pars compacta (SNpc) (a, c) and striatum (b, d) 7 days after treatment with NaCl (Sham), MPTP (3 × 20 mg/kg), ODN (10 ng/10 µl) and MPTP + ODN. Each value, expressed as a percentage of control, represents the mean (± SEM) obtained from 10 animals and statistical analysis was conducted by ANOVA followed by Bonferroni's test. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs saline-treated mice; **P* < 0.05; ***P* < 0.01 vs MPTP-treated mice

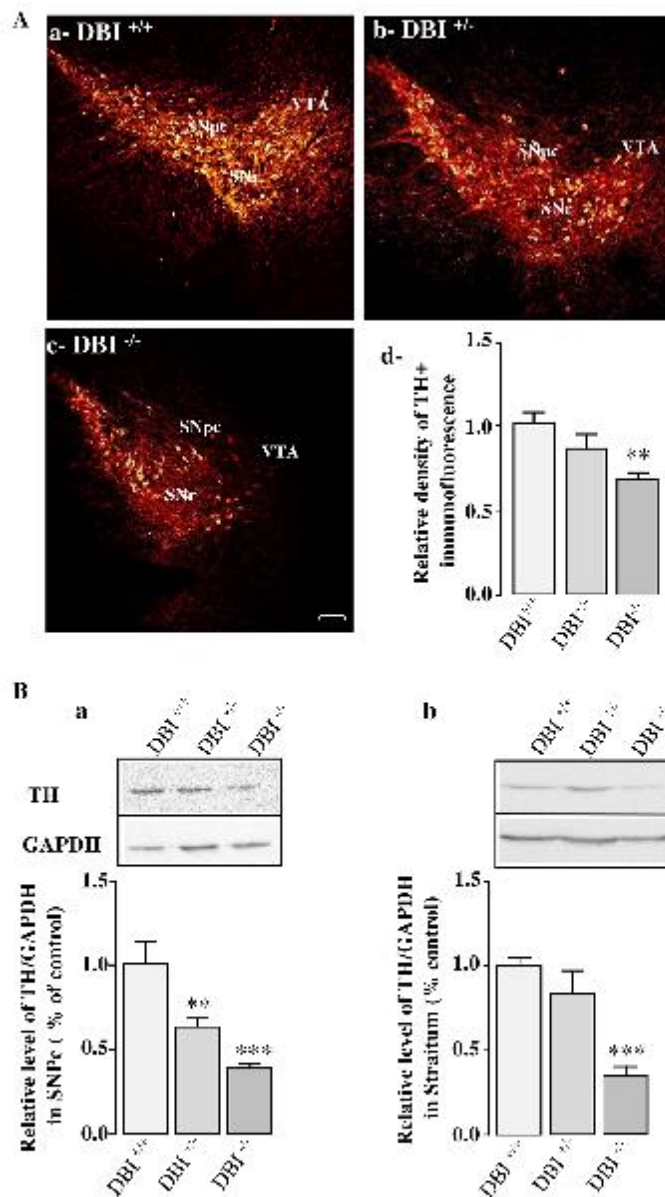


activity, ODN suppressed the effects of MPTP on GFAP, suggesting that the gliopeptide exerts its neuroprotective activity through a modulation of astrocytic activation. This hypothesis is supported by growing evidence showing the pivotal role of reactive astrocytes in the progression of PD, by either protecting or exacerbating DA neuron loss [65, 66, 70]. Although reactive astrocytes in the striatum of PD animal models express a panel of protective antioxidant and neurotrophic factors, they also produce proinflammatory cytokines which can impede neuronal survival [12, 67]. For instance, reactive astrocytes in the SNpc have been reported to overexpress several factors known to promote neuronal damage such as S-100β, iNOS and NF-κB within the first 3 days after MPTP treatment when degeneration of DA neurons is maximum [67, 71, 72]. Consistent with the hypothesis of a harmful-astrocytic status, the present

study shows that the genic expression of the neuroinflammatory markers *IL-1β*, *IL-6* and *Tnf-α* is enhanced in the SNpc of MPTP-treated animals. One difficulty to get a complete view of the mechanisms involved in DA neuron death comes from the fact that some genes such as *IL-1β* are induced within 1 day after MPTP injection while others such as *IL-6* and *TNF-α* are activated a week after administration of the toxin. Interestingly, ODN prevented MPTP-induced increase in expression of these pro-inflammatory mediators, 1 day but also a week after treatment, indicating that the peptide exerts both rapid and sustained effects.

It is well established that increased levels of pro-inflammatory cytokines in PD cause neuronal degeneration by apoptosis through the induction of apoptosis-related factor [67, 73]. It has been previously demonstrated that ODN can regulate the expression of Bcl-2 family members to

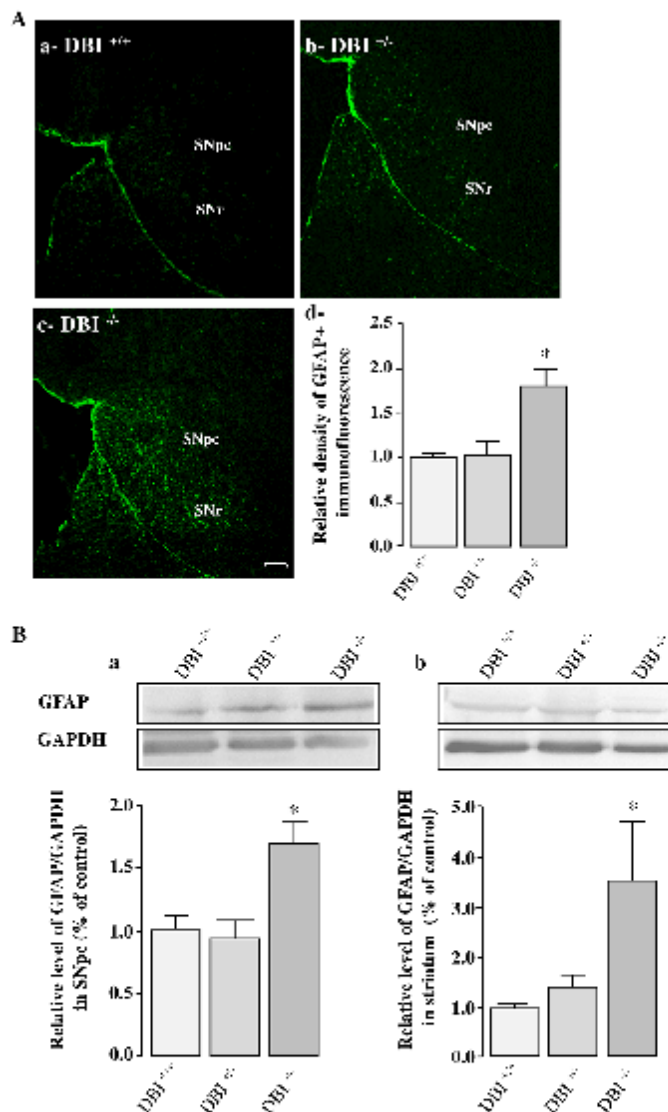
Fig. 7 Effect of DBI gene knockout on MPTP toxicity in mice. **A** Illustration of TH immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta (SNpc) of wild-type (DBI^{+/+}; A-a), DBI heterozygote (DBI^{+/-}; A-b) and DBI KO homozygote (DBI^{-/-}; A-c) mice 7 days after MPTP injection (3 × 10 mg/kg). Scale bar = 100 μm. SNpc (substantia nigra pars compacta), SNr (substantia nigra pars reticulata), VTA (ventral tegmental area). A-d. Relative TH immunofluorescence intensity of surviving DA neurons in the SNpc of DBI^{+/+}, DBI^{+/-} and DBI^{-/-} MPTP-treated mice. **B** Densitometric analysis of TH protein levels in the SNpc (a) and striatum (b) of DBI^{+/+}, DBI^{+/-} and DBI^{-/-} MPTP-treated mice. Digital photographs illustrate the expression of TH after immunoblotting, and graphs display the relative expression of TH protein measured by densitometry and standardized to GAPDH levels. Each value, expressed as percentage of controls, represents the mean ± SEM obtained from nine animals and statistical analysis was conducted by ANOVA followed by Bonferroni's test. ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs DBI^{+/+} mice



prevent apoptotic cell death provoked by oxidative insult in cultured neurons and astrocytes [28, 40, 74]. In agreement with these data, the present study reveals that ODN

decreased MPTP-induced expression of the pro-apoptotic gene *Bax* and suppressed the inhibitory effect of MPTP on the anti-apoptotic gene *Bcl-2*. As a consequence, ODN

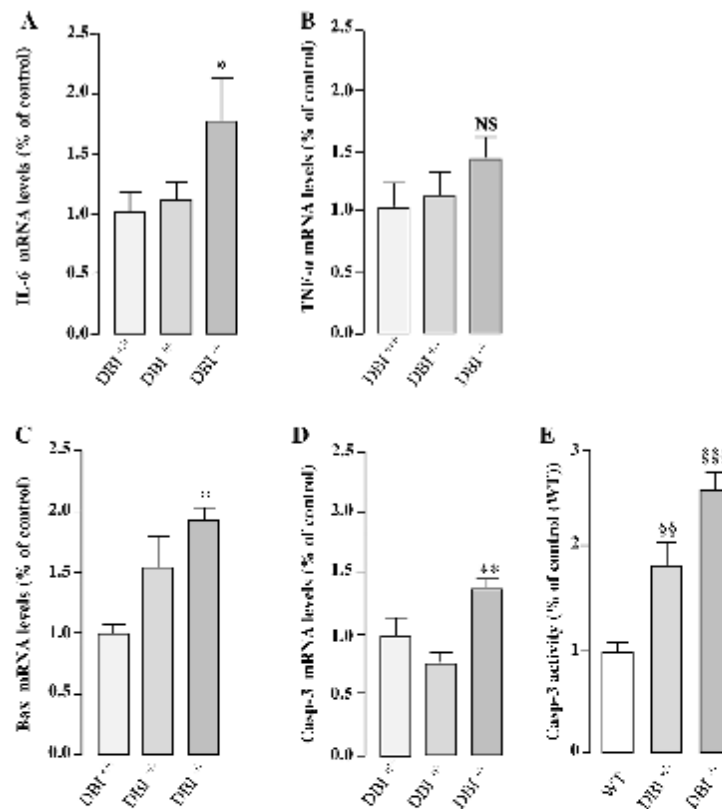
Fig. 8 Effect of DBI gene knockout on astrocytes reactivity evoked by MPTP intoxication. **A** Representative photomicrographs illustrating GFAP immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta (SNpc) of DBI wild-type (DBI^{+/+}; A-a), DBI heterozygote (DBI^{+/-}; A-b) and DBI KO homozygote (DBI^{-/-}; A-c) mice 7 days after MPTP injection (3 x 10 mg/kg). Scale bar = 100 μm. SNpc (substantia nigra pars compacta), SNr (substantia nigra pars reticulata). **A-d** Relative GFAP immunofluorescence quantification in SNpc of DBI^{+/+}, DBI^{+/-} and DBI^{-/-} MPTP-treated mice. **B** Densitometric analysis of the expression of GFAP in SNpc (a) and striatum (b) of DBI^{+/+}, DBI^{+/-} and DBI^{-/-} MPTP-treated mice. Digital photographs illustrate the expression of GFAP protein after immunoblotting and graphs display the relative expression of GFAP protein measured by densitometry and standardized to GAPDH levels. Each value, expressed as percentage of controls, represents the mean ± SEM obtained from nine animals and statistical analysis was conducted by ANOVA followed by Bonferroni's test. **P* < 0.05 vs DBI^{+/+} mice



prevented the stimulatory effect of MPTP on caspase-3 expression and activation. These findings are in accordance with in vitro studies showing that ODN inhibits the mitochondrial intrinsic apoptotic pathway by preventing collapse of the mitochondrial potential and stimulation of caspase-3 activity induced by 6-OHDA in cultured cerebellar granule neurons [28].

ROS are another key player involved in the neurotoxic activity of MPTP [73, 75]. Accordingly, the present study showed that the level of ROS was increased in both the SNpc and striatum of MPTP-treated mice, leading to the formation and accumulation of lipid oxidation products. Interestingly, ODN, which had no significant effect by itself on ROS content and MDA generation, totally suppressed the deleterious

Fig. 9 DBI gene knockout promotes the expression of pro-inflammatory and pro-apoptotic genes in mice. Brain tissues were collected from wild-type (DBI^{+/+}), DBI heterozygote (DBI^{+/-}) and DBI KO homozygote (DBI^{-/-}) mice 7 days after MPTP treatment, and *IL-6* (a), *Tnf- α* (b), *Bax* (c) and *caspase-3* (d) mRNA levels were measured by quantitative RT-PCR. Data were normalized using the *GAPDH* housekeeping gene as an internal control and the results are expressed as a percentage of DBI^{+/+} mice. Caspase-3 activity (e) was assessed by measuring cleavage of the profluorescent caspase-3 substrate, Z-DEVD-R110. Data are mean \pm SEM obtained from nine animals and statistical analysis was conducted by ANOVA followed by the Bonferroni's test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ vs DBI^{+/+} mice, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$ vs wild-type mice



effects of MPTP, i.e., excessive production of ROS and lipid oxidative damages. The fact that ODN is able (1) to increase the level of the major free radical scavenger in the brain, i.e. glutathione (GSH), as well as the expression and activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase, and (2) to prevent inhibition of endogenous ROS defense system under oxidative stress in cultured neuronal cells [28, 41, 74], suggests that the peptide could block ROS overproduction and dampen the oxidative processes through an upregulation of ROS-detoxifying enzymes *in vivo*. Over-expression of the transcription factor NF-E2-related factor (Nrf2), which binds to antioxidant response element [76] to induce antioxidant enzyme expression, has been found to be protective against oxidative damage and to provide neuroprotection in the MPTP mouse model, while reduction of Nrf2/ARE activity is associated with an exacerbation of oxidative assaults and sensitivity to the neurodegenerative effects of MPTP [76]. Furthermore, *in vitro* studies have shown that addition of GSH to the culture medium prevents

degeneration of a human DA cell line induced by MPTP/MPP⁺ [77]. All these data support the hypothesis that the endogenous antioxidant system is involved in the neuroprotective effect of ODN against MPTP-induced DA cell death. Consistent with this notion, it has been reported that inhibition of the endogenous antioxidant system in astrocytes suppresses the cell survival-promoting effect of ODN under oxidative conditions [74]. A possible effect of ODN on the expression of genes involved in the control of oxidative mechanisms in MPTP-treated mice may, thus, be a key player which deserves further investigations.

The intracellular signaling pathways triggering the neuroprotective effect of ODN on MPTP intoxication *in vivo* remains to be fully elucidated. Nevertheless, previous *in vitro* studies indicate that ODN protects both glial cells and cerebellar granule neurons against oxidative stress through activation of the metabotropic receptor of ODN and via a PKC/MAK- or PKA/MAK-dependent mechanism, respectively [28, 40]. In both cell types, ODN increases SOD

and catalase expression and activity, and preserves mitochondrial integrity through inhibition of oxidative stress-induced increase of *Bax* gene expression [22, 41, 42]. It is, thus, conceivable that DA neurons also express the ODN metabotropic receptor and that similar signaling pathways are involved in the protective effect of ODN in vivo.

DBI deficiency increases MPTP sensitivity in mice

Experiments conducted in ACBP/DBI KO mice highlight the ability of DBI and/or its derived peptides to mobilize endogenous defense mechanisms against inflammatory and oxidative insults produced by MPTP, leading to an increase of DA cell death in DBI^{-/-} mice treated with MPTP. Strikingly, the number of nigral TH-positive cells was lower in DBI^{-/-} animals but was not modified in heterozygote mice (DBI^{+/-}). This effect on cell survival correlates well with the observed upregulation of the expression of pro-inflammatory genes, i.e. *Il-6* and *Tnf-α*, and pro-apoptotic genes, i.e. *Bax* and *caspase-3*, in DBI^{-/-} mice treated with MPTP. These findings are in agreement with data showing that, while ODN injection stimulates neurogenesis in the adult mouse brain, DBI silencing with siRNA causes growth arrest and cell death of neural progenitors [39]. In fact, transfection with ACBP/DBI siRNA also leads to growth arrest and apoptosis in various mammalian cell lines [78, 79]. Despite ACBP/DBI deficiency is associated with an increased sensitivity of cell lines to oxidative stress [79], a neuroprotective effect of the DBI precursor polypeptide by itself has never been reported to our knowledge. Since the protective action of ODN is clearly established in vitro on both astrocytes and neurons [28, 40, 41] and since the production and secretion of ODN from astroglial cells is directly correlated with the level of expression of its precursor DBI [44], it appears that the greater sensitivity of ACBP/DBI knockout mice can be specifically ascribed to the absence of the ODN fragment. Such observations, together with studies showing the presence of ODN in several brain structures, including the nigrostriatal region [26, 27], strongly suggest that endogenous ODN may act as an autocrine and/or paracrine trophic factor promoting survival of neuronal cells, and could thus contribute to decrease tissue damages in injury conditions.

In conclusion, the results of the present study reveal that i.c.v. injection of low doses of ODN causes a very strong neuroprotective action against degeneration of DA neurons in MPTP-treated mice. Moreover, DBI^{-/-} mice are more sensitive to MPTP-induced inflammatory and oxidative brain damages, suggesting that endogenous DBI and ODN may also be neuroprotective. Further studies are required to characterize the receptor and the signaling pathways implicated in this neuroprotective effect of ODN, as well as to develop new methods of peptide administration. The current findings indicate that, based on its anti-oxidative,

anti-inflammatory and anti-apoptotic effects, the gliopeptide ODN could lead to the development of effective therapeutic agents for the treatment of cerebral injuries involving oxidative neurodegeneration.

Acknowledgements This work was supported by a France-Tunisia CMCU-Campus France/PHC Utique 16G0820/34940PK exchange program (to Olfa Masmoudi-Kouki and David Vaudry), an Erasmus Mundus Battuta grant from Rouen Normandy University (Erasmus), INSERM (U1239), Normandy Region, an alternance scholarship of Tunisian Higher Education Ministry, the Laboratory of Functional Neurophysiology and Pathology UR/11ES09 and European Union. Europe gets involved in Normandy with Europe Regional Development Fund (ERDF) supporting the PACT-CBS project. Funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Seyma Bahdouli, Ikram Ghouili and Mansour Hmiden were recipients of fellowships from the University of Tunis El Manar and a France-Tunisia exchange program.

References

- Moore O, Kreitzer S, Ehrenfeld M, Giladi N (2005) Quality of life and gender identity in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 112:1511–1522
- Schapira AH (2009) Neurobiology and treatment of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci* 30:41–47
- Chan-Palay V (1991) Alterations in the locus coeruleus in dementias of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 88:625–630
- Gallagher DA, Schapira AH (2009) Etiopathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Curr Top Med Chem* 9:860–868
- Lindholm D, Mikkilä J, DiLiberto V, Mudò G, Belluardo N, Eriksson O, Saarna M (2016) Current disease modifying approaches to treat Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci* 73:1365–1379
- Toulorge D, Schapira AH, Hajj R (2016) Molecular changes in the postmortem parkinsonian brain. *J Neurochem* 1:27–58
- Brundin P, Dave KD, Kordower JH (2017) Therapeutic approaches to target alpha-synuclein pathology. *Exp Neurol* S0014-4886(17):30245
- de Lau LM, Breteler MM (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 5:525–535
- Elbaz A, Moisan F (2008) Update in the epidemiology of Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 21:454–460
- Gordon R, Singh N, Lawana V et al (2016) Protein kinase Cdelta upregulation in microglia drives neuroinflammatory responses and dopaminergic neurodegeneration in experimental models of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 93:96–114
- Deleidi M, Gasser T (2013) The role of inflammation in sporadic and familial Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci* 70:4259–4273
- Schapira AH, Jenner P (2011) Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord* 26:1049–1055
- Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M (2010) Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem* 345:91–104
- Krack P, Batir A, Van Blercom N, Chabardes S, Fraix V, Ardouin C, Koudsie A, Limousin PD, Benazzouz A, LeBas JF, Benabid AL, Pollak P (2003) Five-year follow-up of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med* 349:1925–1934
- Oueslati A, Sgambato-Faure V, Melon C, Kachidian P, Gubellini P, Amri M, Kerkerian-Le Goff L, Salin P (2007) High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus potentiates

- 1-DOPA-induced neurochemical changes in the striatum in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 27:2377–2386
16. Athauda D, Foltynie T (2015) The ongoing pursuit of neuroprotective therapies in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol* 11:25–40
 17. Huot P, Johnston TH, Koprich JB, Fox SH, Brotchie JM (2013) The pharmacology of 1-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Pharmacol Rev* 65:171–222
 18. Carta AR, Mulas G, Bortolanza M, Duarte T, Pillai E, Fisone G, Vozari RR, Del-Bel E (2017) 1-Dopa-induced dyskinesia and neuroinflammation: do microglia and astrocytes play a role? *Eur J Neurosci* 45:73–91
 19. Miyazaki I, Murakami S, Torigoe N, Kitamura Y, Asanuma M (2016) Neuroprotective effects of levetiracetam target α CT in astrocytes in parkinsonian mice. *J Neurochem* 136:194–204
 20. Sidorova YA, Saarma M (2016) Glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands and their therapeutic potential. *Mol Biol* 50:589–598
 21. Nam JH, Park ES, Won SY, Lee YA, Kim KI, Jeong JY, Baek JY, Cho EJ, Jin M, Chung YC, Lee BD, Kim SH, Kim EG, Byun K, Lee B, Woo DH, Lee CJ, Kim SR, Bok E, Kim YS, Ahn TB, Ko HW, Brahmachari S, Pletinkova O, Troconso JC, Dawson VL, Dawson TM, Jin BK (2015) TRPV1 on astrocytes rescues nigral dopamine neurons in Parkinson's disease via CNTF. *Brain* 138:3610–3622
 22. Huang J, Chen C, Gu H, Li C, Fu X, Jiang M, Sun H, Xu J, Fang J, Jin L (2016) Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor reduces cell apoptosis via upregulating GRP78 in SH-SY5Y cells. *Cell Biol Int* 40:803–811
 23. Butterworth RF, Tonon MC, Desy L, Giguere JF, Vaudry H, Pelletier G (1991) Increased brain content of the endogenous benzodiazepine receptor ligand, octadecaneuropeptide (ODN), following portacaval anastomosis in the rat. *Peptides* 12:119–125
 24. Malagon M, Vaudry H, Van Strien F, Pelletier G, Gracia-Navarro F, Tonon MC (1993) Ontogeny of diazepam-binding inhibitor-related peptides (endozepines) in the rat brain. *Neuroscience* 57:777–786
 25. Rouet-Smith F, Tonon MC, Pelletier G, Vaudry H (1992) Characterization of endozepine-related peptides in the central nervous system and in peripheral tissues of the rat. *Peptides* 13:1219–1225
 26. Tonon MC, Desy L, Nicolas P, Vaudry H, Pelletier G (1990) Immunocytochemical localization of the endogenous benzodiazepine ligand octadecaneuropeptide (ODN) in the rat brain. *Neuropeptides* 15:17–24
 27. Yanase H, Shimizu H, Yamada K, Iwanaga T (2002) Cellular localization of the diazepam binding inhibitor in glial cells with special reference to its coexistence with brain-type fatty acid binding protein. *Arch Histol Cytol* 65:27–36
 28. Kaddour H, Hamdi Y, Vaudry D, Basille M, Desruets L, Leprince J, Castel H, Vaudry H, Tonon MC, Amri M, Masmoudi-Kouki O (2013) The octadecaneuropeptide ODN prevents 6-hydroxy dopamine-induced apoptosis of cerebellar granule neurons through a PKC-MAPK-dependent pathway. *J Neurochem* 125:620–633
 29. Alho H, Bovolin P, Jenkins D, Guidotti A, Costa E (1989) Cellular and subcellular localization of an octadecaneuropeptide derived from diazepam binding inhibitor: immunohistochemical studies in the rat brain. *J Chem Neuroanat* 2:301–318
 30. Ferrero P, Santi MR, Conti-Tronconi B, Costa E, Guidotti A (1986) Study of an octadecaneuropeptide derived from diazepam binding inhibitor (DBI): biological activity and presence in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:827–831
 31. Neess D, Bek S, Bloksgaard M, Marcher AB, Faergeman NJ, Mandrup S (2013) Delayed hepatic adaptation to weaning in ACBP^{-/-} mice is caused by disruption of the epidermal barrier. *Cell Rep* 5:1403–1412
 32. Rose TM, Schultz ER, Todaro GJ (1992) Molecular cloning of the gene for the yeast homolog (ACB) of diazepam binding inhibitor/endozepine/acyl-CoA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11287–11291
 33. Tonon MC, Leprince J, Morin F, Gandolfo P, Compère V, Pelletier G, Malagon M, Vaudry H (2013) Endozepines. In: Kastin AJ (ed) *Handbook of biological active peptides*, 2nd edn. Elsevier, Oxford, UK, pp 760–765
 34. de Males-Verchere JG, Leprince J, Tonon MC, Vaudry H, Costentin J (2001) The octadecaneuropeptide [diazepam-binding inhibitor (33–50)] exerts potent anorexigenic effects in rodents. *Eur J Pharmacol* 414:225–231
 35. do Rego JC, Orta MH, Leprince J, Tonon MC, Vaudry H, Costentin J (2007) Pharmacological characterization of the receptor mediating the anorexigenic action of the octadecaneuropeptide: evidence for an endozepinergic tone regulating food intake. *Neuropsychopharmacology* 32:1641–1648
 36. Gach K, Belkacemi O, Lefranc B, Perlikowski P, Masson J, Walet-Balieu ML, do Rego JC, Galas L, Schapman D, Lamtahi R, Tonon MC, Vaudry D, Chuquet J, Leprince J (2015) Detection, characterization and biological activities of [bisphospho-thr3,9] ODN, an endogenous molecular form of ODN released by astrocytes. *Neuroscience* 290:472–484
 37. Lanfray D, Arthaud S, Ouellet J, Compère V, do Rego JL, Leprince J, Lefranc B, Castel H, Bouchard C, Monge-Roffarello B, Richard D, Pelletier G, Vaudry H, Tonon MC, Morin F (2013) Gliotransmission and brain glucose sensing: critical role of endozepines. *Diabetes* 62:801–810
 38. Bouyakdan K, Taib B, Budry L, Zhao S, Rodaros D, Neess D, Mandrup S, Faergeman NJ, Alquier T (2015) A novel role for central ACBP/DBI as a regulator of long-chain fatty acid metabolism in astrocytes. *J Neurochem* 133:253–265
 39. Alfonso J, Le Magueresse C, Zuccotti A, Khodosevich K, Monyer H (2012) Diazepam binding inhibitor promotes progenitor proliferation in the postnatal SVZ by reducing GABA signaling. *Cell Stem Cell* 10:76–87
 40. Hamdi Y, Kaddour H, Vaudry D, Bahdoudi S, Douiri S, Leprince J, Castel H, Vaudry H, Tonon MC, Amri M, Masmoudi-Kouki O (2012) The octadecaneuropeptide ODN protects astrocytes against hydrogen peroxide-induced apoptosis via a PKA/MAPK-dependent mechanism. *PLoS One* 7:e42498. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042498>
 41. Hamdi Y, Kaddour H, Vaudry D, Douiri S, Bahdoudi S, Leprince J, Castel H, Vaudry H, Amri M, Tonon MC, Masmoudi-Kouki O (2012) The stimulatory effect of the octadecaneuropeptide ODN on astroglial antioxidant enzyme systems is mediated through a GPCR. *Front Endocrinol* 3:138. <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00138>
 42. Hamdi Y, Kaddour H, Vaudry D, Leprince J, Zarrouk A, Hammami M, Vaudry H, Tonon MC, Amri M, Masmoudi-Kouki O (2015) Octadecaneuropeptide ODN prevents hydrogen peroxide-induced oxidative damage of biomolecules in cultured rat astrocytes. *Peptides* 71:56–65
 43. Clavier T, Tonon MC, Foutel A, Besnier E, Lefèvre-Scelles A, Morin F, Gandolfo P, Tuech JJ, Quillard M, Veber B, Dureau B, Castel H, Compère V (2014) Increased plasma levels of endozepines, endogenous ligands of benzodiazepine receptors, during systemic inflammation: a prospective observational study. *Crit Care* 18:633. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0633-7>
 44. Ghouli I, Bahdoudi S, Morin F, Amri F, Hamdi Y, Coly PM, Walet-Balieu M-L, Leprince J, Zekri S, Vaudry H, Vaudry D, Castel H, Amri M, Tonon M-C, Masmoudi-Kouki O (2017) Endogenous Expression of ODN-related peptides in astrocytes contributes to cell protection against oxidative stress: astrocyte-neuron crosstalk relevance for neuronal survival. *Mol Neurobiol*. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0630-3>
 45. Grondin R, Bedard PJ, Hadj Tahar A, Gergoire L, Mori A, Kase H (1999) Antiparkinsonian effect of a new selective adenosine

Neuroprotective effects of the gliopeptide ODN in an in vivo model of Parkinson's disease

A2A receptor antagonist in MPTP-treated monkeys. *Neurology* 52:1673–1677

46. Gubellini P, Kachidian P (2015) Animal models of Parkinson's disease: an updated overview. *Rev Neurol* 171:750–761

47. Segura-Aguilar J, Paris I, Muñoz P (2016) The need of a new and more physiological preclinical model for Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci* 73:1381–1382

48. German DC, Dubach M, Askari S, Speciale SG, Bowden DM (1988) 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonian syndrome in *Macaca fascicularis*: which midbrain dopaminergic neurons are lost? *Neuroscience* 24:161–174

49. Cho KL, Searle K, Webb M, Yi H, Ferreira PA (2012) Ranbp2 haploinsufficiency mediates distinct cellular and biochemical phenotypes in brain and retinal dopaminergic and glia cells elicited by the Parkinson neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Cell Mol* 69:3511–3527

50. Bajpai P, Sangar MC, Singh S, Tang W, Bansal S, Chowdhury G, Cheng Q, Fang JK, Martin MV, Guengerich FP, Avadhani NG (2013) Metabolism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by mitochondrion-targeted cytochrome P450 2D6: implications in Parkinson disease. *J Biol Chem* 288:4436–4451

51. Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD (1990) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54:823–827

52. Shang T, Kotamraju S, Kalivendi SV, Hillard CJ, Kalyanaraman B (2004) 1-Methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptosis in cerebellar granule neurons is mediated by transferrin receptor iron-dependent depletion of tetrahydrobiopterin and neuronal nitric oxide synthase-derived superoxide. *J Biol Chem* 279:19099–19112

53. Yamada M, Kida K, Amatuhare W, Ichinose F, Kaneki M (2010) Gene disruption of caspase-3 prevents MPTP-induced Parkinson's disease in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 402:312–318

54. Neess D, Bloksgaard M, Bek S, Marcher AB, Elle JC, Helledie T, Due M, Pagmantidis V, Finsen B, Wilbertz J, Kruhoffer M, Faergeman N, Mandrup S (2011) Disruption of the acyl-CoA-binding protein gene delays hepatic adaptation to metabolic changes at weaning. *J Biol Chem* 286:3460–3472

55. Haley TJ, McCormick WG (1957) Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse. *Br J Pharmacol Chemother* 12:12–15

56. Jackson-Lewis V, Przedborski S (2007) Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nat Protoc* 2:141–151

57. Park J, Lim CS, Seo H, Park CA, Zhuo M, Kuang BK, Lee K (2015) Pain perception in acute model mice of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Mol Pain* 11:28. <https://doi.org/10.1186/s12990-015-0026-1>

58. El Massri N, Johnstone DM, Peoples CL, Moro C, Reinhart F, Torres N, Stone J, Benabid AL, Mitrofanis J (2016) The effect of different doses of near infrared light on dopaminergic cell survival and gliosis in MPTP-treated mice. *Int J Neurosci* 126:76–87

59. Episcopo FL, Tirolo C, Testa N, Camiglia S, Morale MC, Marchetti B (2013) Reactive astrocytes are key players in nigrostriatal dopaminergic neurorepair in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: focus on endogenous neurorestoration. *Curr Aging Sci* 6:45–55

60. Arya A, Meena R, Sethy NK, Das M, Sharma M, Bhargava K (2015) NAP (davunetide) protects primary hippocampus culture by modulating expression profile of antioxidant genes during limiting oxygen conditions. *Free Radic Res* 49:440–452

61. Busciglio J, Pelsman A, Helguera P, Ashur-Fabian O, Pinhasov A, Brenneman DE, Gozes I (2007) NAP and ADNF-9 protect normal and Down's syndrome cortical neurons from oxidative damage and apoptosis. *Curr Pharm Des* 13:1091–1098

62. Gozes I, Divinski I (2004) The femtomolar-acting NAP interacts with microtubules: novel aspects of astrocyte protection. *J Alzheimers Dis* 6:S37–S41

63. Zamostiano R, Pinhasov A, Bassan M, Peri O, Steingart RA, Atlas R, Brenneman DE, Gozes I (1999) A femtomolar-acting neuroprotective peptide induces increased levels of heat shock protein 60 in rat cortical neurons: a potential neuroprotective mechanism. *Neurosci Lett* 264:9–12

64. Qin L, Block ML, Liu Y, Bienstock RJ, Pei Z, Zhang W, Wu X, Wilson B, Burka T, Hong JS (2005) Microglial NADPH oxidase is a novel target for femtomolar neuroprotection against oxidative stress. *FASEB J* 19:550–557

65. Chen LW, Yang KL, Chan YS (2005) Reactive astrocytes as potential manipulation targets in novel cell replacement therapy of Parkinson's disease. *Curr Drug Targets* 6:821–833

66. Sun XL, Chen BY, Duan L, Xia Y, Luo ZJ, Wang JJ, Rao ZR, Chen LW (2014) The proform of glia cell line-derived neurotrophic factor: a potentially biologically active protein. *Mol Neurobiol* 49:234–250

67. Aoki E, Yano R, Yokoyama H, Kato H, Araki T (2009) Role of nuclear transcription factor kappa B (NF-kappaB) for MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)-induced apoptosis in nigral neurons of mice. *Exp Mol Pathol* 86:57–64

68. Chen LW, Wei LC, Qiu Y, Liu HL, Rao ZR, Ju G, Chan YS (2002) Significant up-regulation of nestin protein in the neostriatum of MPTP-treated mice. Are the striatal astrocytes regionally activated after systemic MPTP administration? *Brain Res* 925:9–17

69. Watanabe Y, Kato H, Araki T (2008) Protective action of neuronal nitric oxide synthase inhibitor in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Metab Brain Dis* 23:51–69

70. McGeer PL, McGeer EG (2008) Glial reactions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 23:474–483

71. Kato H, Kurosaki R, Oki C, Araki T (2004) Arundic acid, an astrocyte-modulating agent, protects dopaminergic neurons against MPTP neurotoxicity in mice. *Brain Res* 1030:66–73

72. Muramatsu Y, Kurosaki R, Watanabe H, Michimata M, Matsubara M, Imai Y, Araki T (2003) Expression of S-100 protein is related to neuronal damage in MPTP-treated mice. *Glia* 42:307–313

73. Sun XL, Chen BY, Zhao HK, Cheng YY, Zheng MH, Duan L, Jiang W, Chen LW (2016) Gas1 up-regulation is inducible and contributes to cell apoptosis in reactive astrocytes in the substantia nigra of LPS and MPTP models. *J Neuroinflamm* 13:180. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0643-2>

74. Hamdi Y, Masmoudi-KParkouki O, Kaddour H, Belhadj F, Gandolfo P, Vaudry D, Mokni M, Leprince J, Hachem R, Vaudry H, Tonon MC, Amri M (2011) Protective effect of the octadecaneuropeptide on hydrogen peroxide-induced oxidative stress and cell death in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 118:416–428

75. Mudd G, Mäkelä J, Di Liberto V, Tælykh TV, Olivieri M, Piepponen P, Eriksson O, Malkit A, Bonomo A, Kairisalo M, Aguirre JA, Korhonen L, Belluardo N, Lindholm D (2012) Transgenic expression and activation of PGC-1 α protect dopaminergic neurons in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci* 69:1153–1165

76. Chen PC, Vargas MR, Pani AK, Smeyne RJ, Johnson DA, Kan YW, Johnson JA (2009) Nrf2-mediated neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: critical role for the astrocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(8):2933–2938

77. Efremova L, Schildknecht S, Adam M, Pape R, Guthier S, Hanf B, Burkle A, Leist M (2015) Prevention of the degeneration of human dopaminergic neurons in an astrocyte co-culture system allowing endogenous drug metabolism. *Br J Pharmacol* 172:4119–4132

78. Faergeman NJ, Knudsen J (2002) Acyl-CoA binding protein is an essential protein in mammalian cell lines. *Biochem J* 368:679–682

79. Shin SW, Yun SH, Park ES, Jeong JS, Kwak JY, Park JI (2015) Overexpression of PGC1 α enhances cell proliferation and tumorigenesis of HEK293 cells through the upregulation of Sp1 and Acyl-CoA binding protein. *Int J Oncol* 46:1328–1342

Discussion

Les travaux de recherche menés dans cette thèse avaient pour but d'explorer l'effet protecteur potentiel du peptide ODN face aux processus qui mènent à la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNpc dans un modèle expérimental murin de la MP induit avec du MPTP. Nos travaux montrent que l'injection par voie i.c.v d'une faible dose d'ODN (10 ng/10 μ l) est capable de contrecarrer les effets délétères du MPTP sur les corps cellulaires des neurones dopaminergiques de la SNpc et leurs prolongements vers le striatum, ainsi que les dommages cellulaires oxydatif et neuroinflammatoire. La suite de ce travail a été d'évaluer le rôle endogène de l'ODN chez des animaux déficients (KO) pour le gène du précurseur de l'ODN (le DBI) en utilisant des animaux DBI KO. Les résultats ont révélé que les souris DBI KO présentent une plus grande vulnérabilité aux effets neurotoxiques du MPTP avec une augmentation des marqueurs de souffrance cellulaire et tissulaire chez les animaux homozygotes DBI^{-/-} comparé aux hétérozygotes DBI^{+/-} et homozygotes DBI^{+/+} ; mettant en évidence le rôle neuroprotecteur de l'ODN endogène contre la dégénérescence neuronale.

1. L'ODN prévient chez la souris la perte des neurones dopaminergiques de la SNpc induite par le traitement au MPTP

Le modèle de souris parkinsoniennes a été obtenu par 3 injections intrapéritonéales de MPTP (20 mg/kg/injection) espacées de 2 h. Dans ces conditions, ce composé induit une dégénérescence neuronale rétrograde et progressive au niveau de la SN qui conduit, en une semaine, à la perte de plus de 60% des neurones dopaminergiques (Noelker *et al.* 2014). En accord avec les données de la littérature, nous avons observé, par immunohistochimie, une déplétion en neurones positivement marqués par des anticorps dirigés contre la tyrosine hydroxylase (TH) ; enzyme impliquée dans la transformation de la tyrosine en dopamine, dans la SNpc et le striatum chez les souris traitées au MPTP (Nagane *et al.* 2009). Sur ce modèle animal, nous avons

observé que l'injection d'une seule dose d'ODN (10 ng) par voie i.c.v, 1 h après la dernière administration de MPTP, prévient la mort des neurones dopaminergiques de la SN et la dégénérescence des fibres nerveuses dopaminergiques dans le striatum (mis en évidence en utilisant les techniques d'immunofluorescence et d'imagerie confocale à l'aide d'un anticorps dirigé contre la TH). L'ODN contrecarre également la diminution, induite par le MPTP, des taux d'ARNm (par PCR quantitative) et de protéines (par Western blot) codant la TH, dans la SNpc et le striatum. Ces premiers résultats confortent l'hypothèse selon laquelle l'administration de faible dose d'ODN (10 ng/10 μ L) permet de compenser la vulnérabilité des neurones dopaminergiques au MPTP. Cela concorde avec les études *in vitro* montrant que l'ODN protège les neurones granulaires du cervelet contre la mort apoptotique induite par la 6-OHDA, neurotoxine largement utilisée dans les modèles cellulaires et animaux de la MP (Kaddour *et al.* 2013). Sur les cellules en culture, cette action neuroprotectrice de l'ODN est obtenue pour des concentrations picomolaires et s'atténue progressivement pour de plus fortes concentrations (comprises entre 10^{-11} et 10^{-8} M). De plus, la mesure par LC-MS/MS quantitative indique que la quantité d'ODN détectée dans du milieu conditionné glial (issu d'astrocytes natifs ou activés par le stress oxydant) est dans la même gamme de concentrations que celle nécessaire à l'action neuroprotectrice du peptide sur les neurones en grain contre la mort apoptotique induite par des lésions oxydatives (Ghouili *et al.* 2017) (Figure 16). Comme c'est le cas avec l'ODN, d'autres peptides d'origine astrocytaire, *i.e.* l'ADNF, l'ADNP et l'ANP, ne préviennent la mort neuronale induite par différents agents neurotoxiques ou lésions cérébrales qu'à des concentrations subfentomolaires (Dejda *et al.* 2005, Busciglio *et al.* 2007). L'ensemble de ces données indique que l'ODN, spécifiquement produit par les cellules astrogliales dans le cerveau (Compere *et al.* 2006, Tonon *et al.* 1990) exerce *via* un mécanisme de type paracrine une puissante activité neuroprotectrice.

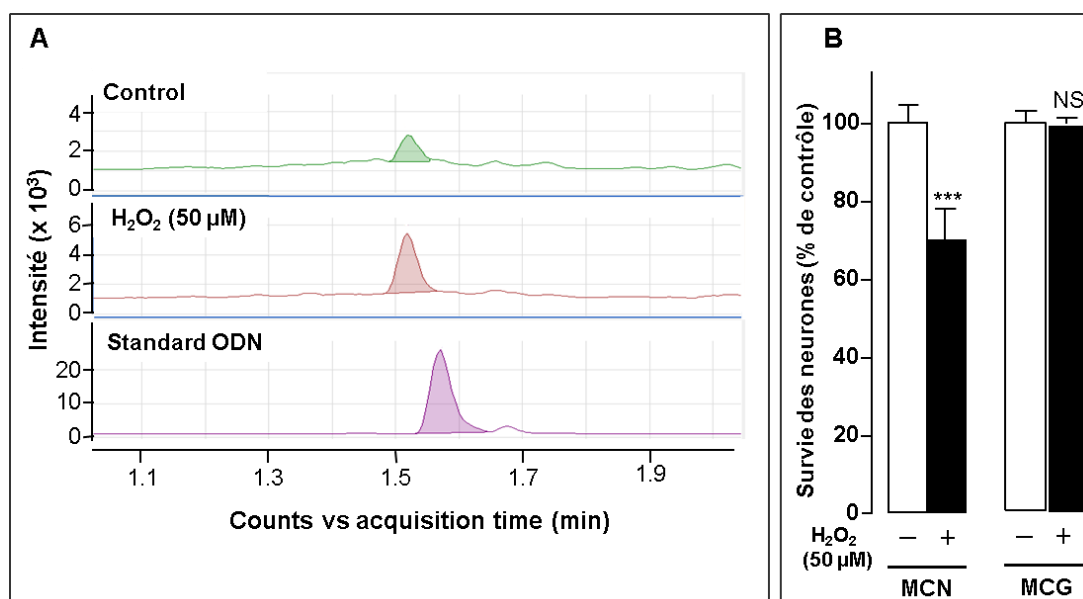


Figure 17 : A. Identification de la nature moléculaire des peptides de la famille de l'ODN secrétés dans les surnageants de cultures d'astrocytes natifs ou activés par le stress oxydant à l'aide d'un système UPLC couplé à un spectromètre de masse 6490 ESI (+) - triple quad. Les astrocytes en culture ont été traités en absence ou en présence de H₂O₂ (50 μM) pendant 6 h, les surnageants de culture sont ensuite récoltés pour l'analyse par LC-MS/MS. La mesure quantitative de l'ODN a été évaluée en mode MRM (Mouvement de réaction multiple) pour suivre les transitions majoritaires : ODN (m / z 638.01 → 756.90) et les données ont été analysées à l'aide des logiciels d'analyse qualitative et quantitative MassHunter B.06 (Agilent Technologies). **B. Effet neuroprotecteur du milieu conditionné astogliale enrichi en ODN** sur des neurones en grain du cervelet cultivés dans un milieu neuronal seul (MCN) ou un milieu neuronal conditionné par des astrocytes activés par du H₂O₂ (MCG), et incubés en absence ou présence de H₂O₂ (50 μM, 1h). Le MCG enrichi en ODN prévient la mort des neurones induite par le H₂O₂. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage du contrôle (+ S.E.M., n=4). ****p*<0.001 ; NS, non significatif *versus* contrôle.

L'ODN exerce ses activités biologiques en interagissant avec 2 classes de récepteurs, le récepteur des benzodiazépines CBR et un récepteur métabotrope (Compere *et al.* 2006, Tonon M. C. *et al.* 2006, Tonon *et al.* 2013b). Les expériences consistant à utiliser des antagonistes et/ou agonistes spécifiques de ces 2 types de récepteurs n'ont pas été réalisées, mais seraient certainement intéressantes, et pourraient montrer une protection relayée par l'activation du récepteur métabotrope. En effet, la protection apportée *in vitro*, contre la neurotoxicité de la 6-OHDA, est dépendante de

la seule activité du récepteur métabotrope de l'ODN. Le cyclo₁₋₈ [DLeu⁵]OP, antagoniste du récepteur métabotrope de l'ODN, atténue de manière très significative l'effet protecteur du milieu conditionné astroglial (enrichi en ODN) contre un stress oxydatif létal (Ghouili *et al.* 2017). Une activité de l'ODN *via* le récepteur métabotrope, a déjà été observée *in vivo* dans la modulation de l'activité des neurones hypothalamiques, chez le rat (Compere *et al.* 2004, 2005). Il semble donc que dans le modèle de souris de la MP, l'activation ce même récepteur conduit aux effets bénéfiques de l'ODN contre la neurotoxicité du MPTP. Cette hypothèse pourrait-être appuyée par les études de liaison réalisées sur des cellules granulaires cérébrales montrant que l'ODN, à de faibles concentrations (~ nanomolaires), est incapable de déplacer les ligands des CBR de leurs sites de liaison (Ferrero *et al.* 1986, Guidotti *et al.* 1983). Dans le présent travail, nous montrons que l'ODN prévient la mort des neurones dopaminergiques de la SNpc, à de très faibles doses, ce qui écarte une interaction de l'ODN avec les CBR.

2. Identification des mécanismes cellulaires impliqués dans l'effet neuroprotecteur de l'ODN dans un modèle murin de la MP

2.1. Rôle antioxydant de l'ODN

Les effets neurotoxiques du MPTP sont principalement liés à la production de ROS hautement toxiques qui peuvent engendrer des dommages cellulaires irréversibles, atteignant les constituants cellulaires, *i.e.* lipides, protéines et ADN/ARN (Bove and Perier 2012, Chen *et al.* 2009, Sun *et al.* 2016). Ainsi, la présente étude montre une augmentation des taux de ROS dans la SN et le striatum de souris traitées au MPTP, associée à une accumulation de produits d'oxydation des lipides, MDA. L'ODN, qui ne présente pas d'activité intrinsèque sur la production de ROS et la formation de MDA, supprime totalement les dommages oxydatifs du MPTP sur les neurones dopaminergiques de la région nigrostriée. Cette action protectrice de l'ODN contre les

dommages oxydatifs *in vivo*, pourrait être relayée par sa capacité à stimuler *i)* la biosynthèse du GSH à la fois au niveau des astrocytes et des neurones (Kaddour *et al.* 2013, Hamdi *et al.* 2012b) et *ii)* l'expression et l'activité des enzymes antioxydantes dans les astrocytes en culture (Hamdi *et al.* 2012b). Grâce à ses propriétés antioxydantes, l'ODN supprime les effets du stress oxydatif sur l'accumulation intracellulaire de ROS, l'altération du système antioxydant endogène et l'oxydation des constituants cellulaires (Hamdi *et al.* 2012a, Hamdi *et al.* 2012b, Hamdi *et al.* 2015), alors que le blocage pharmacologique de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD et catalase) abolit l'effet protecteur de l'ODN sur la survie des astrocytes cultivés en conditions de stress oxydatif létal (Hamdi *et al.* 2011) (Figure 17).

Une diminution du taux cérébral en GSH, SOD et catalase a été retrouvée chez la souris intoxiquée par du MPTP (Lv *et al.* 2015, Meng *et al.* 2017). Alors que, l'activation du facteur de transcription Nrf2, impliqué dans l'expression de gènes codant des enzymes de détoxification antioxydante, s'oppose aux effets cytotoxiques du MPTP sur des modèles cellulaires de la MP (Kaidery *et al.* 2013, Lv *et al.* 2015, Meng *et al.* 2017, Moreira *et al.* 2017). En particulier la surexpression de Nrf2 dans les astrocytes, chez la souris transgénique, protège les neurones dopaminergiques de la SNpc contre la neurotoxicité du MPTP (Gan *et al.* 2012) (Chen *et al.* 2009). L'ensemble de ces données renforce donc l'idée que l'action stimulatrice de l'ODN sur le système antioxydant endogène astrocytaire pourrait, du moins en partie, être responsable des effets protecteurs de ce gliopéptide contre la toxicité oxydative du MPTP sur les neurones dopaminergiques de la SNpc.

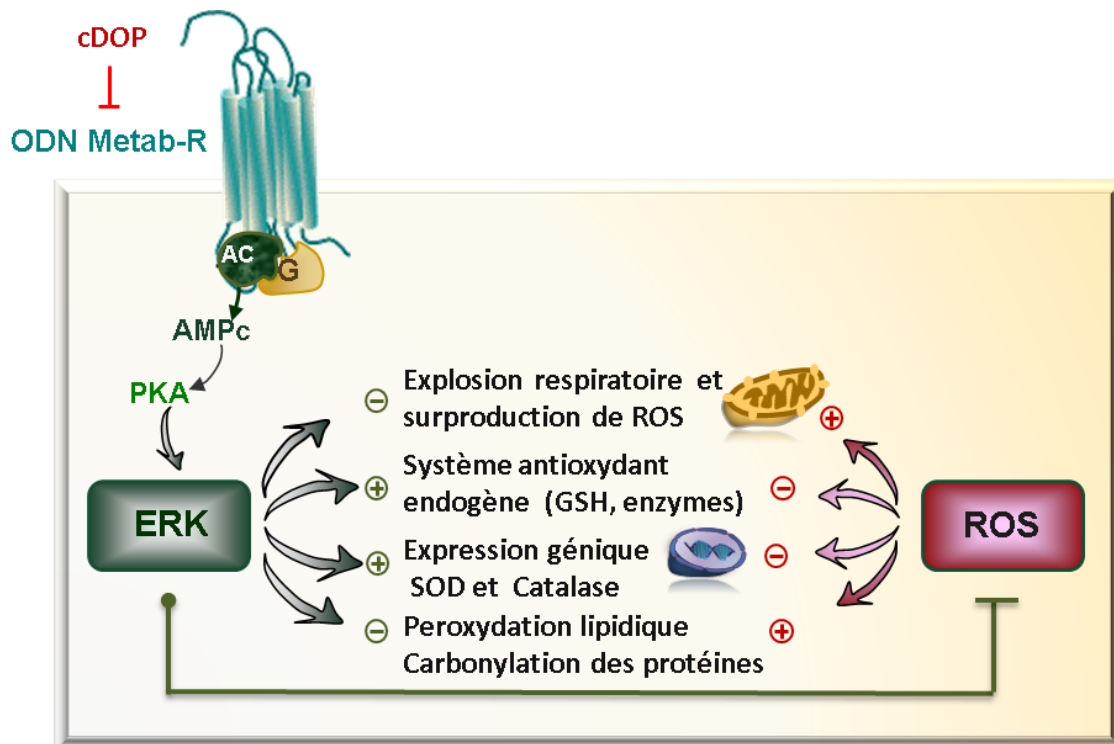


Figure 18 : Effet antioxydant de l'ODN dans les cellules nerveuses. L'ODN en activant son récepteur métabotrope (ODN Metab-R) positivement couplé à la voie AC/AMPC et PKA, stimule la phosphorylation des ERK1/2. Plus en aval, l'activation de la voie PKA/ERK maintient le fonctionnement de la chaîne respiratoire, prévient l'accumulation intracellulaire de ROS, augmente la biosynthèse de GSH et stimule l'activité des enzymes antioxydantes SOD et catalase, ainsi que leur expression. Ces effets de l'ODN sur le système antioxydant endogène empêchent l'action délétère du stress cellulaire oxydant, causée par la surproduction de ROS, sur l'activité mitochondriale, la défense antioxydante et la structure des constituants cellulaires. Le cyclo₁₋₈[Dleu⁵] OP (cDOP), antagoniste spécifique du récepteur métabotrope de l'ODN bloque cette action antioxydante de l'ODN.

2.2. Rôle anti-inflammatoire et anti-apoptotique de l'ODN

Une augmentation significative de l'expression de la GFAP, témoignant d'une activation des astrocytes, est observée dans la SN et le striatum de cerveaux *post-mortem* de patients atteints de la MP (Hirsch *et al.* 2003a) et de souris intoxiquées par le MPTP (Hirsch *et al.* 2003a, Hirsch and Hunot 2009, Hirsch *et al.* 2012, McGeer and McGeer 2008). Les données de la littérature montrent à la fois des effets neurotoxiques et neuroprotecteurs pour ce qui concerne les astrocytes réactifs (F *et al.* 2010, Rappold and Tieu 2010, Sidoryk-Wegrzynowicz *et al.* 2011, Sofroniew 2009). Le rôle des astrocytes

réactifs dans la survie ou la mort des neurones est fonction de la région cérébrale concernée ainsi que du degré de l'astrogliose, n'excluant pas que des astrocytes exercent des effets neuroprotecteurs notamment dans les premières phases du développement de la maladie (McGeer and McGeer 2008, Mena *et al.* 2002, Vivekanantham *et al.* 2015). Chez la souris traitée au MPTP, les astrocytes dans la SNpc deviennent fortement réactifs dès la 5^{ème} heure qui suit l'administration de MPTP et ce jusqu'au 21^{ème} jour de traitement (Aoki *et al.* 2009, Watanabe *et al.* 2008). Ces données suggèrent que l'induction de l'astrogliose réactionnelle va exacerber l'effet du MPTP sur les neurones dopaminergiques de la SNpc *via* notamment la production de facteurs pro-inflammatoires (Hartmann *et al.* 2003, Hirsch *et al.* 2003a). De fait, nous avons montré, par PCR quantitative, que le MPTP induit une augmentation rapide (+62%) et transitoire (1 jour) des ARNm codant l'IL-1 β , confirmant le statut néfaste des astrocytes réactifs. Cet état nocif de l'astrogliose réactionnelle persiste jusqu'au septième jour après le traitement par le MPTP, où les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α se retrouvent surexprimées dans la SN. Il est intéressant de noter que l'ODN, prévient la surexpression de GFAP dans la SN et l'élévation des taux d'ARNm codant les médiateurs de l'inflammation, dès le premier jour de traitement mais aussi encore après une semaine, ce qui indique que le peptide exerce à la fois des effets rapides et soutenus.

Le stress oxydatif, l'induction d'une astrogliose importante et la réponse inflammatoire sont délétères pour les neurones et conduisent à l'activation du processus de mort par apoptose (Bove and Perier 2012, Mogi *et al.* 1996b, Mogi *et al.* 2007, Sun *et al.* 2016). Il est clairement établi que l'augmentation des ROS et l'activation du facteur NF-kappa B dans les neurones dopaminergiques de la SNpc par le MPTP sont responsables de l'activation de la voie apoptotique mitochondriale intrinsèque (Aoki *et al.* 2009, Miller *et al.* 2011, Schindler and Foley 2013), processus caractérisé par un certain nombre d'altérations de l'activité cellulaire. La surexpression des gènes pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2, la chute du potentiel transmembranaire

mitochondrial et la formation de pores membranaires provoquent le relargage du cyt C de l'espace intermembranaire vers le cytosol (Whittemore *et al.* 1995). Il s'en suit une activation de la caspase-9, puis de la caspase-3, enzyme effectrice de l'apoptose. En accord avec ces données de la littérature, nous confirmons que la mort des neurones dopaminergiques induite par le MPTP présente toutes les caractéristiques d'une mort cellulaire par apoptose, *i.e.* une surexpression du membre pro-apoptotique Bax, associée à une réduction de l'expression du membre antiapoptotique Bcl-2, ainsi qu'une stimulation à la fois de l'expression et de l'activité de la caspase-3. Outre sa capacité à réduire la réactivité astrogliale et la réaction inflammatoire, l'ODN contrecarre aussi les effets du MPTP au niveau de toutes les étapes clés du processus apoptotique. Ainsi, le peptide prévient l'action du MPTP sur la répression de Bcl-2 et l'augmentation du taux des ARNm codant Bax, et bloque totalement son effet sur l'activation de la caspase-3. Ces résultats *in vivo* concordent avec ceux retrouvés *in vitro* sur les neurones où l'ODN, à des doses picomolaires, abolit les effets de la 6-OHDA sur la chute du potentiel mitochondrial et la stimulation de l'activité des caspases-3/7 (Kaddour *et al.* 2013).

3. L'ODN, un agent neuroprotecteur endogène ?

Lors de la deuxième partie de cette étude, nous avons porté notre intérêt sur le rôle de l'ODN dans l'évolution des processus neurodégénératifs chez des souris dont le gène DBI a été invalidé et traitées par du MPTP. Des études *in vitro* ont établi la capacité de l'ODN endogène à bloquer l'apoptose des astrocytes induite par un stress oxydatif modéré (Ghouili *et al.* 2017), mais le potentiel neuroprotecteur du peptide endogène face à la toxicité oxydative n'a pas encore été étudié *in vivo*.

3.1. Caractéristiques des souris invalidées pour le gène du DBI

L'invalidation du gène du DBI est la conséquence du remplacement d'une partie du gène grâce au système LoxP (pour locus of X-over P1) (Neess *et al.* 2011). En

premier lieu nous avons remarqué que la dose de MPTP (20 mg) utilisée dans nos précédentes études *in vivo* chez les souris sauvages n'est pas tolérée par les souris DBI^{-/-}. Il en a été de même pour la dose de 15 mg/kg (90% de mortalité). La dose de MPTP choisie pour les expériences sur les animaux transgéniques pour le gène DBI a donc été fixée à 10 mg/kg afin d'avoir une bonne viabilité des animaux. La vulnérabilité observée chez les animaux DBI^{-/-} pourrait refléter la délétion des EZs (*e.g.* DBI, ODN) et de la perte de leurs fonctions bénéfiques sur la survie cellulaire (Ghouili *et al.* 2017, Kaddour *et al.* 2013) et le métabolisme lipidique dans le cerveau et le foie (Bouyakdan *et al.* 2015, Neess *et al.* 2011). Par ailleurs, les courbes de poids montrent que les animaux transgéniques DBI^{+/+} et DBI^{+/-} évoluent de la même façon, alors que les animaux DBI^{-/-} présentent une augmentation de poids corporel (Figure 18). Ce gain de poids dans le groupe des souris DBI^{-/-} pourrait s'expliquer par une levée du tonus anorexigène des EZs endogènes. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux rapportés par De Mateos-Verchère (de Mateos-Verchere *et al.* 2001) montrant que l'administration d'ODN (10 ng) durant 15 jours, induit une perte de poids importante chez les rongeurs, et que cette action anorexigène de l'ODN est supprimée par le cyclo₁₋₈[D-Leu⁵]OP qui peut stimuler à lui seul la prise alimentaire (de Mateos-Verchere *et al.* 2001, Leprince *et al.* 2001).

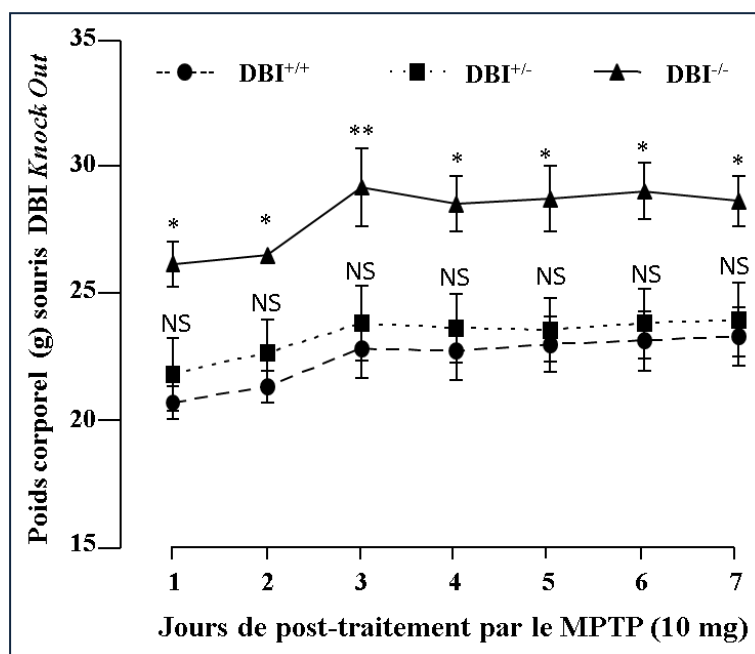


Figure 19 : Variation du poids corporel chez les animaux transgéniques DBI *knock out* traités par le MPTP. Les souris DBI^{+/+}, DBI^{+/-} et DBI^{-/-} ont reçus par voie intra péritonéale 3 doses de MPTP (10 mg/kg). La mesure du poids a été effectuée pendant les 7 jours qui ont suivi le traitement. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; NS, non significatif *versus* souris DBI^{+/+}.

3.2. Effet de la déficience en ODN sur la sensibilité des neurones dopaminergiques de la SNpc vis-à-vis du MPTP

La suite de nos analyses utilisant des animaux transgéniques viennent corroborer l'hypothèse d'un rôle protecteur de l'ODN dans le cadre de maladies neurodégénératives. De fait, les animaux DBI^{-/-} présentent un nombre de cellules positivement marquées à la TH (-31%) ainsi qu'un niveau d'expression du gène (-57%) et de la protéine (-52% dans la SNpc et -60% dans le striatum) codant la TH réduits comparé aux animaux DBI^{+/-} et DBI^{+/+}, qui eux possèdent une densité de cellules TH positives comparables. Cet effet sur la survie des neurones dopaminergiques de la SNpc est associé à une augmentation du nombre de cellules GFAP⁺ et donc à une réactivité gliale accrue chez les animaux DBI^{-/-}. Les résultats ont également révélé une corrélation positive entre la déficience du gène du DBI et les marqueurs de souffrance cellulaire. Ainsi les animaux DBI^{-/-} traités au MPTP présentent des taux d'expression plus élevés

pour les gènes pro-inflammatoires (IL-6 : +78% et TNF- α : +88%) et pro-apoptotiques (Bax: +57% et caspase-3: +37%) que les animaux DBI^{+/-} et DBI^{+/+}. Ces données suggèrent que l'abolition du tonus endozépinergique chez les animaux DBI^{-/-} contribue à l'exacerbation des phénomènes neurotoxiques du MPTP sur les neurones dopaminergiques de la SN. Des résultats similaires obtenus sur des cultures d'astrocytes, indiquent que la répression de l'expression du gène DBI par des ARN interférents rend les cellules plus sensibles (+26%) vis-à-vis de la cytotoxicité du H₂O₂. Cette vulnérabilité est complètement compensée par l'addition d'ODN (1 nM) dans le milieu de culture (Figure 19). Ces résultats sont en accord avec les rapports antérieurs où l'ODN exogène protège les neurones contre le stress oxydatif et l'apoptose (Kaddour *et al.* 2013). De plus, des études *in vivo* montrent que l'inhibition du DBI par des ARN interférents conduit à l'arrêt de la croissance et à la mort cellulaire des progéniteurs neuronaux dans la zone germinative sous-ventriculaire, chez la souris adulte (Alfonso *et al.* 2012). Il apparaît également que l'invalidation du DBI à l'aide d'oligonucléotides antisens ou d'ARN interférents, dans des lignées humaines ou murines de cellules différenciées, bloque l'incorporation de [³H] thymidine et induit la mort des cellules par apoptose (Mandrup *et al.* 1998, Faergeman and Knudsen 2002).

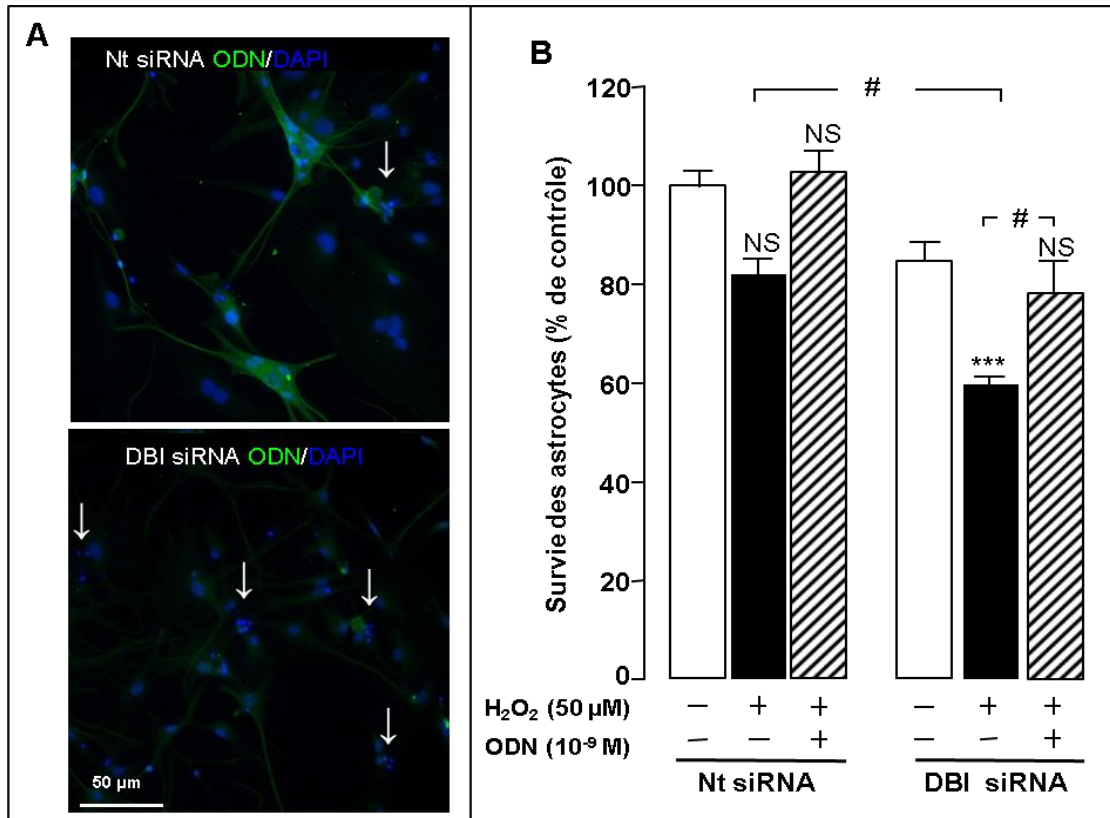


Figure 20 : L'inhibition de l'expression du DBI par ARNsi rend les astrocytes plus sensibles à la mort cellulaire induite par le stress oxydatif modéré. Les cellules ont été transfectées avec des ARNsi DBI ou avec des ARNsi sans ciblage (Nt) puis incubées pendant 6 h en présence ou en absence de 50 μM de H₂O₂ avec ou sans apport d'ODN exogène. **A.** L'étude immunocytochimique montre que l'intensité de la fluorescence des astrocytes transfectés avec des ARNsi DBI et marqués avec des anticorps dirigés contre l'ODN (vert) est très faible par rapport aux astrocytes transfectés avec des ARNsi sans ciblage (Nt). Le noyau est révélé par le DAPI (bleu). Les images correspondent à la superposition ODN/DAPI. Les flèches indiquent les cellules endommagées. **B.** La survie cellulaire est quantifiée par mesure d'intensité de fluorescence de la FDA. Les résultats sont exprimés en pourcentage de contrôle (± S.E.M., n=6) *** $p < 0,001$; NS : non significativement *versus* contrôle # $p < 0,05$ *versus*. Cellules traitées par le H₂O₂. D'après (Ghouili *et al.* 2017)

L'invalidation du gène du DBI conduit également à l'arrêt de la croissance et à l'apoptose dans diverses lignées cellulaires de mammifères telles que la lignée adipocytaire murine 3T3-L1, les lignées de cellules humaines hépatiques HepG2 et rénales embryonnaires HEK293 (Faergeman and Knudsen 2002, Mandrup *et al.* 1998, Shin *et al.* 2015). Plus récemment nous avons démontré que la transfection des astrocytes par des ARN interférents dirigés contre le DBI induit des altérations morphologiques avec perte de l'intégrité membranaire et apparition de corps apoptotiques, et rend les cellules plus sensibles à la mort par stress oxydatif (Ghouili *et al.* 2017). En revanche, l'apport exogène de doses nanomolaires d'ODN dans le milieu de culture d'astrocytes promeut leur survie et les protège face à un stress oxydatif (Ghouili *et al.* 2017). Prises ensemble ces données indiquent que la déficience en ODN potentialise le stress oxydatif, la neuroinflammation et l'apoptose induits par le MPTP et suggère que l'ODN agirait à la fois comme un agent neuroprotecteur endogène et comme un facteur de réponse en cas de stress cellulaire. A l'appui de cette hypothèse, nous avons observé que les astrocytes soumis à un stress oxydant surexpriment le gène du DBI et libèrent de l'ODN comme mécanisme de protection face aux dommages oxydatifs (Ghouili *et al.* 2017). Aussi la diminution des taux d'ARNm codant le DBI est associée à une augmentation de la production de ROS et de l'apoptose induite par le H₂O₂ dans les lignées cellulaires HEK293 et SNU-C4 (Shin *et al.* 2015).

Conclusions & Perspectives

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis de mettre en évidence pour la première fois les effets antioxydant, anti-inflammatoire et anti-apoptotique *in vivo* de l'ODN, administré à faible dose, chez les souris parkinsoniennes. Ces travaux suggèrent que le gliopeptide ODN pourrait conduire au développement d'agents thérapeutiques efficaces pour le traitement des lésions cérébrales. Le projet a également contribué à approfondir la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNpc dans le modèle murin de la MP.

Dans une première partie, nos résultats montrent que l'ODN injecté par voie i.c.v prévient l'astrogliose réactionnelle, la surproduction de ROS, la peroxydation lipidique, et l'augmentation de l'expression des gènes pro-inflammatoires et pro-apoptotiques au niveau de la région nigrostriée induite par le MPTP (Figure 20). Afin de compléter notre étude, la nature des récepteurs mis en jeu dans l'effet neuroprotecteur de l'ODN sera recherchée *in vivo* en utilisant des antagonistes des récepteurs des CBR (flumazénil, PK11195) et l'antagoniste du récepteur métabotrope de l'ODN (cyclo₁₋₈[DLeu⁵] OP) développé par le Dr Jérôme Leprince au sein de l'unité Inserm 1239. Nous tenterons également d'identifier les voies de signalisation activées par le récepteur de l'ODN et impliquées dans l'effet de l'ODN sur la survie des neurones dopaminergiques nigrostriés, dans le modèle de souris MP induit le MPTP.

Afin de compléter notre connaissance des mécanismes intracellulaires mis en jeu dans l'action protectrice de l'ODN sur les neurones dopaminergiques de la substance noire, chez les souris MP, nous réaliserons aussi une nouvelle étude protéomique. Pour cela, nous identifierons les protéines sur- ou sous-exprimées par analyse protéomique. Parallèlement à la technique classique de gels 2D, nous allons utiliser une approche par marquage isotopique. Pour cela, et après extraction, les protéines seront digérées à la trypsine, puis les fragments peptidiques couplés à un marqueur.

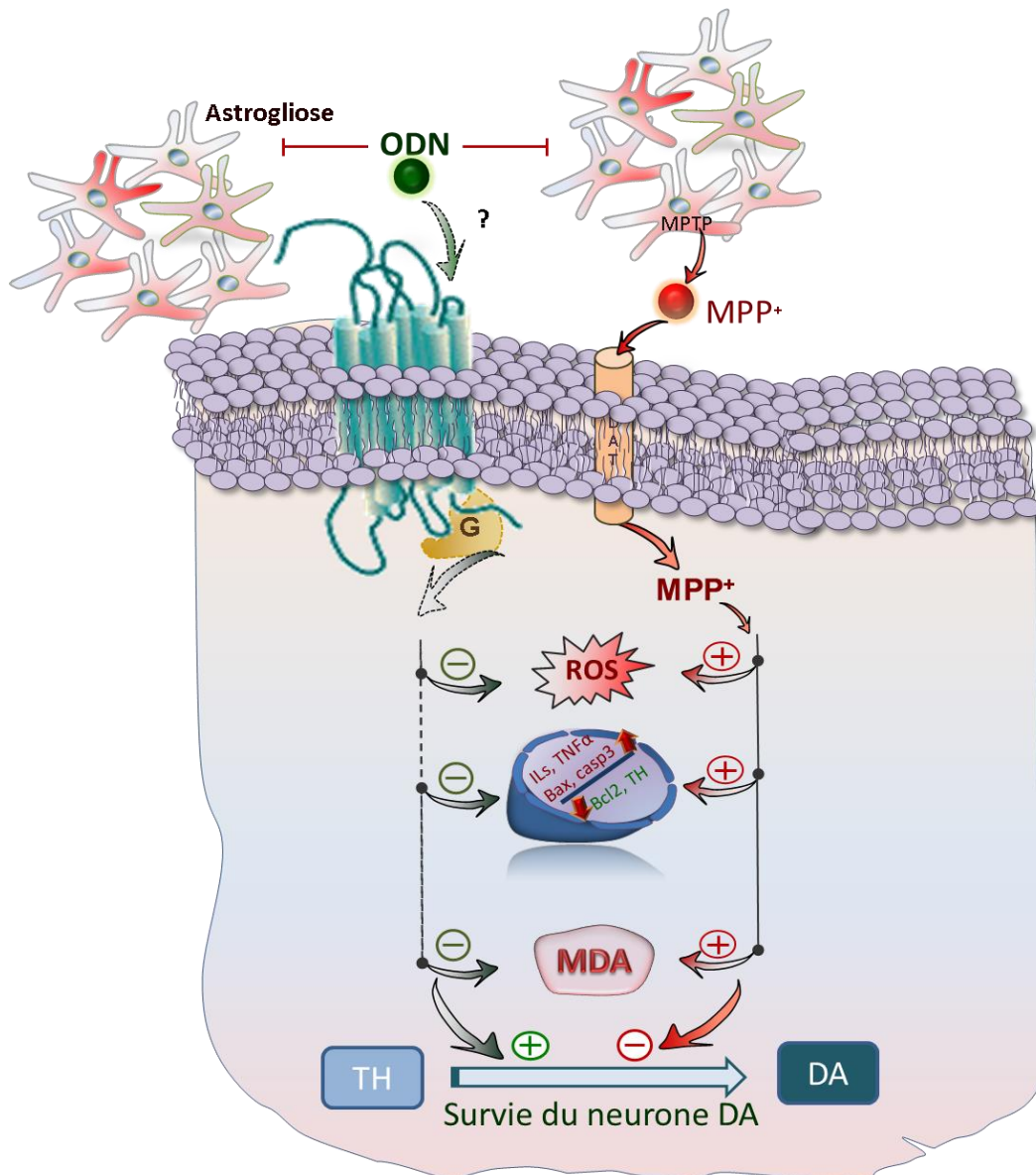


Figure 21 : Représentation schématique des mécanismes intracellulaires impliqués dans l'effet neuroprotecteur de l'ODN sur les neurones dopaminergiques de la SNpc contre la neurotoxicité du MPTP, chez la souris. L'injection par voie intracérébroventriculaire de faibles doses d'ODN, chez la souris, atténue le degré de la réactivité gliale induite par le MPTP dans la région nigrostriée. L'ODN, en interagissant probablement avec son récepteur métabotrope prévient les effets du MPTP sur *i)* l'accumulation de ROS, *ii)* la surexpression des gènes marqueurs de la neuroinflammation, comme l'interleukine (IL) IL1, IL-6 et le TNF- α , et de l'apoptose, comme Bax et la caspase-3, *iii)* la réduction des taux des ARNm codant Bcl2 et la tyrosine hydroxylase (TH). Enfin l'ODN s'oppose aux effets délétères du MPTP sur la diminution du taux en protéine TH et promeut la survie des neurones dopaminergiques de la SNpc. MDA, malondialdéhyde ; ROS, *reactive oxygen species*.

isotopique grâce à la technique iTRAQ® seront séparés en fonction de leur pH sur un système OffGel (Agilent), avant d'être caractérisées par spectrométrie de masse (nanoLC/chip/Q-TOF ; Agilent). Sachant que les processus de phosphorylation jouent un rôle clé dans le contrôle des effets neuroprotecteurs, nous allons plus spécifiquement étudier le phosphoprotéome des neurones dopaminergiques de la région nigrostriée en utilisant des colonnes d'enrichissement en phosphoprotéines. En raison du rôle majeur du stress oxydatif dans les effets néfastes du MPTP et des puissantes actions antioxydantes de l'ODN, une analyse plus spécifique du protéome oxydatif, suite à une intoxication par le MPTP, nous indiquera quelles sont les protéines altérées par le stress oxydatif, et quel pourrait être le résultat sur leurs fonctions.

Afin de déterminer si les effets de l'ODN sur la protection des neurones dopaminergiques et le maintien de l'homéostasie du métabolisme oxydatif sont suffisants pour induire une récupération motrice, des tests moteurs seront effectués chez les animaux traités au MPTP et ayant reçu une injection i.c.v d'ODN. Dans ce contexte les performances locomotrices seront évaluées à l'aide d'un « *Hanging Test* », « *Foot printing test* », d'un rotarod ou encore « *Morris water maze* » (Yadav *et al.* 2017).

L'implication du DBI endogène a été évaluée face à la neurotoxicité du MPTP, sur plusieurs paramètres de stress cellulaires dans la région nigrostriée. Les données obtenues ont révélé une augmentation du stress oxydatif, du degré de la réactivité gliale, de la production de cytokines pro-inflammatoires et du nombre de cellules en apoptose dans le cerveau des souris DBI^{-/-}. De manière intéressante, l'analyse comparative de ces différents paramètres chez les souris DBI^{+/+} et DBI^{+/-} traitées par le MPTP, a dévoilé que les taux des marqueurs oxydatifs, neuroinflammatoires et apoptotiques sont similaires mais amoindris comparés à ceux retrouvés chez les souris DBI^{-/-} parkinsoniennes. Les études *in vitro* sur des neurones et astrocytes, indiquent que parmi les peptides dérivés du DBI, l'ODN s'avère être un puissant facteur antioxydant et antiapoptotique (Hamdi *et al.* 2012a, Hamdi *et al.* 2015, Kaddour *et al.* 2013). Prises dans leur ensemble, ces

données laissent penser que l'absence d'ODN chez les souris déficientes en DBI est un facteur aggravant et une cause probable de la vulnérabilité excessive de ces animaux face au MPTP. Sur ce même modèle animal de la MP nous rechercherons une éventuelle corrélation entre l'évolution des lésions neuronales et le taux cérébral des peptides de la famille de l'ODN. Nous mesurerons par RT-PCR quantitative l'expression du gène codant le précurseur de l'ODN et celui codant la TH, et par dosage radioimmunologique les concentrations en EZs (à l'aide d'anticorps dirigés contre l'ODN développés par le laboratoire). Les niveaux de ces peptides seront également mesurés dans le sérum et/ou le LCR des animaux (souris traitées au MPTP versus souris contrôles) afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle, le peptide ODN agit comme un agent neuroprotecteur endogène et de réponse en cas de stress cellulaire. La MP débute généralement de façon insidieuse et évolue à bas bruit, il est donc primordial d'identifier des marqueurs biologiques fiables permettant de faire le diagnostic le plus précoce possible, avant la perte d'autonomie qui définit les stades avancés de la maladie. Selon les résultats que nous obtiendrons, l'ODN pourrait constituer un biomarqueur précoce des perturbations du métabolisme oxydatif cérébral et des processus dégénératifs associés à la MP. En collaboration avec des cliniciens, nous rechercherons sur une cohorte de patients MP l'existence d'une corrélation entre le degré de sévérité de la MP et les taux d'ODN dans le LCR et le plasma. Cet aspect du projet sera réalisé en collaboration avec des équipes médicales de l'hôpital Mongi Slim de Tunis qui effectueront le diagnostic clinique de la MP sur la cohorte de patients MP.

L'ensemble de nos résultats suggère que l'ODN est une molécule très efficace pour protéger les neurones contre les processus de neurodégénérescence. La voie orale, idéale pour l'administration de molécules à visée thérapeutique, est très souvent inadaptée pour les peptides dont la cible est le cerveau. De plus, des travaux antérieurs ont montré que l'ODN injecté par voie intraveineuse est incapable d'atteindre les aires cérébrales (de

Mateos-Verchere *et al.* 2001). Deux alternatives à l'accès de l'ODN au cerveau sont envisagées. La première consiste à concevoir des analogues intrinsèquement assez lipophiles pour favoriser leur passage au travers de la barrière hématoencéphalique par diffusion. Notre équipe a d'ores et déjà développé deux dérivés silylés de l'ODN, le [Sip2] OP et le [Sip2, DLeu⁵] OP, dont l'hydrophobicité pourrait favoriser leur passage à travers la BHE, et donc leur biodisponibilité. La seconde alternative est d'utiliser les propriétés de la muqueuse nasale, capable d'adsorber des composés hydrophiles de masse moléculaire inférieure à 1000 Da comme cela a pu être fait avec la CCK (Denecke *et al.* 2004) et l'ocytocine. Des analyses comportementales et histologiques seront réalisées afin de comparer les effets neuroprotecteurs de ces analogues de l'ODN (10 ng/10 µl), injectés par voie iv (500 µl d'analogues silylés) ou administrés par voie nasale (50 µl délivrés au goutte à goutte ; (Thorne *et al.* 2004)) dans notre modèle de murin de la MP.

A terme, ce projet vise à mieux comprendre le rôle du gliopeptide ODN dans le processus de neuroprotection, et ce dans le but de développer de nouvelles approches thérapeutiques permettant de réduire le stress oxydatif et les processus neuroinflammatoire et apoptotique responsables de la mort neuronale observée dans la maladie neurodégénérative de Parkinson.

Références Bibliographiques

A

- Abou-Sleiman, P. M., Muqit, M. M., McDonald, N. Q. *et al.* (2006) A heterozygous effect for PINK1 mutations in Parkinson's disease? *Ann Neurol*, 60, 414-419.
- Airavaara, M., Voutilainen, M. H., Wang, Y. and Hoffer, B. (2012) Neurorestoration. *Parkinsonism Relat Disord*, 18 Suppl 1, S143-146.
- Alfonso, J., Le Magueresse, C., Zuccotti, A., Khodosevich, K. and Monyer, H. (2012) Diazepam binding inhibitor promotes progenitor proliferation in the postnatal SVZ by reducing GABA signaling. *Cell Stem Cell*, 10, 76-87.
- Alho, H., Bovolin, P., Jenkins, D., Guidotti, A. and Costa, E. (1989) Cellular and subcellular localization of an octadecaneuropeptide derived from diazepam binding inhibitor: immunohistochemical studies in the rat brain. *J Chem Neuroanat*, 2, 301-318.
- Alho, H., Costa, E., Ferrero, P., Fujimoto, M., Cosenza-Murphy, D. and Guidotti, A. (1985) Diazepam-binding inhibitor: a neuropeptide located in selected neuronal populations of rat brain. *Science*, 229, 179-182.
- Alho, H., Fremeau, R. T., Jr., Tiedge, H., Wilcox, J., Bovolin, P., Brosius, J., Roberts, J. L. and Costa, E. (1988) Diazepam binding inhibitor gene expression: location in brain and peripheral tissues of rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 7018-7022.
- Alonso Canovas, A., Luquin Piudo, R., Garcia Ruiz-Espiga, P. *et al.* (2014) Dopaminergic agonists in Parkinson's disease. *Neurologia*, 29, 230-241.
- Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F. *et al.* (1997) Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol*, 12, 25-31.
- Aoki, E., Yano, R., Yokoyama, H., Kato, H. and Araki, T. (2009) Role of nuclear transcription factor kappa B (NF-kappaB) for MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)-induced apoptosis in nigral neurons of mice. *Exp Mol Pathol*, 86, 57-64.
- Apop-Mogi, M., Togari, A., Kondo, T., Mizuno, Y., Komure, O., Kuno, S., Ichinose, H. and Nagatsu, T. (2000) Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain. *J Neural Transm (Vienna)*, 107, 335-341.
- Astro-Finsterwald, C., Magistretti, P. J. and Lengacher, S. (2015) Astrocytes: New Targets for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Curr Pharm Des*, 21, 3570-3581.

B

- Baldi, I., Lebailly, P., Mohammed-Brahim, B., Letenneur, L., Dartigues, J. F. and Brochard, P. (2003) Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly. *Am J Epidemiol*, 157, 409-414.
- Bandopadhyay, R., Kingsbury, A. E., Cookson, M. R. *et al.* (2004) The expression of DJ-1 (PARK7) in normal human CNS and idiopathic Parkinson's disease. *Brain*, 127, 420-430.
- Barbaccia, M. L., Costa, E., Ferrero, P., Guidotti, A., Roy, A., Sunderland, T., Pickar, D., Paul, S. M. and Goodwin, F. K. (1986) Diazepam-binding inhibitor. A brain neuropeptide present in human spinal fluid: studies in depression, schizophrenia, and Alzheimer's disease. *Arch Gen Psychiatry*, 43, 1143-1147.
- Barmack, N. H., Bilderback, T. R., Liu, H., Qian, Z. and Yakhnitsa, V. (2004) Activity-dependent expression of acyl-coenzyme a-binding protein in retinal muller glial cells evoked by optokinetic stimulation. *J Neurosci*, 24, 1023-1033.
- Bastide, M., Ouk, T., Plaisier, F., Petrault, O., Stolc, S. and Bordet, R. (2007) Neurogliovascular unit after cerebral ischemia: is the vascular wall a pharmacological target. *Psychoneuroendocrinology*, 32 Suppl 1, S36-39.
- Benabid, A. L., Koudsie, A., Benazzouz, A., Fraix, V., Ashraf, A., Le Bas, J. F., Chabardes, S. and Pollak, P. (2000) Subthalamic stimulation for Parkinson's disease. *Arch Med Res*, 31, 282-289.
- Benabid, A. L., Koudsie, A., Benazzouz, A., Piallat, B., Krack, P., Limousin-Dowsey, P., Lebas, J. F. and Pollak, P. (2001) Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Adv Neurol*, 86, 405-412.
- Benabid, A. L. and Torres, N. (2012) New targets for DBS. *Parkinsonism Relat Disord*, 18 Suppl 1, S21-23.

- Bensadoun, J. C., Mirochnitchenko, O., Inouye, M., Aebischer, P. and Zurn, A. D. (1998) Attenuation of 6-OHDA-induced neurotoxicity in glutathione peroxidase transgenic mice. *Eur J Neurosci*, 10, 3231-3236.
- Bezard, E. (2006) A call for clinically driven experimental design in assessing neuroprotection in experimental Parkinsonism. *Behav Pharmacol*, 17, 379-382.
- Bhat, A. H., Dar, K. B., Anees, S., Zargar, M. A., Masood, A., Sofi, M. A. and Ganie, S. A. (2015) Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomed Pharmacother*, 74, 101-110.
- Bhuiyan, J., Pritchard, P. H., Pande, S. V. and Secombe, D. W. (1995) Effects of high-fat diet and fasting on levels of acyl-coenzyme A binding protein in liver, kidney, and heart of rat. *Metabolism*, 44, 1185-1189.
- Biagini, G., Marinelli, C., Panuccio, G., Puia, G. and Avoli, M. (2012) Glia-Neuron Interactions: Neurosteroids and Epileptogenesis. In: *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, (J. L. Noebels, M. Avoli, M. A. Rogawski, R. W. Olsen and A. V. Delgado-Escueta eds.). Bethesda (MD).
- Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M., Benabid, A. L., Sadoul, R. and Verna, J. M. (2001) Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 65, 135-172.
- Bormann, J. (1991) Electrophysiological characterization of diazepam binding inhibitor (DBI) on GABAA receptors. *Neuropharmacology*, 30, 1387-1389.
- Bose, A. and Beal, M. F. (2016) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurochem*, 139 Suppl 1, 216-231.
- Bouyakdan, K., Taib, B., Budry, L., Zhao, S., Rodaros, D., Neess, D., Mandrup, S., Faergeman, N. J. and Alquier, T. (2015) A novel role for central ACBP/DBI as a regulator of long-chain fatty acid metabolism in astrocytes. *J Neurochem*, 133, 253-265.
- Bove, J. and Perier, C. (2012) Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 211, 51-76.
- Braak H, Braak E, Yilmazer D, Schultz C, de Vos R. A, Jansen E. N. (1995) Nigral and extranigral pathology in Parkinson's disease. *J Neural Transm*, 46: 15-31.
- Branco D. M, Arduino D. M, Esteves A. R, Silva D. F, Cardoso S. M, Oliveira C. R. (2010) Cross-talk between mitochondria and proteasome in Parkinson's disease pathogenesis. *Front Aging Neurosci*. 2:17.
- Brochard, V., Combadiere, B., Prigent, A. *et al.* (2009) Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J Clin Invest*, 119, 182-192.
- Brown, R. C., Lockwood, A. H. and Sonawane, B. R. (2005) Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors. *Environ Health Perspect*, 113, 1250-1256.
- Bruck, D., Wenning, G. K., Stefanova, N. and Fellner, L. (2016) Glia and alpha-synuclein in neurodegeneration: A complex interaction. *Neurobiol Dis*, 85, 262-274.
- Brynskikh, A. M., Zhao, Y., Mosley, R. L., Li, S., Boska, M. D., Klyachko, N. L., Kabanov, A. V., Gendelman, H. E. and Batrakova, E. V. (2010) Macrophage delivery of therapeutic nanozymes in a murine model of Parkinson's disease. *Nanomedicine (Lond)*, 5, 379-396.
- Budry, L., Bouyakdan, K., Tobin, S., Rodaros, D., Marcher, A. B., Mandrup, S., Fulton, S. and Alquier, T. (2016) DBI/ACBP loss-of-function does not affect anxiety-like behaviour but reduces anxiolytic responses to diazepam in mice. *Behav Brain Res*, 313, 201-207.
- Bulteau, A. L., Mena, N. P., Auchere, F., Lee, I., Prigent, A., Lobsiger, C. S., Camadro, J. M. and Hirsch, E. C. (2017) Dysfunction of mitochondrial Lon protease and identification of oxidized protein in mouse brain following exposure to MPTP: Implications for Parkinson disease. *Free Radic Biol Med*, 108, 236-246.
- Burns, R. S., Markey, S. P., Phillips, J. M. and Chiueh, C. C. (1984) The neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the monkey and man. *Can J Neurol Sci*, 11, 166-168.
- Busciglio, J., Pelsman, A., Helguera, P., Ashur-Fabian, O., Pinhasov, A., Brenneman, D. E. and Gozes, I. (2007) NAP and ADNF-9 protect normal and Down's syndrome cortical neurons from oxidative damage and apoptosis. *Curr Pharm Des*, 13, 1091-1098.

C

- Cabezas, R., Avila-Rodriguez, M., Vega-Vela, N. E., Echeverria, V., Gonzalez, J., Hidalgo, O. A., Santos, A. B., Aliev, G. and Barreto, G. E. (2016) Growth Factors and Astrocytes Metabolism: Possible Roles for Platelet Derived Growth Factor. *Med Chem*, 12, 204-210.
- Cacabelos, R. (2017) Parkinson's Disease: From Pathogenesis to Pharmacogenomics. *Int J Mol Sci*, 18.
- Cannon, J. R. and Greenamyre, J. T. (2010) Neurotoxic in vivo models of Parkinson's disease recent advances. *Prog Brain Res*, 184, 17-33.
- Cao, J. J., Li, K. S. and Shen, Y. Q. (2011) Activated immune cells in Parkinson's disease. *J Neuroimmune Pharmacol*, 6, 323-329.
- Carboni, E. and Lingor, P. (2015) Insights on the interaction of alpha-synuclein and metals in the pathophysiology of Parkinson's disease. *Metallomics*, 7, 395-404.
- Carriere, A., Galinier, A., Fernandez, Y., Carmona, M. C., Penicaud, L. and Casteilla, L. (2006) [Physiological and physiopathological consequences of mitochondrial reactive oxygen species]. *Med Sci (Paris)*, 22, 47-53.
- Carstam, R., Brinck, C., Hindemith-Augustsson, A., Rorsman, H. and Rosengren, E. (1991) The neuromelanin of the human substantia nigra. *Biochim Biophys Acta*, 1097, 152-160.
- Castagnoli, N., Jr., Chiba, K. and Trevor, A. J. (1985) Potential bioactivation pathways for the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Life Sci*, 36, 225-230.
- Cavin, C., Marin-Kuan, M., Langouet, S. et al. (2008) Induction of Nrf2-mediated cellular defenses and alteration of phase I activities as mechanisms of chemoprotective effects of coffee in the liver. *Food Chem Toxicol*, 46, 1239-1248.
- Chan, J. Y. and Chan, S. H. (2015) Activation of endogenous antioxidants as a common therapeutic strategy against cancer, neurodegeneration and cardiovascular diseases: A lesson learnt from DJ-1. *Pharmacol Ther*, 156, 69-74.
- Chang, J. L. and Tsai, H. J. (1996) Carp cDNA sequence encoding a putative diazepam-binding inhibitor/endozepine/acyl-CoA-binding protein. *Biochim Biophys Acta*, 1298, 9-11.
- Chartier-Harlin, M. C., Kachergus, J., Roumier, C. et al. (2004) Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet*, 364, 1167-1169.
- Chauhan, N. B., Siegel, G. J. and Lee, J. M. (2001) Depletion of glial cell line-derived neurotrophic factor in substantia nigra neurons of Parkinson's disease brain. *J Chem Neuroanat*, 21, 277-288.
- Chen, G., Bower, K. A., Ma, C., Fang, S., Thiele, C. J. and Luo, J. (2004) Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) mediates 6-hydroxydopamine-induced neuronal death. *FASEB J*, 18, 1162-1164.
- Chen, P. C., Vargas, M. R., Pani, A. K., Smeyne, R. J., Johnson, D. A., Kan, Y. W. and Johnson, J. A. (2009) Nrf2-mediated neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: Critical role for the astrocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 2933-2938.
- Chen, Y. and Swanson, R. A. (2003) Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23, 137-149.
- Christian, C. A., Herbert, A. G., Holt, R. L., Peng, K., Sherwood, K. D., Pangratz-Fuehrer, S., Rudolph, U. and Huguenard, J. R. (2013) Endogenous positive allosteric modulation of GABA(A) receptors by diazepam binding inhibitor. *Neuron*, 78, 1063-1074.
- Christian, C. A. and Huguenard, J. R. (2013) Astrocytes potentiate GABAergic transmission in the thalamic reticular nucleus via endozepine signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 20278-20283.
- Chye, M. L. (1998) Arabidopsis cDNA encoding a membrane-associated protein with an acyl-CoA binding domain. *Plant Mol Biol*, 38, 827-838.
- Chye, M. L., Huang, B. Q. and Zee, S. Y. (1999) Isolation of a gene encoding Arabidopsis membrane-associated acyl-CoA binding protein and immunolocalization of its gene product. *Plant J*, 18, 205-214.

- Cinone, N., Hotje, H. D. and Carotti, A. (2000) Development of a unique 3D interaction model of endogenous and synthetic peripheral benzodiazepine receptor ligands. *J Comput Aided Mol Des*, 14, 753-768.
- Clavier, T., Besnier, E., Lefevre-Scelles, A., Lanfray, D., Masmoudi, O., Pelletier, G., Castel, H., Tonon, M. C. and Compere, V. (2016) Increased Hypothalamic Levels of Endozepines, Endogenous Ligands of Benzodiazepine Receptors, in a Rat Model of Sepsis. *Shock*, 45, 653-659.
- Clavier, T., Tonon, M. C., Foutel, A. *et al.* (2014) Increased plasma levels of endozepines, endogenous ligands of benzodiazepine receptors, during systemic inflammation: a prospective observational study. *Crit Care*, 18, 633.
- Colangelo, A. M., Alberghina, L. and Papa, M. (2014) Astroglialosis as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Neurosci Lett*, 565, 59-64.
- Cole, N. B., Murphy, D. D., Lebowitz, J., Di Noto, L., Levine, R. L. and Nussbaum, R. L. (2005) Metal-catalyzed oxidation of alpha-synuclein: helping to define the relationship between oligomers, protofibrils, and filaments. *J Biol Chem*, 280, 9678-9690.
- Compere, V., Li, S., Leprince, J., Tonon, M. C., Vaudry, H. and Pelletier, G. (2003) Effect of intracerebroventricular administration of the octadecaneuropeptide on the expression of pro-opiomelanocortin, neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone mRNAs in rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol*, 15, 197-203.
- Compere, V., Li, S., Leprince, J., Tonon, M. C., Vaudry, H. and Pelletier, G. (2004) In vivo action of a new octadecaneuropeptide (ODN) antagonist on gonadotropin-releasing hormone gene expression in the male rat brain. *Neuroscience*, 125, 411-415.
- Compere, V., Li, S., Leprince, J., Tonon, M. C., Vaudry, H. and Pelletier, G. (2005) In vivo action of a new octadecaneuropeptide antagonist on neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone mRNA levels in rat. *Brain Res Mol Brain Res*, 141, 156-160.
- Compere, V., Ouellet, J., Luu-The, V., Dureuil, B., Tonon, M. C., Vaudry, H., Labrie, F. and Pelletier, G. (2006) Role of androgens and glucocorticoids in the regulation of diazepam-binding inhibitor mRNA levels in male mouse hypothalamus. *Brain Res*, 1119, 50-57.
- Cooper, I. S. (1953) Ligation of the anterior choroidal artery for involuntary movements; parkinsonism. *Psychiatr Q*, 27, 317-319.
- Corrigan, F. M., French, M. and Murray, L. (1996) Organochlorine compounds in human brain. *Hum Exp Toxicol*, 15, 262-264.
- Corrigan, F. M., Murray, L., Wyatt, C. L. and Shore, R. F. (1998) Diorthosubstituted polychlorinated biphenyls in caudate nucleus in Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 150, 339-342.
- Corrigan, F. M., Wienburg, C. L., Shore, R. F., Daniel, S. E. and Mann, D. (2000) Organochlorine insecticides in substantia nigra in Parkinson's disease. *J Toxicol Environ Health A*, 59, 229-234.
- Costa, E., Corda, M. G. and Guidotti, A. (1983) On a brain polypeptide functioning as a putative effector for the recognition sites of benzodiazepine and beta-carboline derivatives. *Neuropharmacology*, 22, 1481-1492.
- Cotzias, G. C., Papavasiliou, P. S., Gellene, R. and Aronson, R. B. (1968) Parkinsonism and DOPA. *Trans Assoc Am Physicians*, 81, 171-183.
- Cotzias, G. C., Papavasiliou, P. S., Tolosa, E. S., Mendez, J. S. and Bell-Midura, M. (1976) Treatment of Parkinson's disease with aporphines. Possible role of growth hormone. *N Engl J Med*, 294, 567-572.
- Crossman, A. R. (1989) Neural mechanisms in disorders of movement. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, 93, 141-149.

D

- D'Amato, R. J., Alexander, G. M., Schwartzman, R. J., Kitt, C. A., Price, D. L. and Snyder, S. H. (1987a) Evidence for neuromelanin involvement in MPTP-induced neurotoxicity. *Nature*, 327, 324-326.

- D'Amato, R. J., Alexander, G. M., Schwartzman, R. J., Kitt, C. A., Price, D. L. and Snyder, S. H. (1987b) Neuromelanin: a role in MPTP-induced neurotoxicity. *Life Sci*, 40, 705-712.
- D'Amato, R. J., Lipman, Z. P. and Snyder, S. H. (1986) Selectivity of the parkinsonian neurotoxin MPTP: toxic metabolite MPP⁺ binds to neuromelanin. *Science*, 231, 987-989.
- Daley, D. J., Myint, P. K., Gray, R. J. and Deane, K. H. (2012) Systematic review on factors associated with medication non-adherence in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 18, 1053-1061.
- Dallerac, G. and Rouach, N. (2016) Astrocytes as new targets to improve cognitive functions. *Prog Neurobiol*, 144, 48-67.
- Dauer, W., Kholodilov, N., Vila, M. *et al.* (2002) Resistance of alpha -synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 14524-14529.
- Dauer, W. and Przedborski, S. (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39, 889-909.
- de la Fuente-Fernandez, R., Schulzer, M., Mak, E. and Sossi, V. (2010) Trials of neuroprotective therapies for Parkinson's disease: problems and limitations. *Parkinsonism Relat Disord*, 16, 365-369.
- De Mateos-Verchere, J. G., Leprince, J., Tonon, M. C., Vaudry, H. and Costentin, J. (1998) The octadecaneuropeptide ODN induces anxiety in rodents: possible involvement of a shorter biologically active fragment. *Peptides*, 19, 841-848.
- de Mateos-Verchere, J. G., Leprince, J., Tonon, M. C., Vaudry, H. and Costentin, J. (2001) The octadecaneuropeptide [diazepam-binding inhibitor (33-50)] exerts potent anorexigenic effects in rodents. *Eur J Pharmacol*, 414, 225-231.
- DeBernardi, M. A., Crowe, R. R., Mocchetti, I., Shows, T. B., Eddy, R. L. and Costa, E. (1988) Chromosomal localization of the human diazepam binding inhibitor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 6561-6565.
- Defebvre, L. (2004) [Motor complications in dopa treatment of parkinson disease: clinical description and evaluation]. *Therapie*, 59, 93-96.
- Degos, B., Toussaint, A., Lesage, S., Brice, A., Vidailhet, M., Beldjord, C. and Catala, M. (2016) PINK1 and FLNA mutations association: A role for atypical parkinsonism? *Parkinsonism Relat Disord*, 26, 78-80.
- Dejda, A., Sokolowska, P. and Nowak, J. Z. (2005) Neuroprotective potential of three neuropeptides PACAP, VIP and PHI. *Pharmacol Rep*, 57, 307-320.
- Del Tredici, K. and Braak, H. (2016) Review: Sporadic Parkinson's disease: development and distribution of alpha-synuclein pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 42, 33-50.
- Denecke, H., Meyer, F., Feldkamp, J., Fritzen, R. and Pietrowsky, R. (2004) Repetitive intranasal administration of cholecystokinin potentiates its central nervous effects. *Physiol Behav*, 83, 39-45.
- Dezsi, L. and Vecsei, L. (2017) Monoamine Oxidase B Inhibitors in Parkinson's Disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 16, 425-439.
- Di Monte, D., Ekstrom, G., Shinka, T., Smith, M. T., Trevor, A. J. and Castagnoli, N., Jr. (1987) Role of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion formation and accumulation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity to isolated hepatocytes. *Chem Biol Interact*, 62, 105-116.
- Di Monte, D. A., Royland, J. E., Irwin, I. and Langston, J. W. (1996) Astrocytes as the site for bioactivation of neurotoxins. *Neurotoxicology*, 17, 697-703.
- Dias, V., Junn, E. and Mouradian, M. M. (2013) The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis*, 3, 461-491.
- Dickson, D. W. (2012) Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2.
- Ding, S., Huang, W., Ye, Y., Yang, J., Hu, J., Wang, X., Liu, L., Lu, Q. and Lin, Y. (2014) Elevated intracranial dopamine impairs the glutamatergic nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in cortical astrocytes in rats with minimal hepatic encephalopathy. *Mol Med Rep*, 10, 1215-1224.
- Do-Rego, J. L., Mensah-Nyagan, A. G., Beaujean, D., Leprince, J., Tonon, M. C., Luu-The, V., Pelletier, G. and Vaudry, H. (2001) The octadecaneuropeptide ODN stimulates neurosteroid

- biosynthesis through activation of central-type benzodiazepine receptors. *J Neurochem*, 76, 128-138.
- Dodel, R. C., Du, Y., Bales, K. R., Ling, Z., Carvey, P. M. and Paul, S. M. (1999) Caspase-3-like proteases and 6-hydroxydopamine induced neuronal cell death. *Brain Res Mol Brain Res*, 64, 141-148.
- Dong, E., Matsumoto, K., Tohda, M. and Watanabe, H. (1999) Involvement of diazepam binding inhibitor and its fragment octadecaneuropeptide in social isolation stress-induced decrease in pentobarbital sleep in mice. *Life Sci*, 64, 1779-1784.
- Doty, R. L. (2012) Olfaction in Parkinson's disease and related disorders. *Neurobiol Dis*, 46, 527-552.
- Doudet, D., Gross, C., Lebrun-Grandie, P. and Bioulac, B. (1985a) [A model of Parkinson's disease: effect of L-dopa therapy on movement parameters and electromyographic activity in monkeys treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)]. *C R Seances Soc Biol Fil*, 179, 85-97.
- Doudet, D., Gross, C., Lebrun-Grandie, P. and Bioulac, B. (1985b) MPTP primate model of Parkinson's disease: a mechanographic and electromyographic study. *Brain Res*, 335, 194-199.
- Dringen, R. (2005) Oxidative and antioxidative potential of brain microglial cells. *Antioxid Redox Signal*, 7, 1223-1233.
- Duncan, G. W., Yarnall, A. J., Marrinan, S. and Burn, D. J. (2013) New horizons in the pathogenesis, assessment and management of movement disorders. *Age Ageing*, 42, 2-10.
- Dvorzhak, A., Melnick, I. and Grantyn, R. (2017) Astrocytes and presynaptic plasticity in the striatum: Evidence and unanswered questions. *Brain Res Bull*.
- Dzamko, N., Geczy, C. L. and Halliday, G. M. (2015) Inflammation is genetically implicated in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 302, 89-102.
- E
- Elbaz, A. and Tranchant, C. (2007) Epidemiologic studies of environmental exposures in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 262, 37-44.
- Elstner, M., Morris, C. M., Heim, K. *et al.* (2011) Expression analysis of dopaminergic neurons in Parkinson's disease and aging links transcriptional dysregulation of energy metabolism to cell death. *Acta Neuropathol*, 122, 75-86.
- Emerit, J., Edeas, M. and Bricaire, F. (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother*, 58, 39-46.
- Ettinger, S. L., Sobel, R., Whitmore, T. G., Akbari, M., Bradley, D. R., Gleave, M. E. and Nelson, C. C. (2004) Dysregulation of sterol response element-binding proteins and downstream effectors in prostate cancer during progression to androgen independence. *Cancer Res*, 64, 2212-2221.
- Ewert, S., Plettig, P., Li, N., Chakravarty, M. M., Collins, D. L., Herrington, T. M., Kuhn, A. A. and Horn, A. (2017) Toward defining deep brain stimulation targets in MNI space: A subcortical atlas based on multimodal MRI, histology and structural connectivity. *Neuroimage*.
- F
- F, L. E., Tirolo, C., Testa, N., Caniglia, S., Morale, M. C. and Marchetti, B. (2010) Glia as a turning point in the therapeutic strategy of Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 9, 349-372.
- Fabre, E., Monserrat, J., Herrero, A., Barja, G. and Leret, M. L. (1999) Effect of MPTP on brain mitochondrial H₂O₂ and ATP production and on dopamine and DOPAC in the striatum. *J Physiol Biochem*, 55, 325-331.
- Faergeman, N. J. and Knudsen, J. (2002) Acyl-CoA binding protein is an essential protein in mammalian cell lines. *Biochem J*, 368, 679-682.
- Falkowska, A., Gutowska, I., Goschorska, M., Nowacki, P., Chlubek, D. and Baranowska-Bosiacka, I. (2015) Energy Metabolism of the Brain, Including the Cooperation between Astrocytes and Neurons, Especially in the Context of Glycogen Metabolism. *Int J Mol Sci*, 16, 25959-25981.
- Farzampour, Z., Reimer, R. J. and Huguenard, J. (2015) Endozepines. *Adv Pharmacol*, 72, 147-164.

- Faucheux, B. A., Martin, M. E., Beaumont, C., Hauw, J. J., Agid, Y. and Hirsch, E. C. (2003) Neuromelanin associated redox-active iron is increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *J Neurochem*, 86, 1142-1148.
- Faucheux, B. A., Martin, M. E., Beaumont, C., Hunot, S., Hauw, J. J., Agid, Y. and Hirsch, E. C. (2002) Lack of up-regulation of ferritin is associated with sustained iron regulatory protein-1 binding activity in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *J Neurochem*, 83, 320-330.
- Feany MB, Bender W. W. (2000) A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature*, 23; 404(6776):394-8.
- Fenoy, A. J., Goetz, L., Chabardes, S. and Xia, Y. (2014) Deep brain stimulation: are astrocytes a key driver behind the scene? *CNS Neurosci Ther*, 20, 191-201.
- Ferrarese, C., Appollonio, I., Frigo, M., Meregalli, S., Piolti, R., Tamma, F. and Frattola, L. (1990) Cerebrospinal fluid levels of diazepam-binding inhibitor in neurodegenerative disorders with dementia. *Neurology*, 40, 632-635.
- Ferrero, P., Benna, P., Costa, P., Tarenzi, L., Baggio, G., Bergamasco, B. and Bergamini, L. (1988) Diazepam binding inhibitor-like immunoreactivity (DBI-LI) in human CSF. Correlations with neurological disorders. *J Neurol Sci*, 87, 327-349.
- Ferrero, P., Guidotti, A., Conti-Tronconi, B. and Costa, E. (1984) A brain octadecaneuropeptide generated by tryptic digestion of DBI (diazepam binding inhibitor) functions as a proconflict ligand of benzodiazepine recognition sites. *Neuropharmacology*, 23, 1359-1362.
- Ferrero, P., Santi, M. R., Conti-Tronconi, B., Costa, E. and Guidotti, A. (1986) Study of an octadecaneuropeptide derived from diazepam binding inhibitor (DBI): biological activity and presence in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 827-831.
- Finsterwald, C., Magistretti, P. J. and Lengacher, S. (2015) Astrocytes: New Targets for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Curr Pharm Des*, 21, 3570-3581.
- Florence, C. M., Baillie, L. D. and Mulligan, S. J. (2012) Dynamic volume changes in astrocytes are an intrinsic phenomenon mediated by bicarbonate ion flux. *PLoS One*, 7, e51124.
- Foley, P. (2000) The L-DOPA story revisited. Further surprises to be expected? *J Neural Transm Suppl*, 1-20.
- Forno, L. S., DeLanney, L. E., Irwin, I. and Langston, J. W. (1993) Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations. *Adv Neurol*, 60, 600-608.
- Fraix, V. (2004) [Gene therapy for Parkinson's disease]. *Rev Med Interne*, 25, 524-527.
- Fraix, V., Pollak, P., Vercueil, L., Benabid, A. L. and Mauguier, F. (2008) Effects of subthalamic nucleus stimulation on motor cortex excitability in Parkinson's disease. *Clin Neurophysiol*, 119, 2513-2518.
- Freeman, M. R. (2010) Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science*, 330, 774-778.
- Freire, C. and Koifman, S. (2012) Pesticide exposure and Parkinson's disease: epidemiological evidence of association. *Neurotoxicology*, 33, 947-971.

G

- Gach, K., Belkacemi, O., Lefranc, B. *et al.* (2015) Detection, characterization and biological activities of [bisphospho-thr3,9]ODN, an endogenous molecular form of ODN released by astrocytes. *Neuroscience*, 290, 472-484.
- Gaki, G. S. and Papavassiliou, A. G. (2014) Oxidative stress-induced signaling pathways implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neuromolecular Med*, 16, 217-230.
- Gallagher, D. A. and Schrag, A. (2008) Impact of newer pharmacological treatments on quality of life in patients with Parkinson's disease. *CNS Drugs*, 22, 563-586.
- Gan, L., Vargas, M. R., Johnson, D. A. and Johnson, J. A. (2012) Astrocyte-specific overexpression of Nrf2 delays motor pathology and synuclein aggregation throughout the CNS in the alpha-synuclein mutant (A53T) mouse model. *J Neurosci*, 32, 17775-17787.
- Gandhi, S., Muqit, M. M., Stanyer, L. *et al.* (2006) PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease. *Brain*, 129, 1720-1731.

- Gandolfo, P., Patte, C., Leprince, J., Thoumas, J. L., Vaudry, H. and Tonon, M. C. (1997) The stimulatory effect of the octadecaneuropeptide (ODN) on cytosolic Ca²⁺ in rat astrocytes is not mediated through classical benzodiazepine receptors. *Eur J Pharmacol*, 322, 275-281.
- Gandolfo, P., Patte, C., Thoumas, J. L., Leprince, J., Vaudry, H. and Tonon, M. C. (1999) The endozepine ODN stimulates [3H]thymidine incorporation in cultured rat astrocytes. *Neuropharmacology*, 38, 725-732.
- Ganguly, G., Chakrabarti, S., Chatterjee, U. and Saso, L. (2017) Proteinopathy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction: cross talk in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Drug Des Devel Ther*, 11, 797-810.
- Gao, J., Nalls, M. A., Shi, M., Joubert, B. R., Hernandez, D. G., Huang, X., Hollenbeck, A., Singleton, A. B. and Chen, H. (2012) An exploratory analysis on gene-environment interactions for Parkinson disease. *Neurobiol Aging*, 33, 2528 e2521-2526.
- Garcia-Marin, V., Garcia-Lopez, P. and Freire, M. (2007) Cajal's contributions to glia research. *Trends Neurosci*, 30, 479-487.
- Garzon, D., Cabezas, R., Vega, N., Avila-Rodriguez, M., Gonzalez, J., Gomez, R. M., Echeverria, V., Aliev, G. and Barreto, G. E. (2016) Novel Approaches in Astrocyte Protection: from Experimental Methods to Computational Approaches. *J Mol Neurosci*, 58, 483-492.
- Gash, D. M., Zhang, Z., Ovadia, A. et al. (1996) Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature*, 380, 252-255.
- Gee, J. R. and Keller, J. N. (2005) Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 1145-1150.
- Gegg, M. E., Clark, J. B. and Heales, S. J. (2002) Determination of glutamate-cysteine ligase (gamma-glutamylcysteine synthetase) activity by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. *Anal Biochem*, 304, 26-32.
- Gersuk, V. H., Rose, T. M. and Todaro, G. J. (1995) Molecular cloning and chromosomal localization of a pseudogene related to the human acyl-CoA binding protein/diazepam binding inhibitor. *Genomics*, 25, 469-476.
- Ghouili, I., Bahdoudi, S., Morin, F. et al. (2017) Endogenous Expression of ODN-Related Peptides in Astrocytes Contributes to Cell Protection Against Oxidative Stress: Astrocyte-Neuron Crosstalk Relevance for Neuronal Survival. *Mol Neurobiol*.
- Glinka, Y., Tipton, K. F. and Youdim, M. B. (1996) Nature of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-Hydroxydopamine. *J Neurochem*, 66, 2004-2010
- Gotham, A. M., Brown, R. G. and Marsden, C. D. (1986) Depression in Parkinson's disease: a quantitative and qualitative analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 49, 381-389.
- Graham, D. G. (1978) Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol*, 14, 633-643.
- Graham, D. G. (1979) On the origin and significance of neuromelanin. *Arch Pathol Lab Med*, 103, 359-362.
- Gray, P. W., Glaister, D., Seeburg, P. H., Guidotti, A. and Costa, E. (1986) Cloning and expression of cDNA for human diazepam binding inhibitor, a natural ligand of an allosteric regulatory site of the gamma-aminobutyric acid type A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 7547-7551.
- Greenamyre, J. T., Sherer, T. B., Betarbet, R. and Panov, A. V. (2001) Complex I and Parkinson's disease. *IUBMB Life*, 52, 135-141.
- Guarneri, P., Berkovich, A., Guidotti, A. and Costa, E. (1990) A study of diazepam binding inhibitor (DBI) processing products in human cerebrospinal fluid and in postmortem human brain. *Neuropharmacology*, 29, 419-428.
- Guerrero, C., Martin-Rufian, M., Reina, J. J. and Heredia, A. (2006) Isolation and characterization of a cDNA encoding a membrane bound acyl-CoA binding protein from *Agave americana* L. epidermis. *Plant Physiol Biochem*, 44, 85-90.
- Guidotti, A., Forchetti, C. M., Corda, M. G., Konkel, D., Bennett, C. D. and Costa, E. (1983) Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 3531-3535.
- Guizzetti, M. and Costa, L. G. (2007) Cholesterol homeostasis in the developing brain: a possible new target for ethanol. *Hum Exp Toxicol*, 26, 355-360.

- Gundersen, V., Storm-Mathisen, J. and Bergersen, L. H. (2015) Neuroglial Transmission. *Physiol Rev*, 95, 695-726.
- Gusdon, A. M., Zhu, J., Van Houten, B. and Chu, C. T. (2012) ATP13A2 regulates mitochondrial bioenergetics through macroautophagy. *Neurobiol Dis*, 45, 962-972.
- Guzzi, G., Della Torre, A., Chirchiglia, D., Volpentesta, G. and Lavano, A. (2016) Critical reappraisal of DBS targeting for movement disorders. *J Neurosurg Sci*, 60, 181-188.

H

- Halassa, M. M., Fellin, T. and Haydon, P. G. (2007) The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med*, 13, 54-63.
- Halassa, M. M. and Haydon, P. G. (2010) Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol*, 72, 335-355.
- Haley T. J., McCormick W. G. (1957) Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse. *Br J Pharmacol Chemother*, 12(1):12-5.
- Hamdi, Y., Kaddour, H., Vaudry, D. *et al.* (2012a) The octadecaneuropeptide ODN protects astrocytes against hydrogen peroxide-induced apoptosis via a PKA/MAPK-dependent mechanism. *PLoS One*, 7, e42498.
- Hamdi, Y., Kaddour, H., Vaudry, D. *et al.* (2012b) The stimulatory effect of the octadecaneuropeptide ODN on astroglial antioxidant enzyme systems is mediated through a GPCR. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 3, 138.
- Hamdi, Y., Kaddour, H., Vaudry, D. *et al.* (2015) Octadecaneuropeptide ODN prevents hydrogen peroxide-induced oxidative damage of biomolecules in cultured rat astrocytes. *Peptides*, 71, 56-65.
- Hamdi, Y., Masmoudi-Kouki, O., Kaddour, H. *et al.* (2011) Protective effect of the octadecaneuropeptide on hydrogen peroxide-induced oxidative stress and cell death in cultured rat astrocytes. *J Neurochem*, 118, 416-428.
- Hansen, H. O., Andreasen, P. H., Mandrup, S., Kristiansen, K. and Knudsen, J. (1991) Induction of acyl-CoA-binding protein and its mRNA in 3T3-L1 cells by insulin during preadipocyte-to-adipocyte differentiation. *Biochem J*, 277 (Pt 2), 341-344.
- Hardy J, Cai H, Cookson M. R, Gwinn-Hardy K, Singleton A. (2006) Genetics of Parkinson's disease and Parkinsonism. *Ann Neurol*, 60(4):389-98.
- Hardy, J., Lewis, P., Revesz, T., Lees, A. and Paisan-Ruiz, C. (2009) The genetics of Parkinson's syndromes: a critical review. *Curr Opin Genet Dev*, 19, 254-265.
- Harish, G., Venkateshappa, C., Mahadevan, A., Pruthi, N., Srinivas Bharath, M. M. and Shankar, S. K. (2011) Glutathione metabolism is modulated by postmortem interval, gender difference and agonal state in postmortem human brains. *Neurochem Int*, 59, 1029-1042.
- Hartmann, A. (2004) Postmortem studies in Parkinson's disease. *Dialogues Clin Neurosci*, 6, 281-293.
- Hartmann, A. and Hirsch, E. C. (2001) Parkinson's disease. The apoptosis hypothesis revisited. *Adv Neurol*, 86, 143-153.
- Hartmann, A., Hunot, S. and Hirsch, E. C. (2003) Inflammation and dopaminergic neuronal loss in Parkinson's disease: a complex matter. *Exp Neurol*, 184, 561-564.
- Hartmann, A., Hunot, S., Michel, P. P. *et al.* (2000) Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 2875-2880.
- Hartmann, A., Mouatt-Prigent, A., Faucheux, B. A., Agid, Y. and Hirsch, E. C. (2002) FADD: A link between TNF family receptors and caspases in Parkinson's disease. *Neurology*, 58, 308-310.
- Hayashi, H. (2011) Lipid metabolism and glial lipoproteins in the central nervous system. *Biol Pharm Bull*, 34, 453-461.
- Helledie, T., Grontved, L., Jensen, S. S. *et al.* (2002) The gene encoding the Acyl-CoA-binding protein is activated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma through an intronic response element functionally conserved between humans and rodents. *J Biol Chem*, 277, 26821-26830.
- Henderson, J. M. and Dunnett, S. B. (1998) Targeting the subthalamic nucleus in the treatment of Parkinson's disease. *Brain Res Bull*, 46, 467-474.

- Hernan, M. A., Takkouche, B., Caamano-Isorna, F. and Gestal-Otero, J. J. (2002) A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 52, 276-284.
- Hernan, M. A., Zhang, S. M., Rueda-deCastro, A. M., Colditz, G. A., Speizer, F. E. and Ascherio, A. (2001) Cigarette smoking and the incidence of Parkinson's disease in two prospective studies. *Ann Neurol*, 50, 780-786.
- Herrera, A., Munoz, P., Steinbusch, H. W. M. and Segura-Aguilar, J. (2017) Are Dopamine Oxidation Metabolites Involved in the Loss of Dopaminergic Neurons in the Nigrostriatal System in Parkinson's Disease? *ACS Chem Neurosci*, 8, 702-711.
- Hertz, L., Xu, J., Song, D., Du, T., Li, B., Yan, E. and Peng, L. (2015) Astrocytic glycogenolysis: mechanisms and functions. *Metab Brain Dis*, 30, 317-333.
- Hirsch, E., Graybiel, A. M. and Agid, Y. A. (1988) Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature*, 334, 345-348.
- Hirsch, E. C. (1992) Why are nigral catecholaminergic neurons more vulnerable than other cells in Parkinson's disease? *Ann Neurol*, 32 Suppl, S88-93.
- Hirsch, E. C. (1993) Does oxidative stress participate in nerve cell death in Parkinson's disease? *Eur Neurol*, 33 Suppl 1, 52-59.
- Hirsch, E. C. (2009) Iron transport in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 15 Suppl 3, S209-211.
- Hirsch, E. C., Breidert, T., Rousset, E., Hunot, S., Hartmann, A. and Michel, P. P. (2003a) The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 991, 214-228.
- Hirsch, E. C., Faucheux, B., Damier, P., Mouatt-Prigent, A. and Agid, Y. (1997) Neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 50, 79-88.
- Hirsch, E. C. and Faucheux, B. A. (1998) Iron metabolism and Parkinson's disease. *Mov Disord*, 13 Suppl 1, 39-45.
- Hirsch, E. C., Hoglinger, G., Rousset, E. *et al.* (2003b) Animal models of Parkinson's disease in rodents induced by toxins: an update. *J Neural Transm Suppl*, 89-100.
- Hirsch, E. C. and Hunot, S. (2009) Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol*, 8, 382-397.
- Hirsch, E. C., Hunot, S., Faucheux, B., Agid, Y., Mizuno, Y., Mochizuki, H., Tatton, W. G., Tatton, N. and Olanow, W. C. (1999) Dopaminergic neurons degenerate by apoptosis in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 14, 383-385.
- Hirsch, E. C., Vyas, S. and Hunot, S. (2012) Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 18 Suppl 1, S210-212.
- Honer, M., Hengerer, B., Blagoev, M., Hintermann, S., Waldmeier, P., Schubiger, P. A. and Ametamey, S. M. (2006) Comparison of [18F]FDOPA, [18F]FMT and [18F]FECNT for imaging dopaminergic neurotransmission in mice. *Nucl Med Biol*, 33, 607-614.
- Huang, Z., de la Fuente-Fernandez, R. and Stoessl, A. J. (2003) Etiology of Parkinson's disease. *Can J Neurol Sci*, 30 Suppl 1, S10-18.
- Hurelbrink, C. B., Armstrong, R. J., Luheshi, L. M., Dunnett, S. B., Rosser, A. E. and Barker, R. A. (2001) Death of dopaminergic neurons in vitro and in nigral grafts: reevaluating the role of caspase activation. *Exp Neurol*, 171, 46-58.
- Hurelbrink, C. B. and Barker, R. A. (2001) Prospects for the treatment of Parkinson's disease using neurotrophic factors. *Expert Opin Pharmacother*, 2, 1531-1543.

I

- Iannaccone, S., Cerami, C., Alessio, M., Garibotto, V., Panzacchi, A., Olivieri, S., Gelsomino, G., Moresco, R. M. and Perani, D. (2013) In vivo microglia activation in very early dementia with Lewy bodies, comparison with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 19, 47-52.
- Ishida, Y., Nagai, A., Kobayashi, S. and Kim, S. U. (2006) Upregulation of protease-activated receptor-1 in astrocytes in Parkinson disease: astrocyte-mediated neuroprotection through increased levels of glutathione peroxidase. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65, 66-77.
- Ishikawa, S., Taira, T., Niki, T., Takahashi-Niki, K., Maita, C., Maita, H., Ariga, H. and Iguchi-Ariga, S. M. (2009) Oxidative status of DJ-1-dependent activation of dopamine synthesis through

interaction of tyrosine hydroxylase and 4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) decarboxylase with DJ-1. *J Biol Chem*, 284, 28832-28844.

J

Jackson-Lewis, V. and Przedborski, S. (2007) Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nat Protoc*, 2, 141-151.

Jankovic, J. and Stacy, M. (2007) Medical management of levodopa-associated motor complications in patients with Parkinson's disease. *CNS Drugs*, 21, 677-692.

Jarry, M., Diallo, M., Lecointre, C. *et al.* (2010) The vasoactive peptides urotensin II and urotensin II-related peptide regulate astrocyte activity through common and distinct mechanisms: involvement in cell proliferation. *Biochem J*, 428, 113-124.

Jenner, P. (2003) Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 53 Suppl 3, S26-36; discussion S36-28.

Johnston, L. C., Su, X., Maguire-Zeiss, K. *et al.* (2008) Human interleukin-10 gene transfer is protective in a rat model of Parkinson's disease. *Mol Ther*, 16, 1392-1399.

k

Kaddour, H., Hamdi, Y., Vaudry, D. *et al.* (2013) The octadecaneuropeptide ODN prevents 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of cerebellar granule neurons through a PKC-MAPK-dependent pathway. *J Neurochem*, 125, 620-633.

Kaidery, N. A., Banerjee, R., Yang, L. *et al.* (2013) Targeting Nrf2-mediated gene transcription by extremely potent synthetic triterpenoids attenuate dopaminergic neurotoxicity in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*, 18, 139-157.

Katsura, M. and Ohkuma, S. (2005) Functional proteins involved in regulation of intracellular Ca(2+) for drug development: chronic nicotine treatment upregulates L-type high voltage-gated calcium channels. *J Pharmacol Sci*, 97, 344-347.

Katsura, M., Shuto, K., Mohri, Y., Tsujimura, A., Shibata, D., Tachi, M. and Ohkuma, S. (2004) Continuous exposure to nitric oxide enhances diazepam binding inhibitor mRNA expression in mouse cerebral cortical neurons. *Brain Res Mol Brain Res*, 124, 29-39.

Kaur, D., Peng, J., Chinta, S. J., Rajagopalan, S., Di Monte, D. A., Cherny, R. A. and Andersen, J. K. (2007) Increased murine neonatal iron intake results in Parkinson-like neurodegeneration with age. *Neurobiol Aging*, 28, 907-913.

Kavaliers, M. and Hirst, M. (1986) An octadecaneuropeptide (ODN) derived from diazepam binding inhibitor increases aggressive interactions in mice. *Brain Res*, 383, 343-349.

Keeney, P. M., Xie, J., Capaldi, R. A. and Bennett, J. P., Jr. (2006) Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J Neurosci*, 26, 5256-5264.

Kelly, P. J., Ahlskog, J. E., Goerss, S. J., Daube, J. R., Duffy, J. R. and Kall, B. A. (1987a) Computer-assisted stereotactic ventralis lateralis thalamotomy with microelectrode recording control in patients with Parkinson's disease. *Mayo Clin Proc*, 62, 655-664.

Kelly, P. J., Dumas-Duport, C., Scheithauer, B. W., Kall, B. A. and Kispert, D. B. (1987b) Stereotactic histologic correlations of computed tomography- and magnetic resonance imaging-defined abnormalities in patients with glial neoplasms. *Mayo Clin Proc*, 62, 450-459.

Kerr, J. F. (2002) History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, 181-182, 471-474.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-257.

Kilarski, L. L., Pearson, J. P., Newsway, V. *et al.* (2012) Systematic review and UK-based study of PARK2 (parkin), PINK1, PARK7 (DJ-1) and LRRK2 in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord*, 27, 1522-1529.

Kirschuk, S., Heja, L., Kardos, J. and Billups, B. (2016) Astrocyte sodium signaling and the regulation of neurotransmission. *Glia*, 64, 1655-1666.

- Klockgether, T., Loschmann, P. A. and Wullner, U. (1994) New medical and surgical treatments for Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*, 7, 346-352.
- Kolmer, M., Alho, H., Costa, E. and Pani, L. (1993) Cloning and tissue-specific functional characterization of the promoter of the rat diazepam binding inhibitor, a peptide with multiple biological actions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 8439-8443.
- Kolmer, M., Roos, C., Tirronen, M., Myohanen, S. and Alho, H. (1994) Tissue-specific expression of the diazepam-binding inhibitor in *Drosophila melanogaster*: cloning, structure, and localization of the gene. *Mol Cell Biol*, 14, 6983-6995.
- Kolmer, M., Rovio, A. and Alho, H. (1995) The characterization of two diazepam binding inhibitor (DBI) transcripts in humans. *Biochem J*, 306 (Pt 2), 327-330.
- Kumar, A., Huang, Z. and de la Fuente-Fernandez, R. (2003) Mechanisms of motor complications in treatment of Parkinson's disease. *Adv Neurol*, 91, 193-201.

L

- Lacor, P., Gandolfo, P., Tonon, M. C., Brault, E., Dalibert, I., Schumacher, M., Benavides, J. and Ferzaz, B. (1999) Regulation of the expression of peripheral benzodiazepine receptors and their endogenous ligands during rat sciatic nerve degeneration and regeneration: a role for PBR in neurosteroidogenesis. *Brain Res*, 815, 70-80.
- Lafon-Cazal, M., Adjali, O., Galeotti, N., Poncet, J., Jouin, P., Homburger, V., Bockaert, J. and Marin, P. (2003) Proteomic analysis of astrocytic secretion in the mouse. Comparison with the cerebrospinal fluid proteome. *J Biol Chem*, 278, 24438-24448.
- Lamacz, M., Tonon, M. C., Smih-Rouet, F., Patte, C., Gasque, P., Fontaine, M. and Vaudry, H. (1996) The endogenous benzodiazepine receptor ligand ODN increases cytosolic calcium in cultured rat astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res*, 37, 290-296.
- Lanfray, D., Arthaud, S., Ouellet, J. *et al.* (2013) Gliotransmission and brain glucose sensing: critical role of endozepines. *Diabetes*, 62, 801-810.
- Lee, H. J., Kim, C. and Lee, S. J. (2010a) Alpha-synuclein stimulation of astrocytes: Potential role for neuroinflammation and neuroprotection. *Oxid Med Cell Longev*, 3, 283-287.
- Lee, H. J., Suk, J. E., Patrick, C., Bae, E. J., Cho, J. H., Rho, S., Hwang, D., Masliah, E. and Lee, S. J. (2010b) Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. *J Biol Chem*, 285, 9262-9272.
- Lee, M., Sparatore, A., Del Soldato, P., McGeer, E. and McGeer, P. L. (2010c) Hydrogen sulfide-releasing NSAIDs attenuate neuroinflammation induced by microglial and astrocytic activation. *Glia*, 58, 103-113.
- Leenders, K. L. (1997) PET modifications after surgery for Parkinson's disease. *Adv Neurol*, 74, 271-279.
- Leenders, K. L., Salmon, E. P., Tyrrell, P., Perani, D., Brooks, D. J., Sager, H., Jones, T., Marsden, C. D. and Frackowiak, R. S. (1990) The nigrostriatal dopaminergic system assessed in vivo by positron emission tomography in healthy volunteer subjects and patients with Parkinson's disease. *Arch Neurol*, 47, 1290-1298.
- Lees, A. J., Tolosa, E. and Olanow, C. W. (2015) Four pioneers of L-dopa treatment: Arvid Carlsson, Oleh Hornykiewicz, George Cotzias, and Melvin Yahr. *Mov Disord*, 30, 19-36.
- Leprince, J., Cosquer, D., Bellemere, G., Chatenet, D., Tollemer, H., Jegou, S., Tonon, M. C. and Vaudry, H. (2006) Catabolism of the octadecanuropeptide ODN by prolyl endopeptidase: identification of an unusual cleavage site. *Peptides*, 27, 1561-1569.
- Leprince, J., Oulyadi, H., Vaudry, D. *et al.* (2001) Synthesis, conformational analysis and biological activity of cyclic analogs of the octadecanuropeptide ODN. Design of a potent endozepine antagonist. *Eur J Biochem*, 268, 6045-6057.
- Lesage, S., Drouet, V., Majounie, E. *et al.* (2016) Loss of VPS13C Function in Autosomal-Recessive Parkinsonism Causes Mitochondrial Dysfunction and Increases PINK1/Parkin-Dependent Mitophagy. *Am J Hum Genet*, 98, 500-513.
- Lesage, S., Durr, A., Tazir, M., Lohmann, E., Leutenegger, A. L., Janin, S., Pollak, P., Brice, A. and French Parkinson's Disease Genetics Study, G. (2006) LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs. *N Engl J Med*, 354, 422-423.

- Levitt, P., Pintar, J. E. and Breakefield, X. O. (1982) Immunocytochemical demonstration of monoamine oxidase B in brain astrocytes and serotonergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 6385-6389.
- LeWitt, P. A. and Fahn, S. (2016) Levodopa therapy for Parkinson disease: A look backward and forward. *Neurology*, 86, S3-12.
- LeWitt, P. A. and Taylor, D. C. (2008) Protection against Parkinson's disease progression: clinical experience. *Neurotherapeutics*, 5, 210-225.
- Li, F., Zhu, S., Wu, C., Yan, C., Liu, Y. and Shugan, L. (2011) Neuroinflammation and cell therapy for Parkinson's disease. *Front Biosci (Schol Ed)*, 3, 1407-1420.
- Lihmann, I., Plaquevent, J. C., Tostivint, H., Rajmakers, R., Tonon, M. C., Conlon, J. M. and Vaudry, H. (1994) Frog diazepam-binding inhibitor: peptide sequence, cDNA cloning, and expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 6899-6903.
- Limousin-Dowsey, P., Pollak, P., Van Blercom, N., Krack, P., Benazzouz, A. and Benabid, A. (1999) Thalamic, subthalamic nucleus and internal pallidum stimulation in Parkinson's disease. *J Neurol*, 246 Suppl 2, II42-45.
- Lin T. K., Liou C. W., Chen S. D., Chuang Y. C., Tiao M. M., Wang P. W., Chen J. B., Chuang J. H. (2009) Mitochondrial dysfunction and biogenesis in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Chang Gung Med J*, 32(6):589-99.
- Linazasoro, G. and Leenders, K. L. (2004) PET studies and physiopathology of motor fluctuations in Parkinson's disease. *Brain*, 127, E15; author reply E16.
- Lindholm, P., Voutilainen, M. H., Lauren, J. *et al.* (2007) Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. *Nature*, 448, 73-77.
- Liu, M., Zhang, T. Y. and Xu, W. H. (2005) A cDNA encoding diazepam-binding inhibitor/acyl-CoA-binding protein in *Helicoverpa armigera*: molecular characterization and expression analysis associated with pupal diapause. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 141, 168-176.
- Lohmann, E., Dursun, B., Lesage, S. *et al.* (2012) Genetic bases and phenotypes of autosomal recessive Parkinson disease in a Turkish population. *Eur J Neurol*, 19, 769-775.
- Loomis, W. F., Behrens, M. M., Williams, M. E. and Anjard, C. (2010) Pregnenolone sulfate and cortisol induce secretion of acyl-CoA-binding protein and its conversion into endozepines from astrocytes. *J Biol Chem*, 285, 21359-21365.
- Love, S. (1999) Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol*, 9, 119-131.
- Lu, B., Yokoyama, M., Dreyfus, C. F. and Black, I. B. (1991) NGF gene expression in actively growing brain glia. *J Neurosci*, 11, 318-326.
- Luchtman, D. W., Shao, D. and Song, C. (2009) Behavior, neurotransmitters and inflammation in three regimens of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Physiol Behav*, 98, 130-138.
- Ludewig, A. H., Klapper, M., Wabitsch, M., Doring, F. and Nitz, I. (2011a) Differential expression of alternative Acyl-CoA binding protein (ACBP) transcripts in an inducible human preadipocyte cell line. *Horm Metab Res*, 43, 440-442.
- Ludewig, A. H., Nitz, I., Klapper, M. and Doring, F. (2011b) Identification of a novel human Acyl-CoA binding protein isoform with a unique C-terminal domain. *IUBMB Life*, 63, 547-552.
- Luquin, M. R. (1997) [Surgical therapy of Parkinson's disease]. *Rev Neurol*, 25 Suppl 2, S180-184.
- Lv, E., Deng, J., Yu, Y., Wang, Y., Gong, X., Jia, J. and Wang, X. (2015) Nrf2-ARE signals mediated the anti-oxidative action of electroacupuncture in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Free Radic Res*, 49, 1296-1307.
- Lyden, A., Larsson, B. S. and Lindquist, N. G. (1984) Melanin affinity of manganese. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 55, 133-138.

M

- Ma, C. L., Su, L., Xie, J. J., Long, J. X., Wu, P. and Gu, L. (2014) The prevalence and incidence of Parkinson's disease in China: a systematic review and meta-analysis. *J Neural Transm (Vienna)*, 121, 123-134.

- MacAulay, N., Hamann, S. and Zeuthen, T. (2004) Water transport in the brain: role of cotransporters. *Neuroscience*, 129, 1031-1044.
- Malagon, M., Vallarino, M., Tonon, M. C. and Vaudry, H. (1992) Localization and characterization of diazepam-binding inhibitor (DBI)-like peptides in the brain and pituitary of the trout (*Salmo gairdneri*). *Brain Res*, 576, 208-214.
- Malagon, M., Vaudry, H., Van Strien, F., Pelletier, G., Gracia-Navarro, F. and Tonon, M. C. (1993) Ontogeny of diazepam-binding inhibitor-related peptides (endozepines) in the rat brain. *Neuroscience*, 57, 777-786.
- Mallajosyula, J. K., Kaur, D., Chinta, S. J., Rajagopalan, S., Rane, A., Nicholls, D. G., Di Monte, D. A., Macarthur, H. and Andersen, J. K. (2008) MAO-B elevation in mouse brain astrocytes results in Parkinson's pathology. *PLoS One*, 3, e1616.
- Mamczur, P., Borsuk, B., Paszko, J., Sas, Z., Mozrzymas, J., Wisniewski, J. R., Gizak, A. and Rakus, D. (2015) Astrocyte-neuron crosstalk regulates the expression and subcellular localization of carbohydrate metabolism enzymes. *Glia*, 63, 328-340.
- Manabe, Y., Toyoda, T., Kuroda, K., Imaizumi, M., Yamamoto, T. and Fushiki, T. (2001) Effect of diazepam binding inhibitor (DBI) on the fluid intake, preference and the taste reactivity in mice. *Behav Brain Res*, 126, 197-204.
- Mandir, A. S., Przedborski, S., Jackson-Lewis, V. *et al.* (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase activation mediates 1-methyl-4-phenyl-1, 2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 5774-5779.
- Mandrup, S., Hummel, R., Ravn, S., Jensen, G., Andreasen, P. H., Gregersen, N., Knudsen, J. and Kristiansen, K. (1992) Acyl-CoA-binding protein/diazepam-binding inhibitor gene and pseudogenes. A typical housekeeping gene family. *J Mol Biol*, 228, 1011-1022.
- Mandrup, S., Sorensen, R. V., Helledie, T., Nohr, J., Baldursson, T., Gram, C., Knudsen, J. and Kristiansen, K. (1998) Inhibition of 3T3-L1 adipocyte differentiation by expression of acyl-CoA-binding protein antisense RNA. *J Biol Chem*, 273, 23897-23903.
- Marchetti B, Abbracchio M. P. (2005) To be or not to be (inflamed) - is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Pharmacol Sci*, 26:517-25.
- Markey, S. P., Johannessen, J. N., Chiueh, C. C., Burns, R. S. and Herkenham, M. A. (1984) Intra-neuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature*, 311, 464-467.
- Marti-Masso, J. F., Poza, J. J. and Lopez de Munain, A. (1996) Drugs inducing or aggravating parkinsonism: a review. *Therapie*, 51, 568-577.
- Martinez-Martin, P., Rodriguez-Blazquez, C., Forjaz, M. J. and Kurtis, M. M. (2015) Impact of Pharmacotherapy on Quality of Life in Patients with Parkinson's Disease. *CNS Drugs*, 29, 397-413.
- Masmoudi-Kouki, O., Douiri, S., Hamdi, Y. *et al.* (2011) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects astroglial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *J Neurochem*, 117, 403-411.
- Masmoudi-Kouki, O., Gandolfo, P., Leprince, J., Vaudry, D., Pelletier, G., Fournier, A., Vaudry, H. and Tonon, M. C. (2006) PACAP stimulates biosynthesis and release of endozepines from rat astrocytes. *Ann N Y Acad Sci*, 1070, 411-416.
- Masmoudi, O., Gandolfo, P., Leprince, J., Vaudry, D., Fournier, A., Patte-Mensah, C., Vaudry, H. and Tonon, M. C. (2003) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates endozepine release from cultured rat astrocytes via a PKA-dependent mechanism. *FASEB J*, 17, 17-27.
- Masmoudi, O., Gandolfo, P., Tokay, T., Leprince, J., Ravni, A., Vaudry, H. and Tonon, M. C. (2005) Somatostatin down-regulates the expression and release of endozepines from cultured rat astrocytes via distinct receptor subtypes. *J Neurochem*, 94, 561-571.
- Matsuda, K., Kojima, K., Wada, K., Maruyama, K., Leprince, J., Tonon, M. C., Uchiyama, M. and Vaudry, H. (2010) The anorexigenic action of the octadecaneuropeptide (ODN) in goldfish is mediated through the MC4R- and subsequently the CRH receptor-signaling pathways. *J Mol Neurosci*, 42, 74-79.

- Matsuda, K., Wada, K., Miura, T., Maruyama, K., Shimakura, S. I., Uchiyama, M., Leprince, J., Tonon, M. C. and Vaudry, H. (2007) Effect of the diazepam-binding inhibitor-derived peptide, octadecaneuropeptide, on food intake in goldfish. *Neuroscience*, 150, 425-432.
- Matsumoto, S., Yoshiga, T., Yokoyama, N. *et al.* (2001) Characterization of acyl-CoA-binding protein (ACBP) in the pheromone gland of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 31, 603-609.
- McGeer, E. G. and McGeer, P. L. (2007) The role of anti-inflammatory agents in Parkinson's disease. *CNS Drugs*, 21, 789-797.
- McGeer, P. L., Itagaki, S., Boyes, B. E. and McGeer, E. G. (1988) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, 38, 1285-1291.
- McGeer, P. L. and McGeer, E. G. (2004) Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 10 Suppl 1, S3-7.
- McGeer, P. L. and McGeer, E. G. (2008) Glial reactions in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 23, 474-483.
- McNaught, K. S. and Jenner, P. (1999) Altered glial function causes neuronal death and increases neuronal susceptibility to 1-methyl-4-phenylpyridinium- and 6-hydroxydopamine-induced toxicity in astrocytic/ventral mesencephalic co-cultures. *J Neurochem*, 73, 2469-2476.
- McNaught, K. S., Olanow, C. W., Halliwell, B., Isacson, O. and Jenner, P. (2001) Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*, 2, 589-594.
- McNeill, T. H., Koek, L. L. and Haycock, J. W. (1984) The nigrostriatal system and aging. *Peptides*, 5 Suppl 1, 263-268.
- Mena, M. A., de Bernardo, S., Casarejos, M. J., Canals, S. and Rodriguez-Martin, E. (2002) The role of astroglia on the survival of dopamine neurons. *Mol Neurobiol*, 25, 245-263.
- Meng, F., Wang, J., Ding, F., Xie, Y., Zhang, Y. and Zhu, J. (2017) Neuroprotective effect of matrine on MPTP-induced Parkinson's disease and on Nrf2 expression. *Oncol Lett*, 13, 296-300.
- Meredith, G. E., Totterdell, S., Potashkin, J. A. and Surmeier, D. J. (2008) Modeling PD pathogenesis in mice: advantages of a chronic MPTP protocol. *Parkinsonism Relat Disord*, 14 Suppl 2, S112-115.
- Miachon, S., Tonon, M. C., Vaudry, H. and Buda, M. (1991) Quantitative evaluation of octadecaneuropeptide-like immunoreactivity in hippocampus, cortex and cerebellum of long-term isolated male Wistar rats. *Neuropeptides*, 19, 179-182.
- Middeldorp, J. and Hol, E. M. (2011) GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol*, 93, 421-443.
- Miklossy, J., Arai, T., Guo, J. P., Klegeris, A., Yu, S., McGeer, E. G. and McGeer, P. L. (2006) LRRK2 expression in normal and pathologic human brain and in human cell lines. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65, 953-963.
- Miller, J. A., Trout, B. R., Sullivan, K. A., Bialecki, R. A., Roberts, R. A. and Tjalkens, R. B. (2011) Low-dose 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine causes inflammatory activation of astrocytes in nuclear factor-kappaB reporter mice prior to loss of dopaminergic neurons. *J Neurosci Res*, 89, 406-417.
- Mishra, M. K., Koli, P., Bhowmick, S. and Basu, A. (2007) Neuroprotection conferred by astrocytes is insufficient to protect animals from succumbing to Japanese encephalitis. *Neurochem Int*, 50, 764-773.
- Mitchell, I. J., Cross, A. J., Sambrook, M. A. and Crossman, A. R. (1985) Sites of the neurotoxic action of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the macaque monkey include the ventral tegmental area and the locus coeruleus. *Neurosci Lett*, 61, 195-200.
- Mitchell, I. J., Cross, A. J., Sambrook, M. A. and Crossman, A. R. (1986) N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in the monkey: neurochemical pathology and regional brain metabolism. *J Neural Transm Suppl*, 20, 41-46.
- Miyamoto, T. (2012) [Olfactory dysfunction in Parkinson disease and REM sleep behavior disorder]. *Brain Nerve*, 64, 356-363.
- Miyazaki, I. and Asanuma, M. (2017) Therapeutic Strategy of Targeting Astrocytes for Neuroprotection in Parkinson's Disease. *Curr Pharm Des*.

- Mocchetti, I., Einstein, R. and Brosius, J. (1986) Putative diazepam binding inhibitor peptide: cDNA clones from rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 7221-7225.
- Mocchetti, I. and Santi, M. R. (1991) Diazepam binding inhibitor peptide: cloning and gene expression. *Neuropharmacology*, 30, 1365-1371.
- Mochizuki H, Mori H, Mizuno Y. (1997) Apoptosis in neurodegenerative disorders. *J Neural Transm*, 50:125-40.
- Mogensen, I. B., Schulenberg, H., Hansen, H. O., Spener, F. and Knudsen, J. (1987) A novel acyl-CoA-binding protein from bovine liver. Effect on fatty acid synthesis. *Biochem J*, 241, 189-192.
- Mogi, M., Harada, M., Kondo, T., Mizuno, Y., Narabayashi, H., Riederer, P. and Nagatsu, T. (1996a) The soluble form of Fas molecule is elevated in parkinsonian brain tissues. *Neurosci Lett*, 220, 195-198.
- Mogi, M., Harada, M., Narabayashi, H., Inagaki, H., Minami, M. and Nagatsu, T. (1996b) Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 211, 13-16.
- Mogi, M., Kondo, T., Mizuno, Y. and Nagatsu, T. (2007) p53 protein, interferon-gamma, and NF-kappaB levels are elevated in the parkinsonian brain. *Neurosci Lett*, 414, 94-97.
- Mogi, M. and Nagatsu, T. (1999) Neurotrophins and cytokines in Parkinson's disease. *Adv Neurol*, 80, 135-139.
- Mogi, M., Togari, A., Kondo, T., Mizuno, Y., Komure, O., Kuno, S., Ichinose, H. and Nagatsu, T. (1999) Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 270, 45-48.
- Moisan, F., Spinosi, J., Delabre, L. *et al.* (2015) Association of Parkinson's Disease and Its Subtypes with Agricultural Pesticide Exposures in Men: A Case-Control Study in France. *Environ Health Perspect*, 123, 1123-1129.
- Montastruc, J. L., Sommet, A., Olivier, P. *et al.* (2006) [Drugs, Parkinson's disease and parkinsonian syndroms: recent advances in pharmacovigilance]. *Therapie*, 61, 29-38.
- Monti, B., Polazzi, E., Batti, L., Crochemore, C., Virgili, M. and Contestabile, A. (2007) Alpha-synuclein protects cerebellar granule neurons against 6-hydroxydopamine-induced death. *J Neurochem*, 103, 518-530.
- Moreira, S., Fonseca, I., Nunes, M. J. *et al.* (2017) Nrf2 activation by tauroursodeoxycholic acid in experimental models of Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 295, 77-87.
- Mori, F., Tanji, K., Zhang, H., Kakita, A., Takahashi, H. and Wakabayashi, K. (2008) alpha-Synuclein pathology in the neostriatum in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*, 115, 453-459.
- Mukherjee, U. A., Ong, S. B., Ong, S. G. and Hausenloy, D. J. (2015) Parkinson's disease proteins: Novel mitochondrial targets for cardioprotection. *Pharmacol Ther*, 156, 34-43.
- Muller, T. (2015) Catechol-O-methyltransferase inhibitors in Parkinson's disease. *Drugs*, 75, 157-174.
- Muranyi, M. and Lacza, Z. (2007) [Astrocytes in health and disease]. *Orv Hetil*, 148, 697-702.
- Mythri, R. B., Venkateshappa, C., Harish, G., Mahadevan, A., Muthane, U. B., Yasha, T. C., Srinivas Bharath, M. M. and Shankar, S. K. (2011) Evaluation of markers of oxidative stress, antioxidant function and astrocytic proliferation in the striatum and frontal cortex of Parkinson's disease brains. *Neurochem Res*, 36, 1452-1463.

N

- Nagane, K., Kitada, M., Wakao, S., Dezawa, M. and Tabata, Y. (2009) Practical induction system for dopamine-producing cells from bone marrow stromal cells using spermine-pullulan-mediated reverse transfection method. *Tissue Eng Part A*, 15, 1655-1665.
- Nagatsu, T., Mogi, M., Ichinose, H. and Togari, A. (2000a) Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 277-290.
- Nagatsu, T., Mogi, M., Ichinose, H. and Togari, A. (2000b) Cytokines in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 143-151.

- Neess, D., Bloksgaard, M., Bek, S. *et al.* (2011) Disruption of the acyl-CoA-binding protein gene delays hepatic adaptation to metabolic changes at weaning. *J Biol Chem*, 286, 3460-3472.
- Niranjan, R. (2014) The role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease: focus on astrocytes. *Mol Neurobiol*, 49, 28-38.
- Nitz, I., Doring, F., Schrezenmeir, J. and Burwinkel, B. (2005) Identification of new acyl-CoA binding protein transcripts in human and mouse. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 2395-2405.
- Nitz, I., Kruse, M. L., Klapper, M. and Doring, F. (2011) Specific regulation of low-abundance transcript variants encoding human Acyl-CoA binding protein (ACBP) isoforms. *J Cell Mol Med*, 15, 909-927.
- Noelker, C., Bacher, M., Gocke, P., Wei, X., Klockgether, T., Du, Y. and Dodel, R. (2005) The flavanoid caffeic acid phenethyl ester blocks 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Neurosci Lett*, 383, 39-43.
- Noelker, C., Morel, L., Osterloh, A. *et al.* (2014) Heat shock protein 60: an endogenous inducer of dopaminergic cell death in Parkinson disease. *J Neuroinflammation*, 11, 86.

O

- Oberheim, N. A., Goldman, S. A. and Nedergaard, M. (2012) Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol Biol*, 814, 23-45.
- Ohkuma, S., Katsura, M. and Tsujimura, A. (2001) Alterations in cerebral diazepam binding inhibitor expression in drug dependence: a possible biochemical alteration common to drug dependence. *Life Sci*, 68, 1215-1222.
- Olanow C. W, Stern M. B, Sethi K. (2009) The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease. *Neurology*, 26; 72-136.
- Owens, G. P., Sinha, A. K., Sikela, J. M. and Hahn, W. E. (1989) Sequence and expression of the murine diazepam binding inhibitor. *Brain Res Mol Brain Res*, 6, 101-108.

P

- Parker, W. D., Jr., Boyson, S. J. and Parks, J. K. (1989) Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 26, 719-723.
- Parpura, V., Fisher, E. S., Lechleiter, J. D., Schousboe, A., Waagepetersen, H. S., Brunet, S., Baltan, S. and Verkhratsky, A. (2017) Glutamate and ATP at the Interface Between Signaling and Metabolism in Astroglia: Examples from Pathology. *Neurochem Res*, 42, 19-34.
- Parpura, V. and Verkhratsky, A. (2012a) The astrocyte excitability brief: from receptors to gliotransmission. *Neurochem Int*, 61, 610-621.
- Parpura, V. and Verkhratsky, A. (2012b) Astrocytes revisited: concise historic outlook on glutamate homeostasis and signaling. *Croat Med J*, 53, 518-528.
- Parpura, V. and Verkhratsky, A. (2012c) Homeostatic function of astrocytes: Ca(2+) and Na(+) signalling. *Transl Neurosci*, 3, 334-344.
- Patte, C., Gandolfo, P., Leprince, J., Thoumas, J. L., Fontaine, M., Vaudry, H. and Tonon, M. C. (1999) GABA inhibits endozepine release from cultured rat astrocytes. *Glia*, 25, 404-411.
- Patte, C., Vaudry, H., Desrues, L., Gandolfo, P., Strijdveen, I., Lamacz, M. and Tonon, M. C. (1995) The endozepine ODN stimulates polyphosphoinositide metabolism in rat astrocytes. *FEBS Lett*, 362, 106-110.
- Pekny, M. and Pekna, M. (2016) Reactive gliosis in the pathogenesis of CNS diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1862, 483-491.
- Pekny, M., Pekna, M., Messing, A., Steinhäuser, C., Lee, J. M., Parpura, V., Hol, E. M., Sofroniew, M. V. and Verkhratsky, A. (2016) Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol*, 131, 323-345.
- Pekny, M., Wilhelmsson, U. and Pekna, M. (2014) The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci Lett*, 565, 30-38.

- Peng, J., Peng, L., Stevenson, F. F., Doctrow, S. R. and Andersen, J. K. (2007) Iron and paraquat as synergistic environmental risk factors in sporadic Parkinson's disease accelerate age-related neurodegeneration. *J Neurosci*, 27, 6914-6922.
- Perea, G., Sur, M. and Araque, A. (2014) Neuron-glia networks: integral gear of brain function. *Front Cell Neurosci*, 8, 378.
- Peter, M. E., Heufelder, A. E. and Hengartner, M. O. (1997) Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 12736-12737.
- Pineda-Trujillo, N., Apergi, M., Moreno, S. *et al.* (2006) A genetic cluster of early onset Parkinson's disease in a Colombian population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 141B, 885-889.
- Pluck, G. C. and Brown, R. G. (2002) Apathy in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 73, 636-642.
- Plun-Favreau, H., Gandhi, S., Wood-Kaczmar, A., Deas, E., Yao, Z. and Wood, N. W. (2008) What have PINK1 and HtrA2 genes told us about the role of mitochondria in Parkinson's disease? *Ann N Y Acad Sci*, 1147, 30-36.
- Polazzi, E., Altamira, L. E., Eleuteri, S., Barbaro, R., Casadio, C., Contestabile, A. and Monti, B. (2009) Neuroprotection of microglial conditioned medium on 6-hydroxydopamine-induced neuronal death: role of transforming growth factor beta-2. *J Neurochem*, 110, 545-556.
- Polymeropoulos M. H, Lavedan C, Leroy E, Ide S. E, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos E. S, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson W. G, Lazzarini A. M, Duvoisin R. C, Di Iorio G, Golbe L. I, Nussbaum R. L. (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276, 2045-2047.
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J. and Valko, M. (2017) Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends Pharmacol Sci*, 38, 592-607.
- Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Djaldetti, R., Liberatore, G., Vila, M., Vukosavic, S. and Almer, G. (2000) The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism. *Restor Neurol Neurosci*, 16, 135-142.
- Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Kostic, V., Carlson, E., Epstein, C. J. and Cadet, J. L. (1992a) Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in copper/zinc-superoxide dismutase transgenic mice. *J Neurochem*, 58, 1760-1767.
- Przedborski, S., Kostic, V., Jackson-Lewis, V., Naini, A. B., Simonetti, S., Fahn, S., Carlson, E., Epstein, C. J. and Cadet, J. L. (1992b) Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity are resistant to N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *J Neurosci*, 12, 1658-1667.
- Przedborski, S. and Levivier, M. (1992) [Current therapeutic approach in Parkinson disease]. *Rev Med Brux*, 13, 360-366.
- Przedborski, S. and Vila, M. (2003) The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 991, 189-198.
- Purisai, M. G., McCormack, A. L., Langston, W. J., Johnston, L. C. and Di Monte, D. A. (2005) Alpha-synuclein expression in the substantia nigra of MPTP-lesioned non-human primates. *Neurobiol Dis*, 20, 898-906.

Q

- Qian, Z., Bilderback, T. R. and Barmack, N. H. (2008) Acyl coenzyme A-binding protein (ACBP) is phosphorylated and secreted by retinal Muller astrocytes following protein kinase C activation. *J Neurochem*, 105, 1287-1299.

R

- Rappold, P. M. and Tieu, K. (2010) Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease. *Neurotherapeutics*, 7, 413-423.
- Rascol, O., Perez-Lloret, S. and Ferreira, J. J. (2015) New treatments for levodopa-induced motor complications. *Mov Disord*, 30, 1451-1460.

- Rice, M. E., Forman, R. E., Chen, B. T., Avshalumov, M. V., Cragg, S. J. and Drew, K. L. (2002) Brain antioxidant regulation in mammals and anoxia-tolerant reptiles: balanced for neuroprotection and neuromodulation. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 133, 515-525.
- Rich, L. and Brown, A. M. (2016) Glycogen: Multiple Roles in the CNS. *Neuroscientist*.
- Rinne, J. O., Laihinen, A., Nagren, K., Bergman, J., Solin, O., Haaparanta, M., Ruotsalainen, U. and Rodriguez, M. C., Obeso, J. A. and Olanow, C. W. (1998) Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. *Ann Neurol*, 44, S175-188.
- Rojas, P., Rojas-Castaneda, J., Vigueras, R. M., Habeebu, S. S., Rojas, C., Rios, C. and Ebadi, M. (2000) MPTP decreases MT-I mRNA in mouse striatum. *Neurochem Res*, 25, 503-509.
- Rose, C. R. and Chatton, J. Y. (2016) Astrocyte sodium signaling and neuro-metabolic coupling in the brain. *Neuroscience*, 323, 121-134.
- Rose, C. R. and Verkhratsky, A. (2016) Principles of sodium homeostasis and sodium signalling in astroglia. *Glia*, 64, 1611-1627.
- Rose, T. M., Schultz, E. R., Sasaki, G. C., Kolattukudy, P. E. and Shoyab, M. (1994) Nucleotide sequence and genomic structure of duck acyl-CoA binding protein/diazepam-binding inhibitor: co-localization with S-acyl fatty acid synthase thioesterase. *DNA Cell Biol*, 13, 669-678.
- Rosen, M. B., Wilson, V. S., Schmid, J. E. and Gray, L. E. (2005) Gene expression analysis in the ventral prostate of rats exposed to vinclozolin or procymidone. *Reprod Toxicol*, 19, 367-379.
- Ross, O. A., Soto-Ortolaza, A. I., Heckman, M. G. *et al.* (2011) Association of LRRK2 exonic variants with susceptibility to Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol*, 10, 898-908.
- Rothstein, J. D., McKhann, G., Guarneri, P., Barbaccia, M. L., Guidotti, A. and Costa, E. (1989) Cerebrospinal fluid content of diazepam binding inhibitor in chronic hepatic encephalopathy. *Ann Neurol*, 26, 57-62.
- Rothwell, J. C. and Huang, Y. Z. (2003) Systems-level studies of movement disorders in dystonia and Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol*, 13, 691-695.
- Rouet-Smith, F., Tonon, M. C., Pelletier, G. and Vaudry, H. (1992) Characterization of endozepine-related peptides in the central nervous system and in peripheral tissues of the rat. *Peptides*, 13, 1219-1225.
- Ruberg, M., France-Lanord, V., Brugg, B. *et al.* (1997) [Neuronal death caused by apoptosis in Parkinson disease]. *Rev Neurol (Paris)*, 153, 499-508.
- Russ, H., Staust, K., Martel, F., Gliese, M. and Schomig, E. (1996) The extraneuronal transporter for monoamine transmitters exists in cells derived from human central nervous system glia. *Eur J Neurosci*, 8, 1256-1264.
- Ryan, B. J., Hoek, S., Fon, E. A. and Wade-Martins, R. (2015) Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease. *Trends Biochem Sci*, 40, 200-210.
- ## S
- Saito, Y., Miyasaka, T., Hatsuta, H. *et al.* (2014) Immunostaining of oxidized DJ-1 in human and mouse brains. *J Neuropathol Exp Neurol*, 73, 714-728.
- Salmina, A. B. (2009) Neuron-glia interactions as therapeutic targets in neurodegeneration. *J Alzheimers Dis*, 16, 485-502.
- Sandberg, M. B., Bloksgaard, M., Duran-Sandoval, D., Duval, C., Staels, B. and Mandrup, S. (2005) The gene encoding acyl-CoA-binding protein is subject to metabolic regulation by both sterol regulatory element-binding protein and peroxisome proliferator-activated receptor alpha in hepatocytes. *J Biol Chem*, 280, 5258-5266.
- Sandhu, J. K., Gardaneh, M., Iwasio, R., Lanthier, P., Gangaraju, S., Ribocco-Lutkiewicz, M., Tremblay, R., Kiuchi, K. and Sikorska, M. (2009) Astrocyte-secreted GDNF and glutathione antioxidant system protect neurons against 6OHDA cytotoxicity. *Neurobiol Dis*, 33, 405-414.
- Santangelo, G., Falco, F., D'Iorio, A. *et al.* (2016) Anxiety in early Parkinson's disease: Validation of the Italian observer-rated version of the Parkinson Anxiety Scale (OR-PAS). *J Neurol Sci*, 367, 158-161.

- Sarkar, S., Raymick, J. and Imam, S. (2016) Neuroprotective and Therapeutic Strategies against Parkinson's Disease: Recent Perspectives. *Int J Mol Sci*, 17.
- Sawle, G. V., Bloomfield, P. M., Bjorklund, A. *et al.* (1992) Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: PET [18F]6-L-fluorodopa studies in two patients with putaminal implants. *Ann Neurol*, 31, 166-173.
- Sayad, M., Zouambia, M., Chaouch, M. *et al.* (2016) Greater improvement in LRRK2 G2019S patients undergoing Subthalamic Nucleus Deep Brain Stimulation compared to non-mutation carriers. *BMC Neurosci*, 17, 6.
- Schapira, A. H., Cooper, J. M., Dexter, D., Jenner, P., Clark, J. B. and Marsden, C. D. (1989) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet*, 1, 1269.
- Schindler, A. and Foley, E. (2013) Hexokinase 1 blocks apoptotic signals at the mitochondria. *Cell Signal*, 25, 2685-2692.
- Schipper, H. M. (2004) Brain iron deposition and the free radical-mitochondrial theory of ageing. *Ageing Res Rev*, 3, 265-301.
- Schlossmacher, M. G., Frosch, M. P., Gai, W. P. *et al.* (2002) Parkin localizes to the Lewy bodies of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol*, 160, 1655-1667.
- Seaborn, T., Masmoudi-Kouli, O., Fournier, A., Vaudry, H. and Vaudry, D. (2011) Protective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) against apoptosis. *Curr Pharm Des*, 17, 204-214.
- Serra, P. A., Sciola, L., Delogu, M. R. *et al.* (2002) The neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induces apoptosis in mouse nigrostriatal glia. Relevance to nigral neuronal death and striatal neurochemical changes. *J Biol Chem*, 277, 34451-34461.
- Sharma, M., Ioannidis, J. P., Aasly, J. O. *et al.* (2012) A multi-centre clinico-genetic analysis of the VPS35 gene in Parkinson disease indicates reduced penetrance for disease-associated variants. *J Med Genet*, 49, 721-726.
- Sherer, T. B., Betarbet, R. and Greenamyre, J. T. (2001) Pesticides and Parkinson's disease. *ScientificWorldJournal*, 1, 207-208.
- Sherer, T. B. and Greenamyre, J. T. (2005) Oxidative damage in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*, 7, 627-629.
- Shin, E., Lisci, C., Tronci, E., Fidalgo, C., Stancampiano, R., Bjorklund, A. and Carta, M. (2014) The anti-dyskinetic effect of dopamine receptor blockade is enhanced in parkinsonian rats following dopamine neuron transplantation. *Neurobiol Dis*, 62, 233-240.
- Shin, S. W., Yun, S. H., Park, E. S., Jeong, J. S., Kwak, J. Y. and Park, J. I. (2015) Overexpression of PGC1 α enhances cell proliferation and tumorigenesis of HEK293 cells through the upregulation of Sp1 and Acyl-CoA binding protein. *Int J Oncol*, 46, 1328-1342.
- Shinoda, I., Furukawa, Y. and Furukawa, S. (1990) Stimulation of nerve growth factor synthesis/secretion by propentofylline in cultured mouse astroglial cells. *Biochem Pharmacol*, 39, 1813-1816.
- Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Wegrzynowicz, M., Lee, E., Bowman, A. B. and Aschner, M. (2011) Role of astrocytes in brain function and disease. *Toxicol Pathol*, 39, 115-123.
- Singleton, A. B., Farrer, M., Johnson, J. *et al.* (2003) alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*, 302, 841.
- Singleton, A. B., Farrer, M. J. and Bonifati, V. (2013) The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications. *Mov Disord*, 28, 14-23.
- Sirinathsinghji, D. J., Dunnett, S. B., Northrop, A. J. and Morris, B. J. (1990) Experimental hemiparkinsonism in the rat following chronic unilateral infusion of MPP⁺ into the nigrostriatal dopamine pathway--III. Reversal by embryonic nigral dopamine grafts. *Neuroscience*, 37, 757-766.
- Sirinathsinghji, D. J., Kupsch, A., Mayer, E., Zivin, M., Pufal, D. and Oertel, W. H. (1992) Cellular localization of tyrosine hydroxylase mRNA and cholecystokinin mRNA-containing cells in the ventral mesencephalon of the common marmoset: effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Brain Res Mol Brain Res*, 12, 267-274.

- Slobodyansky, E., Antkiewicz-Michaluk, L. and Martin, B. (1994) Purification of a novel DBI processing product, DBI39-75, and characterization of its binding site in rat brain. *Regul Pept*, 50, 29-35.
- Slobodyansky, E., Guidotti, A., Wambebe, C., Berkovich, A. and Costa, E. (1989) Isolation and characterization of a rat brain triakontatetrapeptide, a posttranslational product of diazepam binding inhibitor: specific action at the Ro 5-4864 recognition site. *J Neurochem*, 53, 1276-1284.
- Snyder, M. J. and Feyereisen, R. (1993) A diazepam binding inhibitor (DBI) homolog from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Mol Cell Endocrinol*, 94, R1-4.
- Sofroniew, M. V. (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*, 32, 638-647.
- Solano, R. M., Casarejos, M. J., Menendez-Cuervo, J., Rodriguez-Navarro, J. A., Garcia de Yébenes, J. and Mena, M. A. (2008) Glial dysfunction in parkin null mice: effects of aging. *J Neurosci*, 28, 598-611.
- Spillantini M. G, Schmidt M. L, Lee V. Y, Trojanowski J. Q, Jakes R., and Goedert M. (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839-840.
- Staal, R. G., Hogan, K. A., Liang, C. L., German, D. C. and Sonsalla, P. K. (2000) In vitro studies of striatal vesicles containing the vesicular monoamine transporter (VMAT2): rat versus mouse differences in sequestration of 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J Pharmacol Exp Ther*, 293, 329-335.
- Staal, R. G. and Sonsalla, P. K. (2000) Inhibition of brain vesicular monoamine transporter (VMAT2) enhances 1-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity in vivo in rat striata. *J Pharmacol Exp Ther*, 293, 336-342.
- Staal, R. G., Yang, J. M., Hait, W. N. and Sonsalla, P. K. (2001) Interactions of 1-methyl-4-phenylpyridinium and other compounds with P-glycoprotein: relevance to toxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Brain Res*, 910, 116-125.
- Stocchi, F. (2009) The therapeutic concept of continuous dopaminergic stimulation (CDS) in the treatment of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 15 Suppl 3, S68-71.
- Stocchi, F., Torti, M. and Fossati, C. (2016) Advances in dopamine receptor agonists for the treatment of Parkinson's disease. *Expert Opin Pharmacother*, 17, 1889-1902.
- Stoltenburg-Didinger, G., Punder, I., Peters, B., Marcinkowski, M., Herbst, H., Winneke, G. and Wiegand, H. (1996) Glial fibrillary acidic protein and RNA expression in adult rat hippocampus following low-level lead exposure during development. *Histochem Cell Biol*, 105, 431-442.
- Su, X. and Federoff, H. J. (2014) Immune responses in Parkinson's disease: interplay between central and peripheral immune systems. *Biomed Res Int*, 2014, 275178.
- Sun, Y., Sukumaran, P., Selvaraj, S., Cilz, N. I., Schaar, A., Lei, S. and Singh, B. B. (2016) TRPM2 Promotes Neurotoxin MPP+/MPTP-Induced Cell Death. *Mol Neurobiol*.
- Svennilson, E., Torvik, A., Lowe, R. and Leksell, L. (1960) Treatment of parkinsonism by stereotatic thermolesions in the pallidal region. A clinical evaluation of 81 cases. *Acta Psychiatr Scand*, 35, 358-377.
- Sweeney, P., Qi, Y., Xu, Z. and Yang, Y. (2016) Activation of hypothalamic astrocytes suppresses feeding without altering emotional states. *Glia*, 64, 2263-2273.
- Swerdlow, R. H., Parks, J. K., Davis, J. N., 2nd et al. (1998) Matrilineal inheritance of complex I dysfunction in a multigenerational Parkinson's disease family. *Ann Neurol*, 44, 873-881.
- Swinnen, J. V., Esquenet, M., Rosseels, J., Claessens, F., Rombauts, W., Heyns, W. and Verhoeven, G. (1996) A human gene encoding diazepam-binding inhibitor/acyl-CoA-binding protein: transcription and hormonal regulation in the androgen-sensitive human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *DNA Cell Biol*, 15, 197-208.
- Szczudlik, A. and Rudzinska, M. (2007) [Neuroprotective effect of dopamine agonists]. *Neurol Neurochir Pol*, 41, S22-28.

T

- Taira, T., Saito, Y., Niki, T., Iguchi-Ariga, S. M., Takahashi, K. and Ariga, H. (2004) DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep*, 5, 213-218.
- Tatton, N. A. (2000) Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 166, 29-43.
- Tatton, N. A., Maclean-Fraser, A., Tatton, W. G., Perl, D. P. and Olanow, C. W. (1998) A fluorescent double-labeling method to detect and confirm apoptotic nuclei in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 44, S142-148.
- Tatton, W. G., Chalmers-Redman, R., Brown, D. and Tatton, N. (2003) Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol*, 53 Suppl 3, S61-70; discussion S70-62.
- Testa, C. M., Sherer, T. B. and Greenamyre, J. T. (2005) Rotenone induces oxidative stress and dopaminergic neuron damage in organotypic substantia nigra cultures. *Brain Res Mol Brain Res*, 134, 109-118.
- Thobois, S., Fraix, V., Savasta, M. *et al.* (2003) Chronic subthalamic nucleus stimulation and striatal D2 dopamine receptors in Parkinson's disease--A [(11)C]-raclopride PET study. *J Neurol*, 250, 1219-1223.
- Thorne, R. G., Pronk, G. J., Padmanabhan, V. and Frey, W. H., 2nd (2004) Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience*, 127, 481-496.
- Todaro, G. J., Rose, T. M. and Shoyab, M. (1991) Human DBI (endozepine): relationship to a homologous membrane associated protein (MA-DBI). *Neuropharmacology*, 30, 1373-1380.
- Todd, S. and Naylor, S. L. (1992) New chromosomal mapping assignments for argininosuccinate synthetase pseudogene 1, interferon-beta 3 gene, and the diazepam binding inhibitor gene. *Somat Cell Mol Genet*, 18, 381-385.
- Tokay, T., Hachem, R., Masmoudi-Kouki, O. *et al.* (2008) Beta-amyloid peptide stimulates endozepine release in cultured rat astrocytes through activation of N-formyl peptide receptors. *Glia*, 56, 1380-1389.
- Tokay, T., Masmoudi, O., Gandolfo, P., Leprince, J., Pelletier, G., Vaudry, H. and Tonon, M. C. (2005) Beta-amyloid peptides stimulate endozepine biosynthesis in cultured rat astrocytes. *J Neurochem*, 94, 607-616.
- Tomiyama, H., Lesage, S., Tan, E. K. and Jeon, B. S. (2015) Familial Parkinson's disease/parkinsonism. *Biomed Res Int*, 2015, 736915.
- Tong, Y., Toranzo, D. and Pelletier, G. (1991) Localization of diazepam-binding inhibitor (DBI) mRNA in the rat brain by high resolution in situ hybridization. *Neuropeptides*, 20, 33-40.
- Tonon M. C., Leprince J., Gandolfo P., Compère V., Pelletier G., M., M. M. and H., a. V. (2006) Endozepines. in *Handbook of Biologically Active Peptides (Kastin A. J., ed.)*, Elsevier, New York., 813-819.
- Tonon, M. C., Desy, L., Nicolas, P., Vaudry, H. and Pelletier, G. (1990) Immunocytochemical localization of the endogenous benzodiazepine ligand octadecaneuropeptide (ODN) in the rat brain. *Neuropeptides*, 15, 17-24.
- Tonon, M. C., Lanfray, D., Castel, H., Vaudry, H. and Morin, F. (2013a) Hypothalamic glucose-sensing: role of Glia-to-neuron signaling. *Horm Metab Res*, 45, 955-959.
- Tonon, M. C., Leprince, J., Morin, F., Gandolfo, P., Compère, V., Pelletier, G. and *et al.* (2013b) Endozepines In *Handbook of Biologically Active Peptides. n: A.J. Kastin (Ed.)*, Elsevier, pp. 760-765.
- Trevor, A. J., Castagnoli, N., Jr., Caldera, P., Ramsay, R. R. and Singer, T. P. (1987a) Bioactivation of MPTP: reactive metabolites and possible biochemical sequelae. *Life Sci*, 40, 713-719.
- Trevor, A. J., Singer, T. P., Ramsay, R. R. and Castagnoli, N., Jr. (1987b) Processing of MPTP by monoamine oxidases: implications for molecular toxicology. *J Neural Transm Suppl*, 23, 73-89.
- Tsuboi, Y., Munemoto, H., Ishikawa, S., Matsumoto, K., Iguchi-Ariga, S. M. and Ariga, H. (2008) DJ-1, a causative gene product of a familial form of Parkinson's disease, is secreted through microdomains. *FEBS Lett*, 582, 2643-2649.

Turmel, H., Hartmann, A., Parain, K., Douhou, A., Srinivasan, A., Agid, Y. and Hirsch, E. C. (2001) Caspase-3 activation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mice. *Mov Disord*, 16, 185-189.

V

- Valko, M., Jomova, K., Rhodes, C. J., Kuca, K. and Musilek, K. (2016) Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol*, 90, 1-37.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 44-84.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160, 1-40.
- van Muiswinkel, F. L. and Kuiperij, H. B. (2005) The Nrf2-ARE Signalling pathway: promising drug target to combat oxidative stress in neurodegenerative disorders. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 4, 267-281.
- Vargas, M. R., Pehar, M., Cassina, P., Beckman, J. S. and Barbeito, L. (2006) Increased glutathione biosynthesis by Nrf2 activation in astrocytes prevents p75NTR-dependent motor neuron apoptosis. *J Neurochem*, 97, 687-696.
- Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Bourgault, S. *et al.* (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev*, 61, 283-357.
- Vaughan, J. R., Davis, M. B. and Wood, N. W. (2001) Genetics of Parkinsonism: a review. *Ann Hum Genet*, 65, 111-126.
- Venkateshappa, C., Harish, G., Mahadevan, A., Srinivas Bharath, M. M. and Shankar, S. K. (2012a) Elevated oxidative stress and decreased antioxidant function in the human hippocampus and frontal cortex with increasing age: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Res*, 37, 1601-1614.
- Venkateshappa, C., Harish, G., Mythri, R. B., Mahadevan, A., Bharath, M. M. and Shankar, S. K. (2012b) Increased oxidative damage and decreased antioxidant function in aging human substantia nigra compared to striatum: implications for Parkinson's disease. *Neurochem Res*, 37, 358-369.
- Verkhatsky, A., Nedergaard, M. and Hertz, L. (2015) Why are astrocytes important? *Neurochem Res*, 40, 389-401.
- Verkhatsky, A., Zorec, R. and Parpura, V. (2017a) Stratification of astrocytes in healthy and diseased brain. *Brain Pathol*, 27, 629-644.
- Verkhatsky, A., Zorec, R., Rodriguez, J. J. and Parpura, V. (2017b) Neuroglia: Functional Paralysis and Reactivity in Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Pathologies. *Adv Neurobiol*, 15, 427-449.
- Vila, M. and Przedborski, S. (2003) Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, 4, 365-375.
- Vitale, C., Marcelli, V., Abate, T. *et al.* (2016) Speech discrimination is impaired in parkinsonian patients: Expanding the audiologic findings of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 22 Suppl 1, S138-143.
- Vivekanantham, S., Shah, S., Dewji, R., Dewji, A., Khatri, C. and Ologunde, R. (2015) Neuroinflammation in Parkinson's disease: role in neurodegeneration and tissue repair. *Int J Neurosci*, 125, 717-725.
- Vock, C., Nitz, I. and Doring, F. (2010) Transcriptom-based identification of a putative role for the human Acyl-CoA-Binding-Protein (ACBP) in vesicular trafficking. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 56 Suppl, OL1261-1265.
- Voutilainen, M. H., Arumae, U., Airavaara, M. and Saarma, M. (2015) Therapeutic potential of the endoplasmic reticulum located and secreted CDNF/MANF family of neurotrophic factors in Parkinson's disease. *FEBS Lett*, 589, 3739-3748.
- Voutilainen, M. H., Back, S., Porsti, E., Toppinen, L., Lindgren, L., Lindholm, P., Peranen, J., Saarma, M. and Tuominen, R. K. (2009) Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is neurorestorative in rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 29, 9651-9659.

W

- Wakabayashi, K., Tanji, K., Mori, F. and Takahashi, H. (2007) The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. *Neuropathology*, 27, 494-506.
- Wang, L., Heckman, M. G., Aasly, J. O. *et al.* (2017) Evaluation of the interaction between LRRK2 and PARK16 loci in determining risk of Parkinson's disease: analysis of a large multicenter study. *Neurobiol Aging*, 49, 217 e211-217 e214.
- Watanabe, C., Kawashima, H., Takekuma, K., Hoshika, A. and Watanabe, Y. (2008) Increased nitric oxide production and GFAP expression in the brains of influenza A/NWS virus infected mice. *Neurochem Res*, 33, 1017-1023.
- Webb, N. R., Rose, T. M., Malik, N., Marquardt, H., Shoyab, M., Todaro, G. J. and Lee, D. C. (1987) Bovine and human cDNA sequences encoding a putative benzodiazepine receptor ligand. *DNA*, 6, 71-79.
- Westlund, K. N., Denney, R. M., Kochersperger, L. M., Rose, R. M. and Abell, C. W. (1985) Distinct monoamine oxidase A and B populations in primate brain. *Science*, 230, 181-183.
- Westlund, K. N., Krakower, T. J., Kwan, S. W. and Abell, C. W. (1993) Intracellular distribution of monoamine oxidase A in selected regions of rat and monkey brain and spinal cord. *Brain Res*, 612, 221-230.
- Whittemore, E. R., Loo, D. T., Watt, J. A. and Cotman, C. W. (1995) A detailed analysis of hydrogen peroxide-induced cell death in primary neuronal culture. *Neuroscience*, 67, 921-932.
- Wider, C. and Wszolek, Z. K. (2007) Clinical genetics of Parkinson's disease and related disorders. *Parkinsonism Relat Disord*, 13 Suppl 3, S229-232.
- Williams, L. and Bell, L. (1985) An ultrastructural study of meconium corpuscles in human foetal colon. *Anat Embryol (Berl)*, 171, 373-376.
- Wilson, J. X. (1997) Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol*, 75, 1149-1163.
- Witoelar, A., Jansen, I. E., Wang, Y. *et al.* (2017) Genome-wide Pleiotropy Between Parkinson Disease and Autoimmune Diseases. *JAMA Neurol*, 74, 780-792.
- Wood-Kaczmar, A., Gandhi, S., Yao, Z. *et al.* (2008) PINK1 is necessary for long term survival and mitochondrial function in human dopaminergic neurons. *PLoS One*, 3, e2455.
- Wu, E. Y., Chiba, K., Trevor, A. J. and Castagnoli, N., Jr. (1986) Interactions of the 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium species with synthetic dopamine-melanin. *Life Sci*, 39, 1695-1700.

Y

- Yadav, S. K., Pandey, S. and Singh, B. (2017) Role of estrogen and levodopa in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (mptp)-induced cognitive deficit in Parkinsonian ovariectomized mice model: A comparative study. *J Chem Neuroanat*, 85, 50-59.
- Yamamoto, M. and Schapira, A. H. (2008) Dopamine agonists in Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother*, 8, 671-677.
- Yanagida, T., Kitamura, Y., Yamane, K. *et al.* (2009) Protection against oxidative stress-induced neurodegeneration by a modulator for DJ-1, the wild-type of familial Parkinson's disease-linked PARK7. *J Pharmacol Sci*, 109, 463-468.
- Yanase, H., Shimizu, H., Yamada, K. and Iwanaga, T. (2002) Cellular localization of the diazepam binding inhibitor in glial cells with special reference to its coexistence with brain-type fatty acid binding protein. *Arch Histol Cytol*, 65, 27-36.
- Yang, X. and Xu, Y. (2014) Mutations in the ATP13A2 gene and Parkinsonism: a preliminary review. *Biomed Res Int*, 2014, 371256.
- Youdim M, Riederer P. (1997) Understanding Parkinson's disease. *Scientific American Magazine*, 276(1):52-9.

Young, J. K. (1994) Immunoreactivity for diazepam binding inhibitor in Gomori-positive astrocytes. *Regul Pept*, 50, 159-165.

Z

Zhang, H., Duan, C. and Yang, H. (2015) Defective autophagy in Parkinson's disease: lessons from genetics. *Mol Neurobiol*, 51, 89-104.

Zhu, J. and Chu, C. T. (2010) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J Alzheimers Dis*, 20 Suppl 2, S325-334.

Zhu, J. H., Gusdon, A. M., Cimen, H., Van Houten, B., Koc, E. and Chu, C. T. (2012) Impaired mitochondrial biogenesis contributes to depletion of functional mitochondria in chronic MPP⁺ toxicity: dual roles for ERK1/2. *Cell Death Dis*, 3, e312.

Zorec, R., Verkhatsky, A., Rodriguez, J. J. and Parpura, V. (2016) Astrocytic vesicles and gliotransmitters: Slowness of vesicular release and synaptobrevin2-laden vesicle nanoarchitecture. *Neuroscience*, 323, 67-75.