



HAL
open science

Potentiel thérapeutique de neurones dopaminergiques dérivés de cellules souches embryonnaires de souris dans un modèle murin de la maladie de Parkinson

Sandie Brisson

► **To cite this version:**

Sandie Brisson. Potentiel thérapeutique de neurones dopaminergiques dérivés de cellules souches embryonnaires de souris dans un modèle murin de la maladie de Parkinson. Médecine humaine et pathologie. Université de Poitiers, 2017. Français. NNT : 2017POIT2314 . tel-03193824

HAL Id: tel-03193824

<https://theses.hal.science/tel-03193824>

Submitted on 9 Apr 2021

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

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



THÈSE

Pour l'obtention du Grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)
École Doctorale : Biosanté n°524

Secteur de Recherche : Neurosciences

Présentée par :

BRISSON Sandie

Potentiel thérapeutique de neurones dopaminergiques dérivés de cellules souches embryonnaires de souris dans un modèle murin de la maladie de Parkinson

Directrice de Thèse : GAILLARD Afsaneh

Soutenue le 19 décembre 2017

Devant la Commission d'Examen

JURY

Rapporteur	Stephen DUNNETT	Professeur, Université de Cardiff, Angleterre
Rapporteur	Sylvia SOARES	Maître de conférences, CNRS, Université P. et M. Curie
Examineur	Sylvie CHALON	Directeur de recherche INSERM, Université de Tours
Examineur	Jean-Marc MULLER	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Directrice de Thèse	Afsaneh GAILLARD	Professeur des Universités, Université de Poitiers

*À ma famille,
Pour votre indéfectible soutien
et votre indicible amour.*

"I never lose. I either win or learn."

Nelson Mandela

Résumé

La maladie de Parkinson (MP) est caractérisée essentiellement par la perte progressive des neurones dopaminergiques (DA) de la substance noire parse compacte (SNpc) qui innervent le striatum et contrôlent les mouvements volontaires. Une des approches thérapeutiques de la MP est la transplantation ectopique de précurseurs DA fœtaux issus du mésencéphale ventral (MV) dans le striatum. Il est peu probable que la transplantation des neurones DA du MV humain devienne un traitement de routine de la MP en raison de problèmes d'approvisionnement et de standardisation de tissus pour la transplantation. L'avenir de ces greffes dépend donc de l'obtention de sources alternatives de tissus. L'objectif de ce projet est d'obtenir des neurones DA issus de cellules souches embryonnaires de souris et d'évaluer leurs potentiels thérapeutiques en les greffant dans le striatum ou la SN dans un modèle murin de la MP. Afin d'augmenter le nombre de neurones DA du type nigral, l'expression de LMX1A, un facteur de transcription jouant un rôle clé dans le développement embryonnaire des progéniteurs des neurones DA du MV, a été forcée. Nous avons montré que, *in vitro*, LMX1A induit une augmentation de précurseurs et de neurones DA du type nigral. Après transplantation dans la SN ou le striatum, les cellules survivent, expriment des marqueurs des neurones DA du type nigral et projettent vers le striatum. L'expression forcée de LMX1A semble augmenter, *in vivo*, la proportion de neurones DA matures responsables d'une réduction des déficits moteurs après transplantation dans le striatum.

Mots-clés : Maladie de Parkinson ; Transplantation ; Cellules souches ; Neurones dopaminergiques ; LMX1A ; Souris.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is mainly characterised by the progressive loss of the dopaminergic (DA) neurons of the *substantia nigra pars compacta* (SNpc) that are innervating the striatum and controlling voluntary movements. One of the therapeutical strategies of PD is the ectopic transplant of fetal DA precursors from the ventral mesencephalon (VM) into the striatum. It is unlikely that transplant of human DA neurons of the VM become a routine treatment for PD due to supply and tissues standardization problems for the transplant. The future of these transplants thus depends on the obtaining of alternative tissue sources. The aim of this project is to obtain DA neurons derived from mouse embryonic stem cells and to evaluate their therapeutical potential grafting them into the striatum or the SNpc in a mouse model of PD. In order to increase the number of DA neurons of the nigral subtype, the expression of LMX1A, a transcription factor playing a key role in the embryonic development of MV DA neuronal progenitors, has been forced. We have shown that, *in vitro*, LMX1A induces an increase of nigral precursors and neurons. After transplantation into the SN or the striatum, the cells survive, express markers of DA neurons of the nigral subtype and project towards the striatum. The forced expression of LMX1A seems to increase, *in vivo*, the proportion of mature DA neurons responsible for reducing the motor deficits after transplantation into the striatum.

Keywords: Parkinson's disease ; Transplantation ; Stem cells ; Dopaminergic neurons ; LMX1A ; Mouse.

SOMMAIRE GÉNÉRAL

LISTE DES ABRÉVIATIONS

INDEX DES FIGURES

AVANT-PROPOS	1
INTRODUCTION	5
I. Chapitre I : Maladie de Parkinson.....	7
A. Historique	7
B. Epidémiologie et économie	8
C. Symptômes et diagnostic.....	9
D. Anatomico-pathologie.....	15
E. Étiologie.....	24
F. Modèles animaux de la maladie de Parkinson.....	28
II. Chapitre II : Traitements de la maladie de Parkinson	31
A. Traitements symptomatiques.....	33
B. Neuroprotection et neurorégénération.....	44
C. Neurorestauration	47
III. Chapitre III : Sources cellulaires alternatives pour la thérapie de remplacement cellulaire de la maladie de Parkinson.....	59
A. Développement embryonnaire des neurones DA de la SNpc.....	60
B. Génération de neurones DA dérivés de cellules souches	64
C. Génération de neurones DA dérivés de cellules somatiques adultes	83
IV. Objectifs de thèse.....	88
MATÉRIEL ET MÉTHODES	91
RÉSULTATS	109
PARTIE I: Obtention de neurones dopaminergiques de type nigral à partir de cellules souches embryonnaires murines.....	111
PARTIE II: Évaluation du potentiel des greffes de précurseurs dopaminergiques dérivés de cellules souches embryonnaires murines à réduire les déficits de la motricité induits par la lésion dopaminergique dans un modèle murin de la maladie de Parkinson.	133
PARTIE III: Évaluation du potentiel des précurseurs dopaminergiques dérivés de cellules souches embryonnaires murines à restaurer le réseau dopaminergique dégénéré.....	139
DISCUSSION	153
CONCLUSION	175
PERSPECTIVES	175
BIBLIOGRAPHIE	177

Liste des abréviations

5-HT : Sérotoninergique
6-OHDA : 6-hydroxydopamine
AADC : Décarboxylase d'acide aminé aromatique ou DOPA décarboxylase (Aromatic amino acid decarboxylase)
AcAsc : Acide ascorbique
AcI : Anticorps primaire
AcII : Anticorps secondaire
ADN : Acide désoxyribonucléique
AINS : Anti-inflammatoires non-stéroïdiens
ARNm : Acide ribonucléique messager
ATV : Aire tegmentale ventrale
BDNF : Facteur neurotrophique issu du cerveau (Brain derived neurotrophic factor)
BSA : Albumine de sérum bovin (Bovine serum albumin)
CCMS : Cellules chromaffines de la médullosurrénale
CE : Corps embryonnaires
ChAT : Choline acétyltransférase
CL : Corps de Lewy
COMT : Catéchol-O-méthyltransférase
CSA : Cellules somatiques adultes
CSE : Cellules souches embryonnaires
CSM : Cellules stromales mésenchymateuses
CSN : Cellules souches neurales
CSNi : Cellules souches neurales induites
CSP : Cellules souches pluripotentes
DA : Dopaminergique
DAPI : 4', 6 - Diamidine - 2' - phenylindole dihydrochloride
DAT : Transporteur de dopamine (Dopamine active transporter)
DBH : Dopamine β-Hydroxylase
DIL : Dyskinésies induites par la L-DOPA
dNTPs : Désoxyribonucléotides
DOPAC : Acide 3,4-dihydroxyphénylacétique
EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique (ethylenediaminetetraacetic acid)
FACS : Cytométrie de flux activée par fluorescence (Fluorescent-activated cell sorting)
FGF : Facteur de croissance des fibroblastes (Fibroblast growth factor)
GABA : Acide γ-aminobutyrique
GDNF : Facteur neurotrophique issu des cellules gliales (Glial cell line-derived neurotrophic factor)
GFAP : Protéine acide fibrillaire gliale (Glial fibrillary acidic protein)

GFP : Protéine fluorescente verte (Green fluorescent protein)
GID : Dyskinésies induites par le greffon (Graft induced dyskinesia)
GIRK2 : Canal potassique rectifiant entrant 2 activé par protéine G (G protein-activated inward rectifier potassium channel 2)
GPe : Globus pallidum externe
GPi : Globus pallidum interne
GTP : Guanosine triphosphate
HVA : Acide homovanillique
ICOMT : Inhibiteurs de la catéchol-O-méthyltransférase
IMAO-B : Monoamine-oxydase de type B
iPS : Souches pluripotentes induites (induced pluripotent stem)
IRM : Imagerie à résonance magnétique
ITS-Fn : Insuline, transferrine, sodium sélénium et fibronectine
J4, J6 : 4^{ème} et 6^{ème} jour de différenciation *in vitro*
KO ES : Milieu de culture pour cellules souches embryonnaires (Knock-out embryonic stem)
L-DOPA : L-3,4 dihydroxyphénylalanine
LIF : Facteur inhibiteur de leucémie (Leukemia inhibitory factor)
LRKK2 : Kinase 2 avec une répétition riche en leucine (Leucine-rich repeat kinase 2)
MACS : Tri cellulaire magnétique (Magnetic-activated cell sorting)
MAO : Monoamine oxydase mitochondriale
MEF : Fibroblastes embryonnaires de souris (Mouse embryonic fibroblasts)
MEM : Milieu essentiel minimum
MFB : Faisceau moyen du télencéphale (Medial forebrain bundle)
MgCl : Chlorure de magnésium
MNS : Masses neurales sphériques
MP : Maladie de Parkinson
MPTP : 1 - methyl - 4 - phenyl - 1, 2, 3, 6 - tetrahydropyridine
MV : Mésencéphale ventral
NAC : N-acétyl-cystéine
NAc : Noyau accumbens
NaCl : Chlorure de sodium
NEM : Neurones épineux moyens
NET : Transporteur de noradrénaline (Norepinephrine transporter)
Ngn2 : Neurogénine 2
Ni : Neurones induits

NIVT : Noyau intermédiaire ventral du thalamus
NL : Neurites de Lewy
NMDA : N-méthyl-D acide aspartique
NPP : Noyau pédonculopontin
NRR : Noyau rétro-rubral
NST : Noyau sous-thalamique
PB : Tampon phosphate (Phosphate buffer)
PBS : Tampon phosphate salin (Phosphate Buffer Saline)
PCR : Réaction en chaîne par polymérase (polymerase chain reaction)
PFA : Paraformaldéhyde
PINK1 : Kinase putative 1 induite par un homologue tension et une phosphatase (Phosphatase and tension homolog-induced putative kinase 1)
Sem : Erreur standard moyenne (standard error of the mean)
SHF : Stimulation à haute fréquence
SHH : Sonic hedgehog
SN : Substance noire

SNpc : Substance noire parse compacte
SNpr : Substance noire parse réticulée
SPECT : Tomographie à émission monophotonique (single photon emission)
SVF : Sérum de veau fœtal
SVZ : Zone sous-ventriculaire (subventricular zone)
TA : Température ambiante
TBS : Tampon tris salin (Tris-Buffered Saline)
TEP : Tomographie à émission de positon
TH : Tyrosine hydroxylase
U : Unités
VGLUT1 : Transporteur vésiculaire du glutamate 1 (Vesicular glutamate transporter 1)
VMAT-2 : Transporteur vésiculaire des monoamines 2 (Vesicular monoamine transporter 2)
ZI : Zone *incerta*

Index des figures

Figure 1: Prévalence et incidence de la maladie de Parkinson en France en 2010	9
Figure 2: Symptômes moteurs potentiels de la maladie de Parkinson.....	11
Figure 3: Symptômes non-moteurs potentiels de la maladie de Parkinson	13
Figure 4: Dépigmentation de la substance noire chez un patient parkinsonien (droite) comparée à une personne saine (gauche).	17
Figure 5: Représentation graphique de la connectivité des ganglions de la base chez une personne saine et un malade parkinsonien.	17
Figure 6: Représentation graphique des différentes étapes de l'agrégation de l'alpha-synucléine	21
Figure 7: Chronologie hypothétique des symptômes moteurs (bleu) et non-moteurs (vert) et de la distribution anatomique de l'alpha-synucléine (violet) dès le début de l'apparition d'une forme classique de la maladie de Parkinson et jusqu'à la mort des patients.....	24
Figure 8: Forme familiale de la MP: Gènes responsables de l'apparition de la maladie et gènes à risques.	27
Figure 9: Représentation graphique des différents médicaments utilisés pour traiter les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson et leur cible moléculaire.	35
Figure 10: Représentation graphique de l'affaiblissement typique dans une journée des effets de la médication de patients parkinsoniens	38
Figure 11: Représentation graphique du système utilisé pour une stimulation à haute fréquence. ...	41
Figure 12: Illustration de l'expression de gènes contrôlant le développement des neurones dopaminergiques du mésencéphale ventral chez la souris.	61
Figure 13: Protocoles de différenciation des cellules souches neurales (CSN) en neurones dopaminergiques du mésencéphale ventral (DA du MV).	65
Figure 14: Protocoles de différenciation des cellules souches pluripotentes (CSP) en neurones à dopamine du mésencéphale ventral (DA du MV).	72
Figure 15: Représentation graphique de la plasticité cellulaire : différenciation, reprogrammation et transdifférenciation.....	83
Figure 16: Schéma simplifié du plasmide pSF-CMV-Ub Hygro-SV40 Ori pSF-CMV-Ub Hygro-SV40 Ori	94
Figure 17: Représentation graphique du protocole de différenciation en cinq étapes utilisé pour différencier des cellules souches embryonnaires en neurones dopaminergique du mésencéphale ventral.	96
Figure 18: Conception expérimentale des expériences de lésions et transplantations réalisées sur les souris C57BL/6.....	101
Figure 19 : Représentation graphique de l'équipement utilisé lors du test de rotations induites par l'apomorphine.	105
Figure 20: Photographie (A) et représentation graphique (B) du dispositif utilisé pour mesurer les capacités de préhension des pattes antérieures des souris : test de l'escalier.	106
Figure 21: Photomicrographies à épifluorescence de cellules différenciées <i>in vitro</i> présentant un phénotype des neurones dopaminergiques du sous-type ATV.	111
Figure 22: Photographie du gel de PCR montrant l'intégration de la séquence codante de LMX1A dans les cellules D3 Tau-GFP.....	112
Figure 23: Photomicrographies à épifluorescence des cellules souches embryonnaires en prolifération <i>in vitro</i> et présentant un phénotype de pluripotence.....	114
Figure 24: La majorité des cellules issues de la couche ectodermique des CE présente un phénotype neural <i>in vitro</i>	115
Figure 25: Proportion de cellules Tau-GFP ⁺ identiques pour les CSE CONTRÔLE et CSE LMX1A après dix jours de différenciation <i>in vitro</i>	116
Figure 26: L'intégration de la séquence codante de LMX1A augmente la proportion de cellules TH ⁺ dix jours après différenciation <i>in vitro</i>	118

Figure 27: L'intégration de la séquence codante de LMX1A augmente la proportion de cellules GIRK2 ⁺ et TH ⁺ dix jours après différenciation <i>in vitro</i> .	119
Figure 28: L'intégration de la séquence codante de LMX1A semble réduire la proportion de cellules GABA ⁺ et 5-HT ⁺ , et non les cellules exprimant la sérotonine, dix jours après différenciation <i>in vitro</i>	121
Figure 29 : L'intégration de la séquence codante de LMX1A semble réduire la proportion de cellules GFAP ⁺ dix jours après différenciation <i>in vitro</i> .	123
Figure 30: Perte de l'expression d'OCT4 et SSEA1 dès le quatrième jour de différenciation <i>in vitro</i> pour les CSE CONTRÔLE et les CSE LMX1A.	125
Figure 31: La proportion de cellules FoxA2 ⁺ Tau-GFP ⁻ TH ⁻ est augmentée au quatrième jour de différenciation <i>in vitro</i> comparée au sixième.	128
Figure 32: La proportion de cellules LMX1A ⁺ Tau-GFP ⁻ TH ⁻ ne varie pas entre le quatrième et sixième jour de différenciation <i>in vitro</i> .	129
Figure 33: La proportion de cellules Nurr1 ⁺ Tau-GFP ⁻ TH ⁻ varie entre le quatrième et sixième jour de différenciation <i>in vitro</i> .	130
Figure 34: Analyse de l'effet du site de transplantation et de l'intégration de la séquence codante de LMX1A sur le nombre de rotations moyennes induites par l'injection d'apomorphine.	135
Figure 35: Analyse de l'effet du site de transplantation et de l'intégration de la séquence codante de LMX1A sur le pourcentage de pellets collectées lors du test d'appréhension des membres antérieurs.	137
Figure 36 : Analyse du volume des greffons des cellules exprimant Tau-GFP et dérivées des CSE CONTRÔLE ou des CSE LMX1A après transplantation au sein du striatum ou de la substance noire.	141
Figure 37: Photomicrographies du marquage de Tau-GFP sur des sections coronales des cerveaux de souris transplantés en nigral ou en striatal avec des cellules dérivées de CSE CONTRÔLE ou CSE LMX1A.	142
Figure 38: Analyse du phénotype DA du type MV des cellules dérivées des CSE CONTRÔLE et des CSE LMX1A après transplantations au sein du striatum ou de la SN.	145
Figure 39: Analyse de la maturation des neurones DA dérivées des CSE CONTRÔLE et des CSE LMX1A après transplantations au sein du striatum ou de la SN.	147
Figure 40: Analyse des cellules précurseuses des neurones DA du type MV au sein du transplant par l'expression de FoxA2.	148
Figure 41: Analyses de la proportion de cellules différenciées à partir de CSE exprimant 5-HT au sein du transplant.	149
Figure 42: Projections neuronales issues des cellules transplantées au sein du striatum ou de la SN dérivées des CSE CONTRÔLE ou des CSE LMX1A.	151

AVANT-PROPOS

La maladie de Parkinson (MP) est la deuxième affection neurodégénérative la plus répandue dans le monde après la maladie d'Alzheimer. Caractérisée par une atteinte progressive et hétérogène de diverses populations neuronales responsables de l'apparition d'un large panel de symptômes moteurs et non-moteurs, cette pathologie a un impact socio-économique substantiel qui, couplé à un vieillissement croissant de la population, en fait un problème de santé publique majeur.

Bien que des traitements dits symptomatiques soient actuellement utilisés en clinique pour réduire notamment les déficits moteurs développés par les patients parkinsoniens, leur efficacité diminue avec la progression de la maladie. En effet, ces traitements ne ralentissent ni n'arrêtent la mort des neurones à dopamine de la substance noire parse compacte (SNpc) et de leurs fibres projetant au niveau du striatum dorsal. Leur dégénérescence est responsable de l'apparition des symptômes moteurs caractéristiques de la MP : la bradykinésie, les tremblements au repos, la rigidité musculaire et l'instabilité posturale. La thérapie de remplacement cellulaire, de par sa capacité à remplacer *in vivo* un tissu endommagé par le même type de tissu ou des cellules précurseurs obtenues *in vitro*, est, aujourd'hui, une des stratégies thérapeutiques les plus prometteuses pour guérir la MP.

Les neurones dopaminergiques (DA) fœtaux du mésencéphale ventral (MV) ont très rapidement été considérés comme la source de cellules de référence à utiliser en thérapie cellulaire en raison de leur capacité à donner naissance aux futurs neurones à dopamine de la SNpc. Transplantés dans le cerveau de centaines de patients parkinsoniens à travers le monde, ces études ont permis de démontrer l'efficacité et la légitimité d'une thérapie cellulaire pour la MP. Cependant, il est peu probable que la transplantation de neurones DA fœtaux humains devienne un traitement de routine de la MP en raison de problèmes d'approvisionnement et de standardisation de tissus pour la transplantation. L'avenir de ces greffes dépend donc de l'obtention de sources alternatives de tissus.

Ainsi, en introduction de ce manuscrit, une description générale de la MP et de ses stratégies thérapeutiques sont présentées en se concentrant, notamment, sur la thérapie de remplacement cellulaire et des différentes sources alternatives cellulaires

actuellement étudiées. Puis, dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressée au potentiel thérapeutique des cellules souches embryonnaires (CSE) de souris comme source alternatives aux neurones fœtaux.

Dans un premier temps, nous avons analysé la capacité des CSE à générer *in vitro* des neurones à dopamine de la SNpc. Les résultats préliminaires ont démontré la possibilité de produire, *in vitro*, des neurones DA à partir des CSE murines. Cependant, la majorité des neurones DA obtenus étaient du sous-type aire tegmentale ventrale (ATV), une autre population de neurones à dopamine présente au niveau du MV. Pour augmenter la proportion des neurones DA du sous-type nigral, LMX1A, un facteur de transcription participant à la spécification des neurones DA mésencéphalique, a été utilisé ; son expression forcée au sein de CSE de souris ayant préalablement démontré sa capacité à augmenter le nombre de neurones DA du MV générés *in vitro* (Friling et al., 2009).

Après la différenciation de CSE ayant intégré la séquence codante de LMX1A (CSE LMX1A) et de CSE contrôle (CSE CONTRÔLE), nous avons étudié le potentiel de restauration des taux de dopamine striataux et de réduction des déficits moteurs après transplantation de cellules dérivées de ces deux types de cellules dans le striatum ou la substance noire (SN) d'un modèle murin de la MP.

INTRODUCTION

I. Chapitre I : Maladie de Parkinson

A. Historique

Au travers des siècles, de nombreuses civilisations, comme celles de l’Égypte ancienne ou de la période néo-sumérienne en Mésopotamie, ont fait allusion à des symptômes caractéristiques de la MP dans leur littérature (pour revue: Raudino, 2012). Il faudra, cependant, attendre le début du 19^{ème} siècle pour que le chirurgien anglais James Parkinson décrive les différents stades de ce qu’il appelle, à cette époque, la paralysie agitante (*paralysis agitans* ou shaking palsy) (réédition: Parkinson, 2002). Grâce à une analyse comportementale développée et minutieuse de six patients, James Parkinson est le premier à distinguer un ensemble de symptômes moteurs comme faisant partie d’une maladie à part entière. Par la suite, le neurologue français Jean-Martin Charcot complètera la description des troubles cliniques moteurs de cette pathologie qu’il renommera, dès 1888, maladie de Parkinson (Charcot, 1872; pour revue: Goetz, 2011a). Depuis, de nombreux chercheurs se sont investis dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de cette maladie dans le but d’établir des stratégies thérapeutiques.

Par exemple, le médecin Theodor Meynert souligne, dès 1871, l’importance d’une dérégulation des ganglions de la base dans la MP (Meynert, 1871). Les médecins Paul Blocq et Gheorghe Marinescu (Blocq and Marinescu, 1893; pour revue : Hostiuc et al., 2016), ainsi que Édouard Brissaud (Brissaud, 1895), Konstantin Tretiakoff (Tretiakoff, 1919) et Friedrich Lewy (Lewy, 1912) attirent, quant à eux, l’attention sur la dégénérescence de la substance noire et la présence d’inclusions cytoplasmiques dans le cerveau de patients dits parkinsoniens. Il faudra attendre la deuxième moitié du 20^{ème} siècle pour que la diminution des projections DA et du taux de dopamine dans les ganglions de la base soit corrélée à l’apparition de la majorité des symptômes moteurs de la MP (Andén et al., 1965; Carlsson, 1959; Dahlström and Fuxe, 1964; Ehringer and Hornykiewicz, 1960).

Bien que de nombreuses découvertes ont permis d’accroître les connaissances des mécanismes pathologiques de la MP, 200 ans après la publication de l’essai de James

Parkinson en 1817, de nombreuses questions restent encore aujourd'hui à élucider afin de comprendre et traiter, dans son intégralité, l'une des maladies neurodégénératives la plus répandue à travers le monde.

B. Epidémiologie et économie

De nos jours, la MP affecte environ 0.3% de la population mondiale et apparaît comme la deuxième atteinte neurodégénérative la plus répandue après la maladie d'Alzheimer. En effet, près de 10 millions de personnes dans le monde seraient touchés par cette pathologie, dont 1,2 millions d'individus en Europe (Gustavsson et al., 2011).

En France, en 2010, la prévalence de la MP a été évaluée, à environ 2.30 pour 1000 habitants avec un nombre de nouveaux patients débutant un traitement de 0.39 pour 1000 personnes-années (*Etat de santé de la population en France*, Ministère des Affaires sociales et de la Santé, 2015). Dans les pays industrialisés, cette fréquence d'apparition augmente avec l'âge (Fig. 1). En effet, après 60 ans, 1% des individus présente des symptômes parkinsoniens contre 3% après 80 ans (pour revue: Lee and Gilbert, 2016). Étant donné que la population vieillissante s'accroît dans les pays industrialisés, il est attendu que le nombre de patients parkinsoniens double d'ici 2030 (Dorsey et al., 2007).

Rare avant l'âge de 50 ans, la MP est diagnostiquée en moyenne vers 60 ans et toucherait 1.5 à 2 fois plus les hommes que les femmes (pour revue: Twelves et al., 2003). Cette pathologie augmenterait également la mortalité des patients de 2 à 5 fois, avec une durée moyenne entre le diagnostic et la mort comprise entre 15 à 20 ans (Bennett et al., 1996; Hely et al., 2008). De plus, l'évolution lente et progressive de la maladie multiplie et aggrave les symptômes des patients parkinsoniens, ce qui engendre des soins de plus en plus conséquents au cours du temps. En outre, cette assistance thérapeutique a un coût. Gustavsson et ses collègues ont démontré qu'en Europe, en 2010, les frais relatifs à la prise en charge des patients parkinsoniens s'élevaient à 13.9 milliards d'euros (Gustavsson et al., 2011).

Ainsi, les impacts sociaux et économiques de la MP sont substantiels et l'enjeu thérapeutique n'en sera que d'autant plus important avec un vieillissement croissant de

la population. Pour l'ensemble de ces raisons, la MP apparaît comme un problème de santé publique majeur.

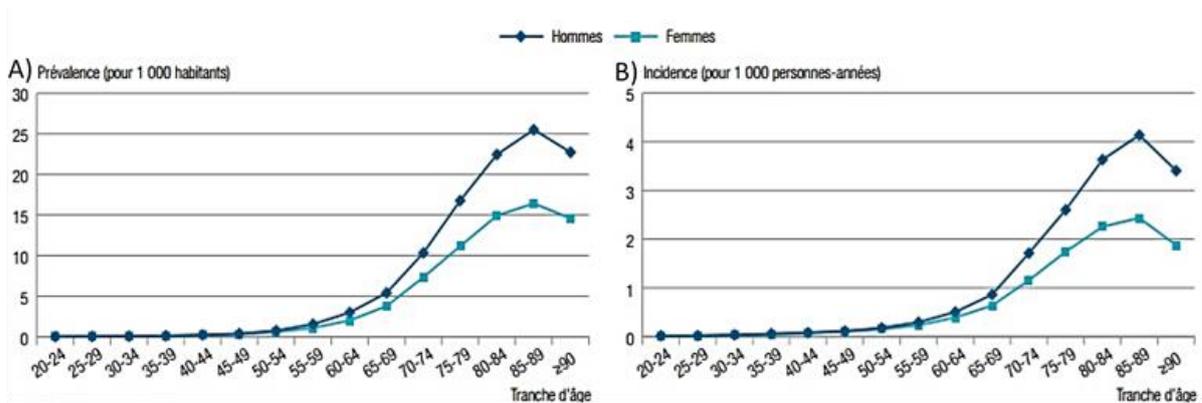


Figure 1: Prévalence et incidence de la maladie de Parkinson en France en 2010

Pour 1000 habitants en France en 2010, la prévalence (A) et l'incidence (B) de la MP en fonction des tranches d'âge augmente à partir de 60 ans avec une forte croissance à compter de cette période de vie. Cette progression est dominante pour les hommes comparés aux femmes.

Modifié à partir de « Etat de santé de la population en France » - 6^{ème} édition ; provenant de la Direction de la recherche, des études, de l'évaluation et des statistiques (DREES) et Direction générale de la santé (DGS), Ministère des Affaires sociales et de la Santé, 2015.

C. Symptômes et diagnostic

Lors de la progression de la MP, des symptômes moteurs et non moteurs, plus ou moins sévères, se développent. Les symptômes, principalement d'ordre moteur, caractérisent la maladie et sont utilisés pour l'établissement du diagnostic.

1. Troubles moteurs

Les déficits moteurs présents chez les patients parkinsoniens sont au nombre de quatre : la **bradykinésie**, les **tremblements au repos**, la **rigidité musculaire** et l'**instabilité posturale** (pour revue: Shahed and Jankovic, 2007) (Fig. 2).

L'**akinésie** se rapporte à la difficulté à initier un mouvement, tandis que la **bradykinésie** correspond à un ralentissement dans son exécution et l'**hypokinésie** à une réduction de son amplitude. L'ensemble de ces troubles diminue l'activité motrice et complique les mouvements de la vie quotidienne des membres proximaux et distaux de la majorité des patients. Par exemple, l'initiation d'un pas devient difficile, la démarche

est, quant à elle, ralentie, trainante et séquentielle, avec un tronc courbé vers l'avant s'accompagnant d'une réduction du ballant des bras (Parkinson, 2002).

À l'instar de la bradykinésie, les **tremblements** se manifestent en général dès les premières phases de la maladie. Toutefois, ils ne sont dominants que dans 70% des patients parkinsoniens environ (Hughes et al., 1993). Ce sont des tremblements hétérogènes et involontaires, de faibles fréquences (4 à 6 Hz en moyenne), internes ou visibles au niveau des lèvres, du menton, de la mâchoire et des membres, et plus particulièrement au niveau des membres distaux lorsqu'ils sont au repos. Lors d'un mouvement volontaire, du sommeil ou aux stades tardifs de la pathologie, les tremblements diminuent voire disparaissent. En revanche, en condition de stress et d'anxiété, ils peuvent s'intensifier (pour revue: Helmich and Dirkx, 2017).

La **rigidité musculaire** est également l'un des premiers symptômes émergeant de la MP. Affectant plus de 90% des patients, cette hypertonie correspond à une augmentation de la résistance musculaire au niveau du tronc, du cou et des membres. Les mouvements de flexions, extensions et rotations des membres mais aussi des articulations deviennent difficiles et douloureux. Ceci accentue d'autant plus l'effet saccadé des mouvements, dits « en roue dentée ».

Finalement, à un stade plus tardif de la pathologie, l'association de l'hypertonie et de l'akinésie peut engendrer une **instabilité posturale** ce qui augmente le risque de chute chez les patients.

Il est nécessaire que le patient manifeste au minimum deux de ces symptômes moteurs pour qu'un diagnostic de la MP soit envisagé : la bradykinésie accompagnée d'un autre déficit moteur. Afin d'exclure d'autres pathologies motrices, cette atteinte doit également être bilatérale, asymétrique et progressive dans le temps pour confirmer le diagnostic (Hughes et al., 1992).

En plus de ces symptômes dits cardinaux, il existe des atteintes motrices dites secondaires, résultant des troubles primaires, qui complexifient la maladie et participent au diagnostic de la pathologie. Par exemple, une diminution des expressions faciales

accompagnées de difficultés à articuler et à avaler sont souvent décrits chez les malades parkinsoniens (pour revue: Shahed and Jankovic, 2007).

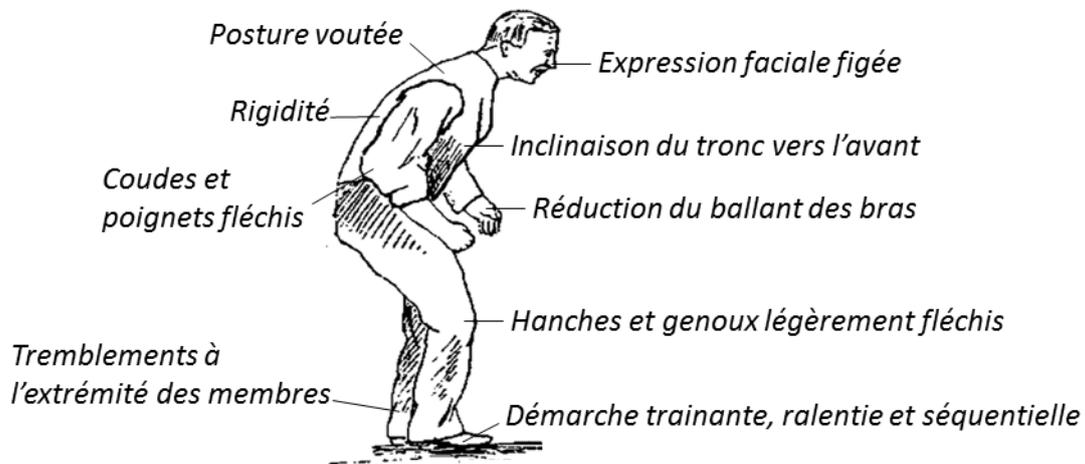


Figure 2: Symptômes moteurs potentiels de la maladie de Parkinson

Résumé des symptômes moteurs potentiellement observés chez les patients parkinsoniens et légendés sur un dessin du Dr. Charcot représentant la posture caractéristique de la MP. Modifié à partir de (Goldman and Goetz, 2007).

2. Troubles non moteurs

Bien que la MP soit principalement considérée comme une pathologie des troubles moteurs, celle-ci présente, par ailleurs, un panel de déficits non-moteurs tout aussi varié (Fig. 3) (revue: Schapira et al., 2017). Ces derniers peuvent apparaître jusqu'à 20 ans avant les premiers symptômes moteurs et leur nombre et leur sévérité augmentent en fonction de la progression de la maladie. Ces troubles non-moteurs sont tout aussi importants que les déficits moteurs, étant donné que leur aggravation dans le temps réduit la qualité de vie des malades ainsi que leur indépendance.

L'un des premiers troubles non-moteurs émergeant de la MP est une réduction de l'odorat, aussi appelée hyposmie. Touchant près de 90% des patients parkinsoniens à un stade précoce, l'hyposmie est lié à la mort progressive des neurones à dopamine du bulbe olfactif (pour revue: Doty, 2012).

Des troubles du système nerveux autonome ont également été décrits dans la MP à cause de l'apparition, chez les patients parkinsoniens, de troubles gastro-intestinaux

comme la constipation (50 à 70%) et les urgences urinaires (25 à 50%) (Abbott et al., 2001; Martinez-Martin et al., 2007).

À ces symptômes, s'ajoutent des désordres neuropsychiatriques et cognitifs. Par exemple, des cas de dépression ont été décrits, dès les premières phases de la pathologie, chez 20 à 40% des malades. À des stades plus tardifs, les risques de démences avoisinent les 75% chez les patients diagnostiqués depuis plus de 10 ans (pour revue: Aarsland et al., 2017).

Des troubles du sommeil sont également présents chez près de 90% des malades. Des perturbations des mouvements oculaires rapides sont, en effet, responsables de l'apparition d'insomnies et, par conséquent, de grandes fatigues chez les personnes atteintes de la MP (Schenck et al., 1996).

Les patients parkinsoniens décrivent, par ailleurs, des douleurs nombreuses et variées résultant d'une modulation de la dopamine à différents niveaux du système nerveux (pour revue: Defazio et al., 2013).

Il est à noter, également, que les traitements pharmacologiques (décrits au prochain chapitre de mon introduction) prescrits aux malades contre les troubles moteurs, peuvent amplifier l'apparition de ces déficits non-moteurs chez les patients parkinsoniens (Honig et al., 2009).

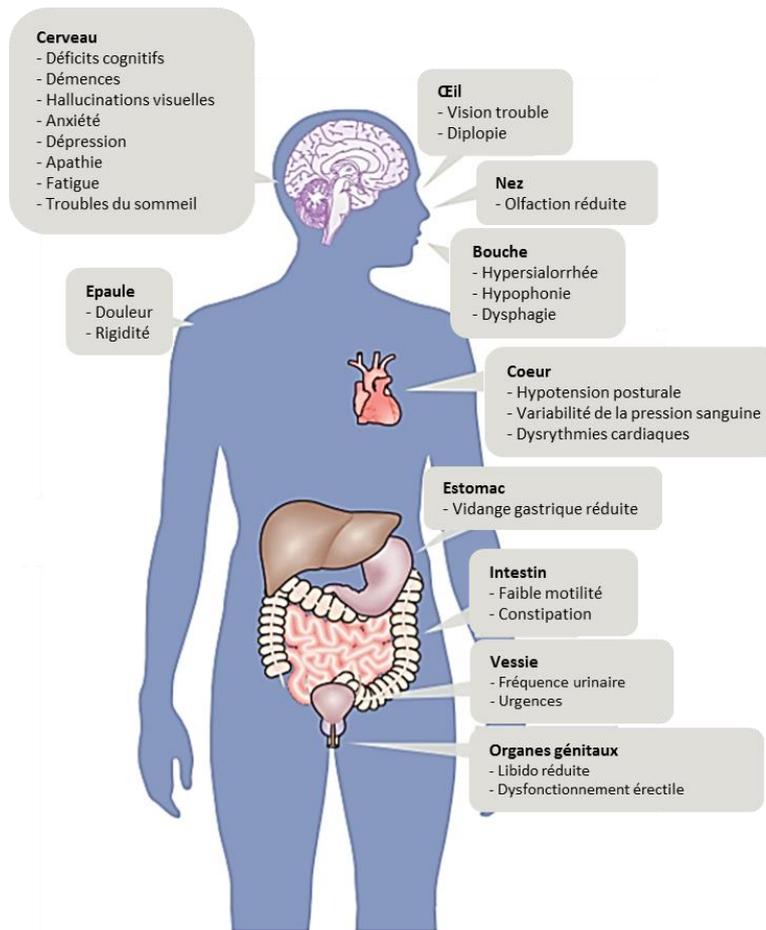


Figure 3: Symptômes non-moteurs potentiels de la maladie de Parkinson

Représentation graphique résumant les symptômes non-moteurs multi-systémiques potentiellement observés chez les patients parkinsoniens.
Modifié à partir de (Schapira et al., 2017).

Ainsi le panel de symptômes moteurs et non-moteurs développé par les patients parkinsoniens aide à l'élaboration d'un diagnostic en faveur de la MP (Tableau 1). Cependant, ce diagnostic reste incertain du vivant des patients. En effet, le manque de tests fiables et la difficulté à discriminer les symptômes parkinsoniens d'autres pathologies motrices comme l'atrophie multisystématisée, la paralysie supranucléaire progressive, la dégénérescence corticobasale ou encore la maladie à corps de Lewy qui font parties des syndromes parkinsoniens, rendent l'évaluation de la MP difficile (Hughes et al., 1992). Malgré l'utilisation de techniques d'imagerie cérébrale telles que la tomographie à émission de positon (TEP), la tomographie à émission monophotonique (aussi connu sous le nom de SPECT pour single photon emission) et les nouvelles avancées prometteuses de l'imagerie à résonance magnétique (IRM) (Mahlknecht et al., 2017), il

n'existe pas de biomarqueurs permettant d'établir un diagnostic fiable de la MP. Seule une analyse histologique post-mortem du cerveau des patients parkinsoniens est en mesure d'établir un diagnostic définitif de la MP par la présence d'agrégations protéiques intra-cytosoliques appelées corps de Lewy et la dépigmentation de la SN traduisant une mort massive des neurones DA de la SNpc.

Etape 1: Diagnostic de syndrome parkinsonien

Bradykinésie et au moins un des signes parmi les suivants:

- rigidité musculaire ;
- tremblement de repos à 4 à 6 Hz ;
- instabilité posturale non expliquée par une atteinte primitive visuelle, vestibulaire, cérébelleuse ou proprioceptive.

Etape 2: Absence de critères d'exclusions de la maladie de Parkinson

- antécédents d'AVC répétés et de progression par à coups ;
- antécédents de traumatismes crâniens répétés ;
- antécédents documentés d'encéphalite ;
- crises oculogyres ;
- traitement neuroleptique durant les premiers symptômes ;
- antécédents familiaux de plusieurs cas de syndromes parkinsoniens ;
- rémission prolongée ;
- signes strictement unilatéraux après trois ans d'évolution ;
- paralysie supranucléaire du regard ;
- syndrome cérébelleux ;
- dysautonomie sévère et précoce ;
- démence sévère et précoce avec troubles de la mémoire, du langage et des praxies
- signe de Babinski ;
- tumeur cérébrale ou hydrocéphalie communicante sur le scanner ;
- absence d'amélioration sous fortes doses de L-dopa (en l'absence de malabsorption)
- exposition au MPTP.

Etape 3: Critères évolutifs positifs en faveur du diagnostic de la maladie de Parkinson

- début unilatéral ;
- présence d'un tremblement de repos ;
- évolution progressive ;
- asymétrie persistante touchant le plus le côté initialement atteint ;
- amélioration significative (> 70 %) par la L-dopa du côté initialement atteint ;
- mouvements choréïques intenses induits par la L-dopa ;
- sensibilité à la L-dopa pendant 5 ans au moins ;
- durée d'évolution supérieure à 10 ans ;
- hyposmie ;
- hallucinations visuelles.

Tableau 1: Critères cliniques participant à l'élaboration du diagnostic de la maladie de Parkinson

Modifié à partir de (Hughes, 1992).

D. Anatomo-pathologie

1. Dégénérescences neuronales

La MP est caractérisée par une atteinte progressive, sélective et hétérogène de diverses populations neuronales à travers les systèmes nerveux central et périphérique. Les neurones les plus touchés dans cette pathologie sont les neurones DA du MV représentant la plus grande source de dopamine dans le cerveau de mammifères (Ehringer and Hornykiewicz, 1960).

a) *Neurones dopaminergiques*

Chez un sujet sain, le nombre de neurones DA du MV est en moyenne de 550 000 (Pakkenberg et al., 1991). De manière physiologique, il a été démontré que ces neurones dégénèrent à hauteur de 5% tous les 10 ans. Chez un patient parkinsonien, cette dégénérescence est jusqu'à 10 fois plus rapide (Fearnley and Lees, 1991). Bien qu'aucune cause spécifique n'ait été à ce jour identifiée, un ou plusieurs processus physiopathologiques ont été proposés comme étant impliqués dans l'apoptose neuronale DA mésencéphalique. Cette dégénérescence pourrait être induite par du stress oxydatif et un dysfonctionnement mitochondrial mais aussi à causes de troubles protéosomaux et lysosomaux ainsi que de l'autophagie (pour revue: Przedborski, 2017). De plus, une neuroinflammation accentuée au niveau du MV chez les patients parkinsoniens serait délétère pour les neurones et entretiendrait la neurodégénérescence DA (McGeer et al., 1988; pour revue: Phani et al., 2012).

Dans le MV, ce sont des neurones à dopamine localisés dans la partie ventrolatérale de la SNpc qui sont les plus atteints dans la MP (Fig. 4). La dégénérescence de ces neurones, aussi appelés neurones DA du noyau A9, correspondent à un marqueur spécifique de la MP (Tretiakoff, 1919).

Les neurones DA de la SNpc qui dégénèrent dans la MP ont été caractérisés comme étant des cellules de forme triangulaire, pigmentées de noir en raison de la présence de neuromélanine dans leur cytoplasme (pour revue: Björklund and Dunnett, 2007). Ces neurones innervent notamment le striatum dorsolatéral (le noyau caudé et le putamen)

et constitue la voie nigrostriée (Bernheimer et al., 1973). Le striatum est un acteur essentiel des ganglions de la base responsable de diverses fonctions telles que la motivation, l'émotion, l'apprentissage et notamment le contrôle volontaire des mouvements (Andén et al., 1965; pour revue: Lanciego et al., 2012). En condition physiologique (Fig. 5), la dopamine libérée par les neurones DA de la SNpc se fixe sur deux familles de récepteurs DA notamment présents sur les neurones épineux moyens (NEM) GABAergiques du striatum. Les NEM exprimant les récepteurs de la famille **D1**, sont activés par la dopamine et inhibent les neurones GABAergiques du globus pallidus interne (GPi) et de la substance noire parse réticulée (SNpr) projetant vers le thalamus. *In fine*, cette activation DA permet la levée de l'inhibition du thalamus qui projette sur le cortex frontal, permettant alors une excitation glutamatergique de ce dernier. Ainsi la dopamine en condition physiologique favorise la voie dite « **directe** » ou « **GO** » des ganglions de la base. Si la dopamine se fixe sur des récepteurs de type **D2** des NEM, ces derniers ne sont pas activés et l'inhibition exercée sur les neurones GABAergiques du globus pallidus externe (GPe) est alors levée. Ceci a alors pour effet d'inhiber les neurones glutamatergiques du noyau sous-thalamique (NST), ce qui empêche ensuite l'activation des neurones GABAergiques du GPi et de la SNpr qui projettent sur le thalamus. *In fine*, cette inactivation DA permet la levée de l'inhibition du thalamus qui active alors le cortex frontal. Ainsi, la dopamine en condition physiologique inhibe également la voie dite « **indirecte** » ou « **NO GO** » des ganglions de la base. Par conséquent, une activation de la SNpc promeut l'activité motrice. Lors de la MP, la mort progressive de ces neurones induit une perte des fibres DA et une diminution des taux de dopamine striataux au sein du putamen aux premiers stades de la maladie puis au sein du noyau caudé (Brooks et al., 1990; Kish et al., 1988). Ainsi, l'activation de la voie directe est diminuée de même que l'inhibition de la voie indirecte (Fig. 5). Cela provoque alors une réduction de l'inhibition du GPe et une augmentation de l'activation du NST sur les neurones GABAergiques du GPi et la SNpr ce qui augmente leur inhibition thalamique. Par conséquent, une dégénérescence des neurones DA de la SNpc provoque une diminution de l'activité motrice.

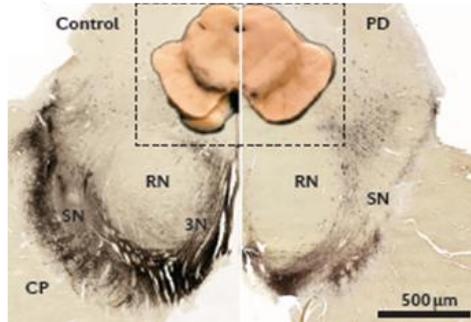


Figure 4: Dépigmentation de la substance noire chez un patient parkinsonien (droite) comparée à une personne saine (gauche).

Coupes macroscopiques et transversales du mésencéphale d'un patient parkinsonien et d'une personne contrôlée avec un immunomarquage dirigé contre la tyrosine hydroxylase. CP : pédoncule cérébral ; PD : maladie de Parkinson ; RN : noyau rouge ; 3N : fibres du troisième nerf crânien oculomoteur.

Modifié à partir de (Poewe et al., 2017).

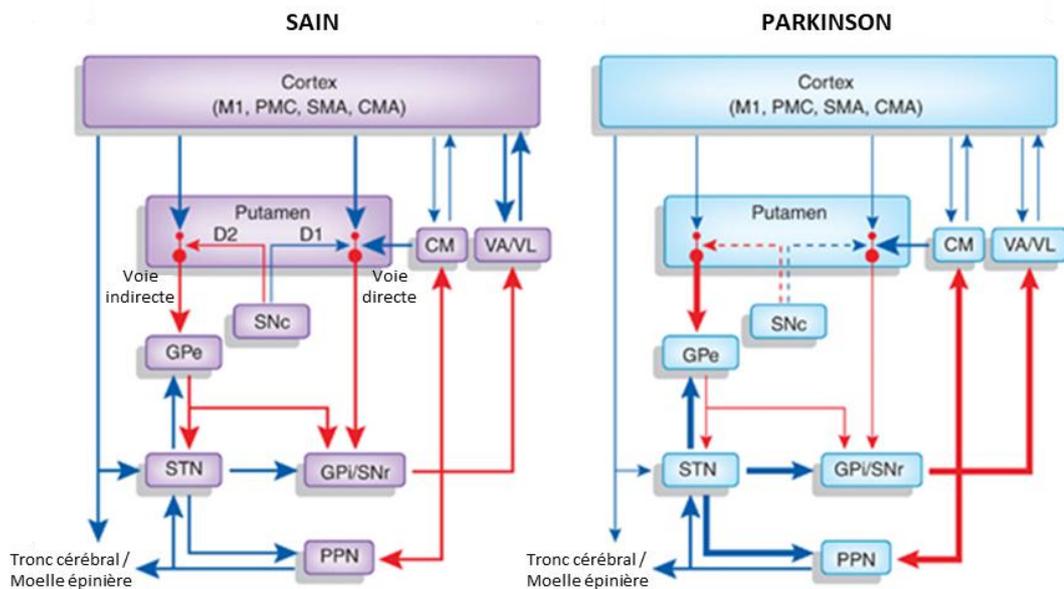


Figure 5: Représentation graphique de la connectivité des ganglions de la base chez une personne saine et un malade parkinsonien.

Les connections excitatrices glutamatergiques sont représentées par des flèches bleues ; les connections inhibitrices GABAergiques sont représentées par des flèches rouges. Un changement dans l'épaisseur des flèches indique une augmentation (plus large) ou une diminution (plus fine) du taux de décharge des neurones. Les flèches en pointillées symbolisent une lésion partielle du réseau dopaminergique allant de la SNpc jusqu'au putamen chez un patient parkinsonien. CM: noyau centromédian ; CMA: aire motrice cingulaire ; GPe: globus pallidus externe ; GPi: globus pallidus interne ; M1: cortex moteur primaire ; PMC: cortex pré-moteur ; PPN: noyau pédonculopontin ; SMA: aire motrice supplémentaire ; SNpc: substance noire parse compacte ; SNr: substance noire parse réticulée ; STN: noyau sous-thalamique ; VA/VL, noyau ventral antérieur / ventro-latéral.

Modifiée à partir de (Smith et al., 2012).

Lors de la mort des premiers neurones DA du MV, un remodelage synaptique se met en place par les neurones DA survivant (pour revue: Villalba and Smith, 2017). En effet, pour pallier au déséquilibre DA apparaissant dans le cerveau des patients parkinsoniens, un phénomène de compensation s'établit dès les premières perturbations afin de contrebalancer la perte DA striatale. Par exemple, il a été démontré qu'une augmentation de l'adressage des récepteurs DA membranaires des NEM du striatum induit une hypersensibilité à la dopamine (Ungerstedt, 1971a). De plus, ces neurones augmentent, chez le primate (Betarbet et al., 1997), le rongeur (Tashiro et al., 1989) et l'Homme (Porritt et al., 2006), l'expression de la première enzyme à intervenir dans la biosynthèse de catécholamines telle que la dopamine : la tyrosine hydroxylase (TH). Cette enzyme limitante est communément utilisée pour identifier et comptabiliser les neurones DA au sein du cerveau. Bien que des mécanismes de compensation soient mis en place, ce phénomène est transitoire et la chute progressive des taux de dopamine striataux entraîne l'apparition de la majorité des symptômes moteurs caractéristiques de la MP (Porritt et al., 2006).

La mort neuronale des neurones DA de la SNpc étant lente, le délai entre l'apparition des premières dégénérescences des neurones et celles des déficits moteurs peut atteindre jusqu'à 20 ans. En effet, il faut attendre une dégénérescence d'environ 60% des neurones DA nigraux et une diminution de 80% des terminaisons DA striatales pour que les premiers troubles moteurs apparaissent. Ceci complique la mise en place d'un traitement préventif qui pourrait être appliquée dès l'observation des premières dégénérescences neuronales (Bernheimer et al., 1973; Kish et al., 1988).

La pathologie progressant, les neurones DA de la partie dorsomédiale de la SNpc vont également dégénérer suivi par d'autres populations DA telles que les neurones DA de l'ATV de forme ronde, aussi appelés neurones DA du noyau A10, et les neurones DA du noyau rétrosubstantiel (NRR, aussi appelés neurones DA du noyau A8) qui innervent le striatum medioventral. Leur dégénérescence, moindre que celle des neurones DA de la SNpc, est notamment responsable de l'apparition des tremblements chez les patients parkinsoniens (Fearnley and Lees, 1991; Hirsch et al., 1988). Cette différence de vulnérabilité cellulaire entre les différentes populations DA du MV serait due à une expression différentielle de protéines au sein des neurones. Le canal potassique rectifiant entrant 2 activé par les

protéines G, aussi connu sous le nom de GIRK2, et la protéine liant le calcium, la Calbindine, participeraient à cette différence de vulnérabilité que ce soit chez les rongeurs ou l'Homme (pour revues: Anderegg et al., 2015; Vogt Weisenhorn et al., 2016). En effet, l'expression de l'ARN messager (ARNm) de GIRK2 diffère entre la SNpc et l'ATV avec une expression plus importante pour les neurones DA du noyau A9 et inversement pour la Calbindine (Gerfen et al., 1985; Liang et al., 1996; Schein et al., 1998). Cependant l'étude de Reyes et al., en 2012 vient infirmer cette théorie (Reyes et al., 2012). Des analyses complémentaires sont nécessaires pour identifier les protéines et les mécanismes moléculaires impliqués dans cette variabilité de survie des neurones DA du MV.

b) *Neurones non-dopaminergiques*

En plus du système DA dégénérés chez les malades parkinsoniens, les systèmes cholinergiques, noradrénergiques et sérotoninergiques (5-HT) sont également atteints aux différents stades de la MP (pour revue: Jellinger, 2015). Les neurones noradrénergiques du *locus caeruleus*, innervant l'hypothalamus, l'hippocampe, le cortex, la moelle épinière et le cervelet, présentent une dégénérescence quasiment équivalente à celle des neurones DA de la SNpc. En effet, plus de 60% de ces neurones meurent induisant ainsi l'apparition des troubles de l'anxiété, des troubles du sommeil et un état dépressif chez les patients parkinsoniens (Chan-Palay and Asan, 1989; pour revue: Delaville et al., 2011). Ces 2 derniers symptômes sont également une conséquence de l'altération de 25 à 45% des neurones 5-HT du noyau du raphé. Ce noyau innerve le striatum dorsal, le cortex frontal, le thalamus et l'hypothalamus et régule les voies viscéromotrices et somatosensorielles de la moelle épinière (Halliday et al., 1990).

Des lésions du système cholinergique constitué, entre autre, du noyau pédonculopontin (NPP), du noyau moteur dorsal vague, du noyau basal de Meynert, engendrent respectivement des troubles de la marche et de la posture, des problèmes gastriques et intestinaux, ainsi que l'apparition de démences (Whitehouse et al., 1983).

De plus, des modulations moléculaires ont également été observées dans les systèmes glutamatergique et GABAergique des patients parkinsoniens (McNeill et al., 1988).

En conclusion, la MP est une maladie multisystémique provoquée par la neurodégénérescence de différentes populations neuronales qui sont responsables de la grande variabilité des descriptions cliniques chez les patients parkinsoniens. Cependant, cette mortalité varie en fonction de la population neuronale. Cette différence de vulnérabilité reste à ce jour peu connue et des analyses complémentaires sont nécessaires.

2. Inclusions protéiques : corps et neurites de Lewy

La MP se caractérise, également, par la présence d'inclusions intracytoplasmiques découvertes par le médecin Friedrich Lewy en 1912 et nommées corps ou neurites de Lewy (CL ou NL) par le médecin Konstantin Tretiakoff, en 1919 (Lewy, 1912; Tretiakoff, 1919; pour revue : Goedert et al., 2017). Ces inclusions, répandues à travers les systèmes nerveux central, périphérique et notamment entérique, ne sont détectables qu'après des analyses post-mortem (pour revue: Del Tredici and Braak, 2016). Les CL, de formes sphéroïdes de 5 à 25 μm de diamètre, sont généralement localisés au niveau des somas des neurones ; tandis que les NL, de forme filiforme, apparaissent antérieurement et se situent dans les prolongements neuronaux (Braak et al., 1999; Kanazawa et al., 2012; Kuusisto et al., 2003; Maroteaux et al., 1988). Bien que présents en grande proportion chez les patients parkinsoniens, les CL ne sont pas spécifiques de la MP. Ils sont retrouvés aussi bien chez des personnes âgées considérées comme saines que chez des patients présentant différents types de pathologies neurodégénératives comme les syndromes parkinsoniens (Tu et al., 1998), la démence à corps de Lewy (Baba et al., 1998) ou encore le variant de CL de la maladie d'Alzheimer (Uéda et al., 1993) (pour revue: Wakabayashi et al., 2013). Toutefois, leurs compositions diffèrent. Dans le cadre de la MP, ces inclusions sont, entre autre, composées de protéines filamentaires phosphorylées d'alpha-synucléine majoritairement, et, en moindre proportion, d'ubiquitine (Spillantini et al., 1997, 1998).

Physiologiquement, le rôle exact de l'alpha-synucléine neuronale reste aujourd'hui non élucidé. Il a, cependant, été démontré que cette protéine joue un rôle dans la régulation de la libération de vésicules pré-synaptiques (Iwai et al., 1995). En condition pathologique, une mauvaise conformation de l'alpha-synucléine a été montrée comme

étant due : soit à une **mutation** faux-sens autosomale dominante du gène de l'alpha-synucléine (par exemple A53T, A53E, A30P, H50Q, G51N ou encore E46K) (Appel-Cresswell et al., 2013; Krüger et al., 1998; Lesage et al., 2013; Pasanen et al., 2014; Polymeropoulos et al., 1997; Zarranz et al., 2004), soit à une **surexpression** de la protéine sauvage par des duplications ou triplications de son locus (Chartier-Harlin et al., 2004; Singleton et al., 2003). Ces modifications exacerbent, par ailleurs, une tendance naturelle de l'alpha-synucléine à s'agréger. Ceci induit alors la formation d'oligomères d'alpha-synucléines toxiques à partir des monomères. Ces oligomères s'organisent ensuite sous forme de protofibrilles puis fibrilles amyloïdes de 200 à 600 nm de longueur et de 5 à 10 nm de largeur et constituent les CL et NL (Fig. 6). Le rôle cytoprotecteur ou cytotoxique de ces agrégations intracytoplasmiques reste encore à élucider (Ingelsson, 2016).

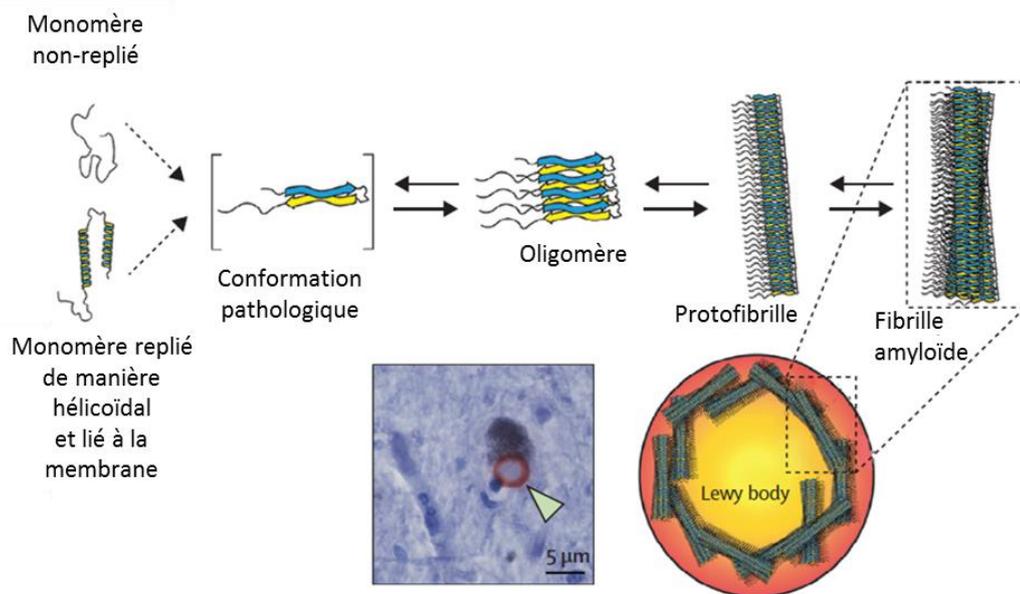


Figure 6: Représentation graphique des différentes étapes de l'agrégation de l'alpha-synucléine

Des monomères d'alpha-synucléine, non-repliés ou repliés de manière hélicoïdale et liés à la membrane, subissent des changements structuraux aboutissant à une forme pathologique qui s'agrége en oligomère. Ces derniers se polymérisent ensuite sous forme de protofibrilles puis fibrilles amyloïdes ressemblant à ceux observés au sein des corps de Lewy (Lewy body). Un corps de Lewy mésencéphalique, avec son alpha-synucléine marquée en rouge, localisé au sein d'un neurone positif pour la neuromélanine d'un patient parkinsonien avec une forme sporadique de la pathologie, est indiqué par une tête de flèche verte dans la microphotographie.

Modifiée à partir de (Dehay et al., 2015).

Bien que l'ensemble des processus physiopathologiques de ces agrégations protéiques doivent encore être caractériser de manière précise, la présence de CL/NL au sein de cellules nerveuses engendrerait une mort cellulaire suite à un stress oxydatif, des dysfonctionnements mitochondriaux et lysosomaux ainsi que des troubles de la perméabilité membranaire et du transport axonal (pour revues: Maday et al., 2014; Mullin and Schapira, 2013).

Les CL et NL ont été histologiquement localisés dans des zones spécifiquement atteintes dans la MP (Beach et al., 2010). En 2003, Braak et ses collègues émettent alors l'hypothèse que les agrégations protéiques se propagent de cellules nerveuses en cellules nerveuses, en promouvant par elles-mêmes le processus pathologique comme cela est observé dans les maladies à prions (Braak et al., 2003; pour revue: McCann et al., 2016). En effet, une distribution spatiale progressive et spécifique semble apparaître en lien avec les interconnexions des différentes régions affectées. Cette théorie, appelée de « double attaque », suppose que les agrégations débutent dans le bulbe olfactif et le système entérique avant de se propager dans le système nerveux central, du fait de leurs localisations et leurs plus grands risques d'exposition à des agents toxiques (Holmqvist et al., 2014; pour revue: Klingelhoefer and Reichmann, 2015).

Depuis le système entérique, les CL se propageraient de manière rétrograde dans le noyau moteur dorsal du nerf vague de la partie basse du tronc cérébral. Les CL se dirigeraient, ensuite, dans le sens caudo-rostral à travers les centres viscéromoteurs et somatomoteurs du tronc cérébral vers le mésencéphale, le cerveau antérieur et le cortex cérébral. La moelle épinière serait, elle aussi, atteinte à cause de projections descendantes venant de l'encéphale. Concernant le bulbe olfactif, ses projections dirigées vers les centres mésencéphaliques participeraient, également, à la propagation des agrégations protéiques (pour revue: Del Tredici and Braak, 2016). En 2008, deux études viennent conforter cette hypothèse : Li et ses collègues ainsi que Kordower et ses collaborateurs démontrent qu'entre 8 et 10% des neurones DA du MV de fœtus humains, transplantés depuis 11, 14 et 16 ans chez 3 patients parkinsoniens, développent des CL positifs pour l'alpha-synucléine phosphorylée et l'ubiquitine (Kordower et al., 2008; Li et

al., 2010). Cependant, cette hypothèse de « double attaque » reste controversée et quelques points importants sont encore à prendre en compte (pour revue: Walsh and Selkoe, 2016). En effet, la propagation et la concentration protéique ne sont ni corrélées à la perte neuronale ni à la durée ou à la sévérité de la maladie. De plus, certaines zones connectées à des neurones présentant des CL n'ont pas, ou peu, d'agrégations et les mécanismes exacts sous-tendant cette transmission restent encore à éclaircir. Au demeurant, dans les formes familiales de la MP, des gènes mutés, autres que l'alpha-synucléine, ont été identifiés comme étant responsables de dérégulations homéostatiques. Certains d'entre eux ont également été retrouvés dans les formes inopportunes de la pathologie, aussi appelées formes sporadiques, mais leur rôle exact, ainsi que leur implication, restent par ailleurs à élucider. Ainsi, le paradigme de propagation des processus pathologiques neurodégénératifs de la MP comporte encore à ce jour de nombreux points à clarifier.

Enfin, ces altérations moléculaires et ces dégénérescences cellulaires, étant diverses, éparses et évoluant avec le temps (Fig. 7), imputent à la MP un caractère hétérogène, multisystémique et complexe responsable de l'apparition d'un panel tout aussi varié de symptômes. Tout ceci complique gravement le diagnostic et l'élaboration de thérapies complètes et efficaces. Bien que de grandes avancées dans la compréhension de la neuropathologie de la MP ont été réalisées ces dernières décennies, de nombreux points restent encore à élucider dont notamment la ou les origines de la pathologie.

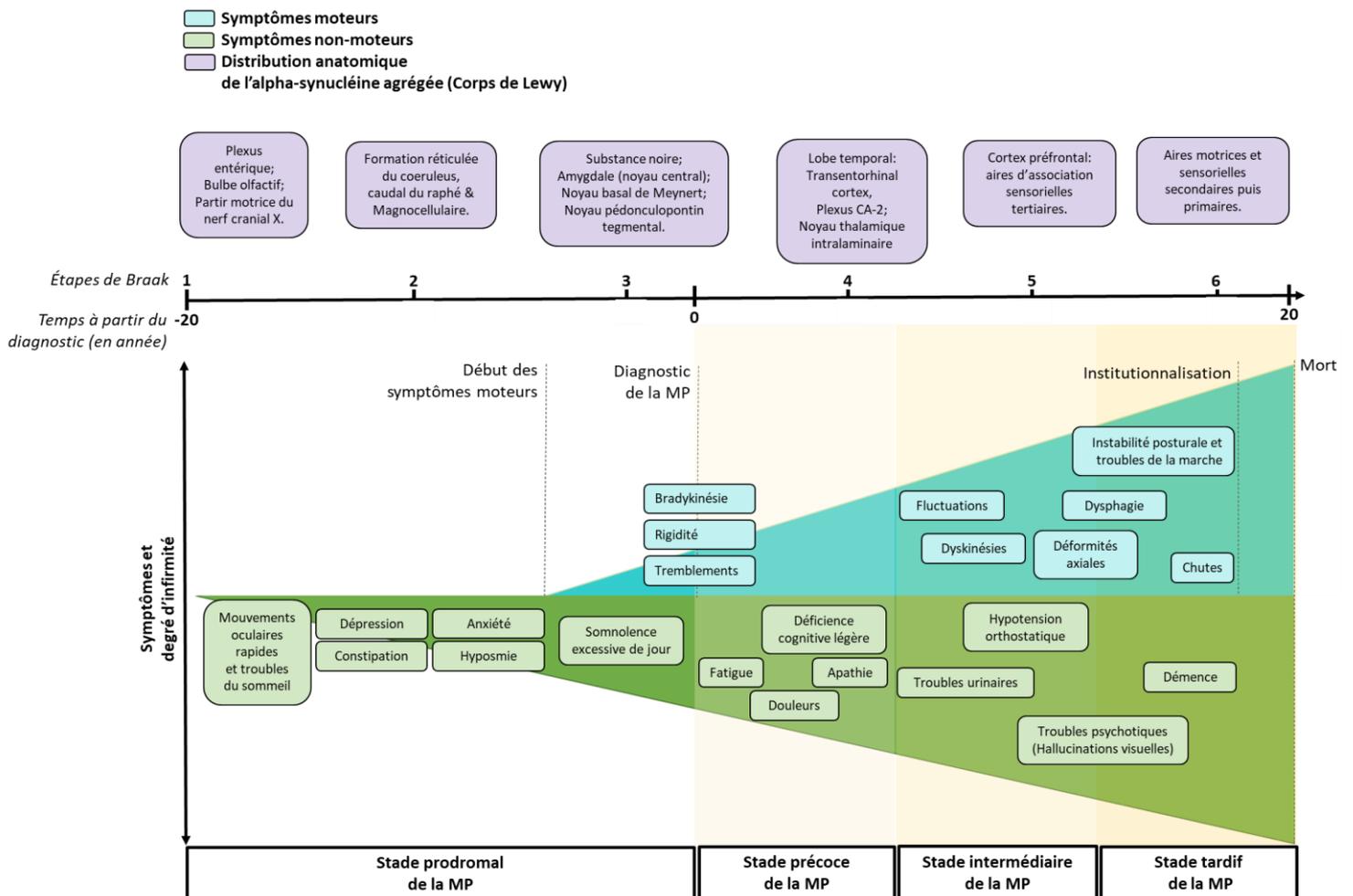


Figure 7: Chronologie hypothétique des symptômes moteurs (bleu) et non-moteurs (vert) et de la distribution anatomique de l'alpha-synucléine (violet) dès le début de l'apparition d'une forme classique de la maladie de Parkinson et jusqu'à la mort des patients.

Bien que les variations individuelles soient largement à prendre en considération, le diagnostic clinique de la MP débute par l'apparition de symptômes moteurs pouvant être précédés par des symptômes non-moteurs. Le nombre et la sévérité des symptômes cliniques augmentent avec la progression de la maladie, réduisant ainsi la qualité physique et mentale de la vie des malades. Les six étapes de la propagation des agrégations d'alpha-synucléine dans les différentes structures nerveuses, proposées par Braak et ses collègues, sont représentées en violet. CA-2 : Corne d'Ammon-seconde section. Modifiée à partir de (Hawkes et al., 2010; Poewe et al., 2017).

E. Étiologie

Bien que la MP soit considérée comme un réel enjeu de santé publique puisqu'elle représente la deuxième atteinte neurodégénérative dans le monde, la deuxième cause de handicap moteur après les accidents vasculaires cérébraux chez le sujet âgé et la maladie la plus fréquente parmi les syndromes parkinsoniens (HAS, 2016), la ou les causes relative(s) à son développement restent, encore à ce jour, incertaines.

Parmi la population de patients parkinsoniens, 10 à 15% des malades sont atteints d'une forme héréditaire mendélienne monogénique, dominante ou récessive, communément précoce mais également tardive, aussi appelée forme **familiale** (pour revue: Trinh and Farrer, 2013). Dans plus de 85% des cas, les patients parkinsoniens présentent une forme dite **sporadique**, apparaissant chez des patients plus âgés. De nos jours, l'hypothèse privilégiée est que la MP est une pathologie **multifactorielle**. L'âge mis à part, considéré comme le premier facteur de risque de la pathologie (pour revue: Levy, 2007), la combinaison de facteurs environnementaux et de prédispositions génétiques serait à l'origine des mécanismes physiopathologiques responsables de l'apparition des symptômes dans les formes ponctuelles de la MP (pour revue: Goldman, 2014).

1. Facteurs environnementaux

Dans la littérature, plusieurs facteurs environnementaux, dits à risques, ont été identifiés. Parmi ces risques, une exposition chronique à des **métaux** ou des **pesticides** augmenterait les prédispositions à la MP (pour revue: Pezzoli and Cereda, 2013). En effet, des métaux comme le fer (Wypijewska et al., 2010), le plomb (Kuhn et al., 1998) ou le manganèse (Gorell et al., 2004) perturberaient, entre autres, l'homéostasie des neurones à dopamine de la SNpc (pour revue: Chin-Chan et al., 2015). Quant aux pesticides il a été démontré le rôle de composés tels que le paraquat, un faible inhibiteur du complexe I des mitochondries (Tanner et al., 2011) ou la roténone (Tanner et al., 2011) qui agit comme le 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), un dérivé de l'héroïne découvert dans les années 1970, communément utilisé pour produire des modèles animaux parkinsoniens (Langston and Ballard, 1983). En effet, le MPTP détruit spécifiquement les neurones DA nigraux en inhibant la chaîne respiratoire mitochondriale du complexe I (Tipton and Singer, 1993). De plus, Thiruchelvam et al. ont montré que des expositions combinées de deux facteurs de risques : le paraquat et un fongicide appelé maneb, dont l'utilisation se chevauchent géographiquement aux États-Unis, potentialisent, chez la souris, les effets néfastes sur les neurones DA de la SNpc (Thiruchelvam et al., 2000). Cependant, aucun de ces facteurs n'a été identifié, à ce jour, comme étant seul responsable de l'apparition de la MP, ce qui renforce l'hypothèse multifactorielle de la pathologie.

Si des facteurs environnementaux favorisent le développement de la MP, d'autres sont, quant à eux, associés à une réduction du risque de développement de la MP comme la consommation de cigarettes ou de caféine via des mécanismes encore inconnus aujourd'hui (pour revue: Elbaz et al., 2016).

2. Facteurs génétiques

Avec la découverte des atteintes mitochondriales du MPTP dans les années 1970, de nombreux chercheurs ont, à cette époque, supposé que le mécanisme induisant la MP reposait sur une altération de la chaîne de respiration mitochondriale. Cependant, bien que l'aspect génétique de la MP ait longtemps été controversé, la découverte de mutation de gènes induisant, ou étant susceptible d'induire l'apparition de la neuropathologie et des symptômes, n'a pas mis en relief de lien direct avec la respiration mitochondriale. En revanche, des gènes, régulant les mécanismes du contrôle de la qualité protéique ont été découverts comme celui mis en place lors des déficiences mitochondriales. Par exemple, il a été démontré que la mutation héréditaire récessive du gène codant pour la kinase mitochondriale **PINK1** (Kinase putative 1 induite par un homologue tension et une phosphatase) perturbe son activité de kinase et son rôle dans la mitophagie, ce qui conduit à un état précoce de la MP chez les patients (Fig. 8) (Valente et al., 2004).

Un autre processus de contrôle de la qualité protéique perturbé par une mutation génique engendrant une cytotoxicité est la protéostasie. La fonction de la protéostasie est le contrôle du repliement optimal des protéines et l'élimination de celles qui sont mal repliées. Ainsi, comme décrit précédemment, des mutations héréditaires dominantes du gène *SNCA* codant pour l' **α -synucléine** sont notamment responsables d'une mauvaise conformation protéique et de son agrégation dans les CL (Fig. 8) (Polymeropoulos et al., 1997). De plus, des polymorphismes en 5' et 3' du gène *SNCA* ont été associés à l'apparition de la MP pour les cas sporadiques (Mueller et al., 2005).

La mutation héréditaire dominante la plus couramment retrouvée dans les formes familiales est une répétition riche en leucine retrouvée dans le gène codant pour la kinase 2 (**LRRK2**) (Funayama et al., 2002). Cette mutation engendre une augmentation de son activité de GTPase (GTP : guanosine triphosphate) et de kinase (West et al., 2005). De manière physiologique, la kinase 2 a une action régulatrice de la croissance neuronale lors

du développement. Cependant, les mécanismes exacts impliqués dans la neurodégénérescence restent, à ce jour, incertains (pour revue: Cookson, 2010).

Ces 20 dernières années, de nombreuses mutations en lien avec la MP ont été découvertes. Il est fort probable que différentes protéines mutées soient impliquées dans des mécanismes neurodégénératifs communs (que ce soit par interactions protéiques ou chevauchement de fonction). Ainsi, Serge Przedborski suppose « *qu'il pourrait être utile, voire essentiel, que nous reconnaissons que diverses maladies neurodégénératives peuvent représenter différentes expressions de problèmes fondamentaux communs* » (pour revue: Przedborski, 2017).

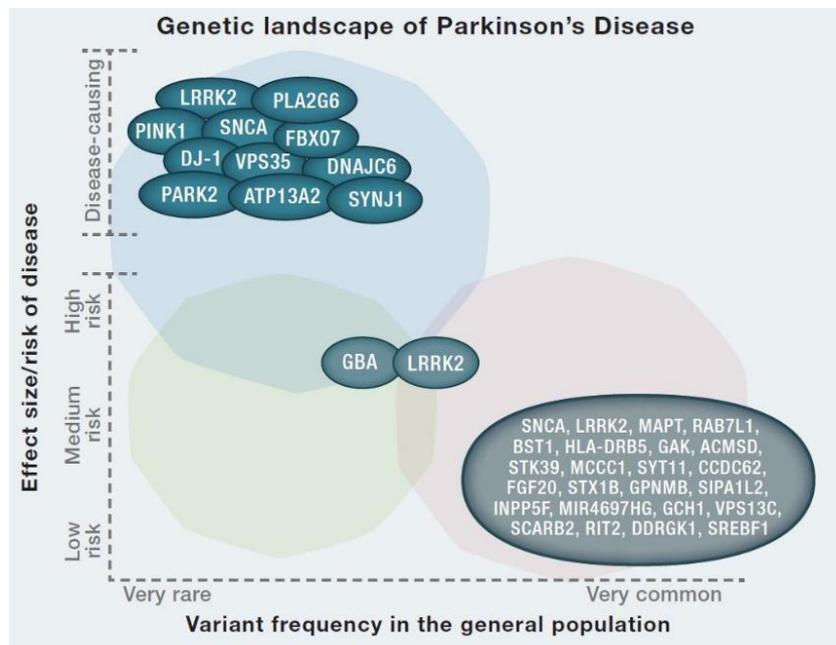


Figure 8: Forme familiale de la MP: Gènes responsables de l'apparition de la maladie et gènes à risques.

Grâce à de nombreuses études d'associations pangénomiques, plusieurs gènes autosomaux ont été identifiés comme étant porteur d'une mutation monogénique responsable du développement de la maladie (en bleu). Parmi ces gènes, trois présentent une mutation dominante : SNCA, LRRK2 ayant la plus haute fréquence de mutation chez les patients et VPS35. Les huit derniers gènes possèdent en revanche une mutation récessive. : PINK1, PARK2, ATP13A2, SYNJ1, DNAJC6, DJ1, FBX07, PLA2G6. Certaines mutations des variants de ces gènes (SNCA, LRRK2), et d'autres gènes et loci (GBA, MAPT, RAB7L1, BST1, HLA-DRB5, GAK, ACMSD, STK39, MCCC1, SYT11, CCDC62, FGF-20, STX1B, GPNMN, SIPA1L2, INPP5F, MIR4697HG, GCH1, VPS13C, SCARB2, RIT2, DDRGK1, SREBF1) augmentent, peu (en vert) ou pas (en rose), le risque d'incidence de la MP. De plus certaines mutations monogéniques sont également identifiées dans les formes sporadiques comme pour le gène LRRK2.

Modifié à partir de (Brás et al., 2015)

En conclusion, la combinaison de l'âge, des facteurs environnementaux et génétiques, serait à l'origine de processus physiopathologiques responsables, entre autres, de la mort lente et progressive de différentes populations neuronales du système nerveux. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et de leurs origines permettrait, idéalement, la mise au point de thérapies efficaces contrecarrant tous les déficits anatomiques et symptomatiques de la pathologie. Pour cela, la mise en place de modèles animaux mimant efficacement la MP est un outil nécessaire et inévitable.

F. Modèles animaux de la maladie de Parkinson

La MP se développant exclusivement chez l'Homme, il est nécessaire d'induire cette pathologie chez des animaux. De nombreux modèles ont été mis au point ces dernières années afin d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes pathologiques, ceci dans le but d'élaborer des thérapies efficaces. Idéalement, ces modèles mimeraient spécifiquement l'étiologie et les déficits neuroanatomiques progressifs de la pathologie et, ce, de manière irréversible et reproductible. Ainsi les modèles animaux devraient présenter des CL et NL dans les régions en accord avec la maladie. De plus, une mort progressive et spécifique des neurones atteints, comme les neurones à dopamine de la SNpc, devrait être retrouvée. Cette dégénérescence devrait aboutir à une perte progressive des fibres DA striatales et à une diminution du taux de dopamine responsable de l'apparition de symptômes moteurs. Une atteinte et des modulations cholinergiques, noradrénergiques, sérotoninergiques, glutamatergiques et GABAergiques devraient également être présentes et être accompagnées de symptômes non-moteurs.

Dans le but d'induire la MP chez les animaux, différentes stratégies de modélisation ont été testées. Par exemple, des neurotoxines, des agents pharmacologiques, des transgénèses, des distributions de vecteurs viraux ou encore des injections de protéines mutées exogènes ont été expérimentés (pour revues: Blesa and Przedborski, 2014; Visanji et al., 2016). À ce jour, les différents modèles développés ne reproduisent pas la totalité des déficits retrouvés chez les patients mais seulement quelques caractéristiques spécifiques de la physiopathologie. Ainsi, le choix du modèle animal est relatif à la problématique que l'on cherche à résoudre. Dans cette étude, nous

nous intéressons à l'efficacité anatomique et fonctionnelle motrice d'une transplantation cellulaire. Nous avons donc choisi un modèle animal présentant une perte spécifique des neurones à dopamine de la SNpc et une diminution du taux de dopamine au niveau du striatum développant des symptômes moteurs : le modèle de lésion à la neurotoxine 6-hydroxydopamine (6-OHDA).

Le modèle animal de la MP utilisé dans ces travaux de thèse s'appuie sur une étude publiée par Ungerstedt en 1968. Cette dernière démontre pour la première fois que des injections intracérébrales de 6-OHDA dans des régions contenant des cellules monoaminergiques, chez le rat, détruisent de manière spécifique et localisée le système catécholaminergique comprenant les neurones dopaminergiques et noradrénergiques. Il conclut alors que cette toxine est un modèle utile pour des études sur les neurones monoaminergiques (Ungerstedt, 1968). Aujourd'hui encore, cette toxine est communément utilisée pour développer des modèles *in vitro* et *in vivo* de la maladie. La 6-OHDA a par ailleurs démontré son efficacité que ce soit chez le rongeur, les primates non-humains, les chats, les chiens (pour revue: Bové et al., 2005). En effet, de par son homologie de structure avec la dopamine, cet analogue hydroxylé de la dopamine et de la noradrénaline a une forte affinité pour les transporteurs de dopamine (Dopamine active transporter, DAT) ou de noradrénaline (Norepinephrin transporter, NET) localisés au niveau de la membrane plasmique, lui permettant, ainsi, son entrée dans les neurones (Jonsson and Sachs, 1970). Par un phénomène d'auto-oxydation, la 6-OHDA engendre un stress oxydatif fortement toxique qui induit alors une mort neuronale accompagnée d'une gliose (Saner and Thoenen, 1971). Ne passant pas la barrière hématoencéphalique, la 6-OHDA est généralement injectée directement, par stéréotaxie, dans la SN, au niveau du faisceau moyen du télencéphale (MFB) ou dans le striatum dorsal. L'injection de la 6-OHDA est accompagnée d'un inhibiteur sélectif de la recapture nor/adrénergique pour prévenir les dommages des neurones nor/adrénergiques (Javoy et al., 1976). Chez le rongeur, une injection au niveau du striatum dorsal induit une dégénérescence progressive et partielle des neurones à DA de la SNpc (Sauer and Oertel, 1994). À l'inverse, une injection dans le MFB ou la SN engendre une mort rapide, quasi-complète, voire totale, des neurones DA dans les 12 à 24 h après l'injection (Jeon et al., 1995), aboutissant, après 2 à 3 jours, à une diminution notable des terminaisons DA (80-100%) et du taux de

dopamine dans le striatum dorsal. Il est à noter que cette toxine affecte en moindre proportion les neurones DA de l'ATV (Przedborski et al., 1995). Ces lésions nigrales engendrent au final des déficits moteurs. Il a été démontré que des injections bilatérales au niveau de la SN engendrent une sévère akinésie, une perte d'équilibre, une aphagie et une adipsie pouvant conduire à la mort de l'animal (Ungerstedt, 1971b). En revanche, une injection unilatérale permet de développer une asymétrie posturale, une akinésie et un déficit de dextérité des membres antérieurs créant ainsi un modèle animal de syndrome hémiparkinsonien durable et viable (Ungerstedt, 1971b).

Il est possible de quantifier le degré de la lésion unilatérale à la 6-OHDA qui peut être comparé au côté non lésé, servant de contrôle interne, par l'utilisation de tests de comportements, chez les rongeurs par exemple (pour revue: Dunnett and Lelos, 2010). Parmi les tests pouvant mesurer la dénervation DA, il y a notamment les tests de rotations induites par des drogues tels que l'apomorphine et l'amphétamine (Ungerstedt and Arbuthnott, 1970). L'apomorphine est un agoniste DA direct qui se fixe sur les récepteurs DA post-synaptiques. Après une lésion de la voie nigrostriée, ces récepteurs sont surexprimés dans le striatum afin de compenser la perte de dopamine. Cette hypersensibilité induit alors des rotations du côté controlatéral à la lésion lorsque la perte des neurones DA est conséquente. L'amphétamine, quant à elle, se fixe sur les transporteurs DAT localisés au niveau pré-synaptique et favorise la libération de dopamine induisant alors la rotation des animaux du côté ipsilatéral à la lésion. Ces rotations sont visibles même après une lésion modérée des neurones à DA de la SNpc.

Bien que le modèle de la 6-OHDA ne soit pas un modèle complet de la MP, de par son approche dégénérative aiguë et l'absence de CL et NL intracellulaires ou de la totalité des symptômes non-moteurs, il permet néanmoins l'acquisition d'un modèle hémiparkinsonien relativement reproductible et de faible coût. Ce modèle semble donc le plus approprié pour notre étude d'amélioration de l'efficacité d'une thérapie de remplacement cellulaire. De manière générale, ce modèle ainsi que d'autres cités précédemment ont été des outils primordiaux dans l'élaboration des traitements thérapeutiques, actuels et expérimentaux, mis en place pour soulager les patients parkinsoniens et tenter de guérir la MP.

II. Chapitre II : Traitements de la maladie de Parkinson

Différentes approches thérapeutiques ont été développées afin de traiter les patients parkinsoniens et améliorer leurs conditions de vie. Cependant, la mise en place d'un traitement efficace nécessite de prendre en compte la totalité des atteintes anatomiques et fonctionnelles de la maladie. Or, deux siècles après l'analyse réalisée par James Parkinson, aucun traitement n'est aujourd'hui capable d'arrêter ou même ralentir la progression de la pathologie.

Au vu de la pluralité et variabilité pathogénique et symptomatique de la MP, il serait utopique de croire qu'un traitement ciblant spécifiquement qu'un seul aspect de la maladie soit suffisant pour la traiter dans son intégralité. Les approches thérapeutiques et techniques actuellement utilisées, ou en cours de développement, sont nombreuses et variées (pour revues: Pires et al., 2017) et se basent sur trois axes thérapeutiques. Les premiers traitements ciblent de préférence les atteintes symptomatiques de la MP. D'autres se focalisent sur la protection ou la régénération des neurones résiduels des populations neuronales affectées, tandis que la neurorestauration consiste à remplacer les neurones dégénérés par de nouveaux neurones fonctionnels. Bien que chacune de ces approches nécessite une mise au point technique, une thérapie multi-approches serait plus à même de soigner la MP dans sa globalité et pourrait s'adapter à l'évolution anatomo-pathologique propre à chaque patient. Ainsi, le but de ce chapitre consiste à décrire les approches thérapeutiques actuellement utilisées pour améliorer le quotidien des patients mais également les traitements en cours d'expérimentation. Toutefois, seuls les traitements mis en place pour pallier aux déficits moteurs induits par la perte de neurones à dopamine de la SNpc sont détaillés ci-après (Tableau 2).

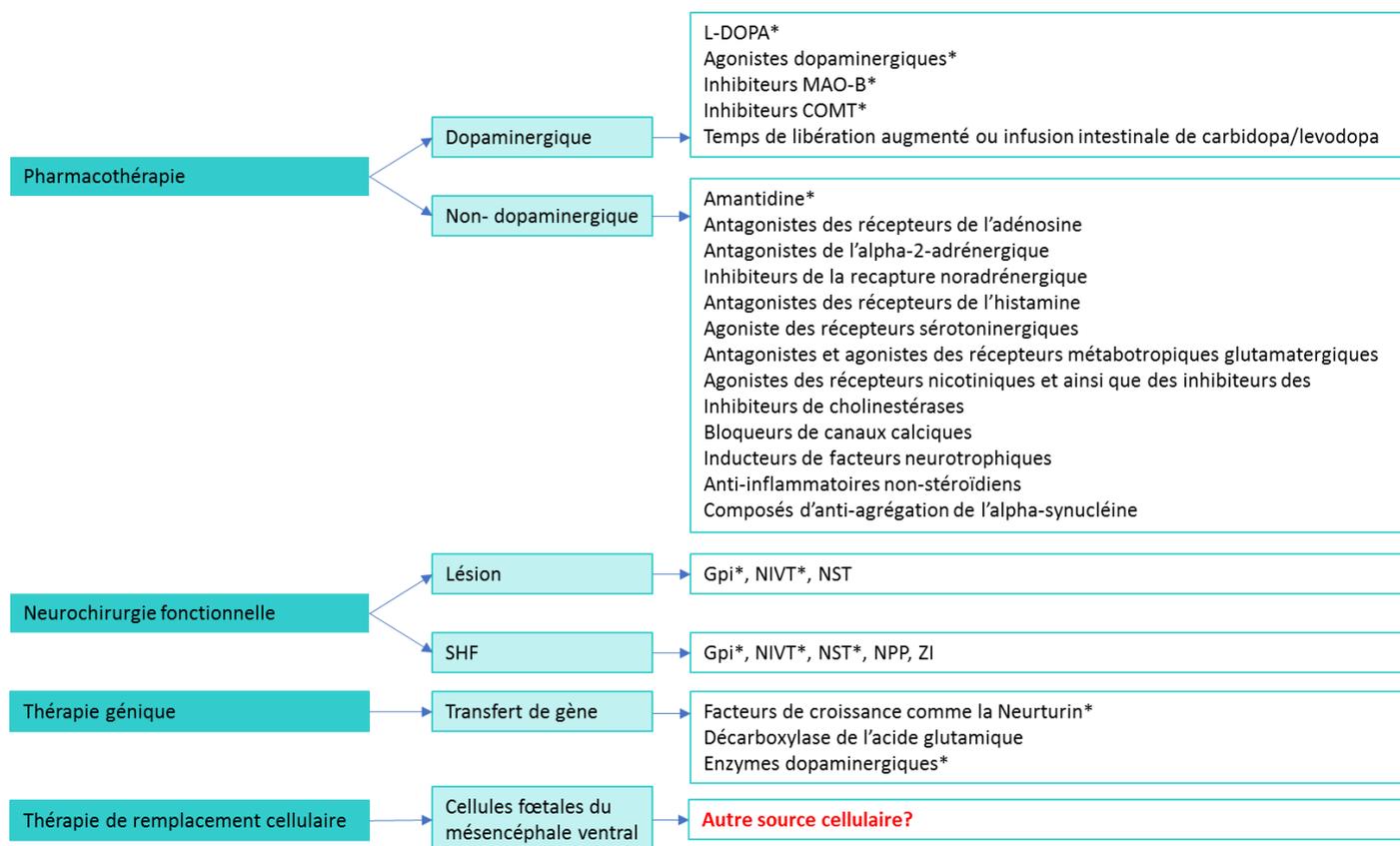


Tableau 2: Résumé des stratégies thérapeutiques actuellement utilisées ou en cours de recherches pour réduire les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson

L'étoile (*) indique les approches actuellement utilisées en clinique. MAO-B : la monoamine oxydase de type B ; COMT : catechol-O-méthyltransferase ; Gpi : Globus pallidus interne ; NIVT : noyau intermédiaire ventral du thalamus ; NST : noyau sous-thalamique, NPP : noyau pédonculopontin ; ZI : Zone incerta. Modifié à partir de (Pires et al., 2017; Smith et al., 2012).

A. Traitements symptomatiques

Le premier traitement utilisé pour réduire les symptômes moteurs chez les patients parkinsoniens avait pour but de lutter contre le déficit cholinergique observé au niveau du striatum. En effet, dès la fin du 19^{ème} siècle, le docteur Charcot réduit cette carence par une approche pharmacologique en utilisant des anticholinergiques (pour revue: Goetz, 2011). Généralement prescrits sur des malades de moins de 65 ans, ces médicaments, tels que le trihexyphénidyle et le bipéridène, engendrent des améliorations motrices légères et de nombreux effets secondaires comme des troubles de la mémoire, des hallucinations ou encore une hypotension (pour revue: Pires et al., 2017). Aujourd'hui, ces anticholinergiques sont moins utilisés du fait de leur faible efficacité thérapeutique et surtout de la meilleure connaissance de l'anatomopathologie. Deux autres caractéristiques pathologiques sont préférentiellement traitées dans le but de réduire voire arrêter les symptômes moteurs des patients parkinsoniens : la restauration des niveaux de dopamine striataux et de l'activité des structures des ganglions de la base.

1. Restauration du taux de dopamine

Avec la diminution du taux de dopamine dans les régions cibles de la SNpc, et plus particulièrement au niveau du striatum, de nombreux chercheurs se sont intéressés au rétablissement de l'action DA en utilisant également une approche pharmacologique. Pour cela plusieurs stratégies ont été étudiées. L'une d'entre-elles consiste à restaurer le taux de dopamine physiologique endogène dans la fente synaptique en utilisant des précurseurs de la dopamine ou des inhibiteurs de sa métabolisation. Il est également possible d'activer les voies de signalisation DA par la stimulation des récepteurs DA à l'aide d'agonistes.

a) Dopathérapie : la L-DOPA, un précurseur de la dopamine

De nos jours, le traitement le plus utilisé en clinique consiste à administrer un précurseur métabolique de la dopamine : la L-3,4 dihydroxyphénylalanine (L-DOPA), aussi appelée lévodopa selon son terme pharmacologique international.

Historiquement, la L-DOPA a été synthétisée chimiquement pour la première fois en 1921 par le biochimiste Markus Guggenheim (pour revue: Fahn, 2015). Toutefois, il faudra attendre 1967 pour que le neuropharmacologue George Cotzias démontre la possibilité d'avoir recours à cette molécule pour un usage clinique à long terme (Cotzias et al., 1967). Étant capable de traverser la barrière hémato-encéphalique, son administration se fait principalement par voie orale et est couplée à des inhibiteurs enzymatiques qui, eux, ne traversent pas la barrière. En effet, il a été démontré que des inhibiteurs, tels que la carbidopa et le bensérazide, permettent d'éviter le catabolisme de la L-DOPA par les intestins et le foie et favorisent son absorption et par conséquent son action (Cotzias et al., 1969). Une fois arrivée dans le système nerveux central, la L-DOPA est décarboxylée en dopamine par la décarboxylase d'acide aminé aromatique (AADC), aussi appelée DOPA décarboxylase. Cette métabolisation est majoritairement réalisée dans les neurones DA mais aussi 5-HT (Ng et al., 1970). Ainsi, la dopamine nouvellement synthétisée est ensuite stockée dans des vésicules et est prête à être libérée dans la fente synaptique et notamment au niveau des synapses striatales. Cette augmentation des concentrations DA, induite par la lévodopa, permet ainsi une amélioration significative de la majorité des symptômes moteurs et, par la même occasion, du quotidien des patients.

L'efficacité de la L-DOPA est en partie dépendante du nombre de neurones DA nigraux non-dégénérés. Cependant, leur nombre diminue avec la progression de la maladie, ce qui réduit les performances thérapeutiques de la lévodopa. Afin de prolonger son efficacité, il est possible d'augmenter les doses prescrites ou encore d'administrer une forme de la lévodopa à plus longue durée d'activité. Ce médicament peut, également, être couplé avec d'autres agents pharmacologiques tels que des inhibiteurs de la métabolisation DA ou encore des agonistes de récepteurs DA (Fig. 9) (pour revus: Smith et al., 2012).

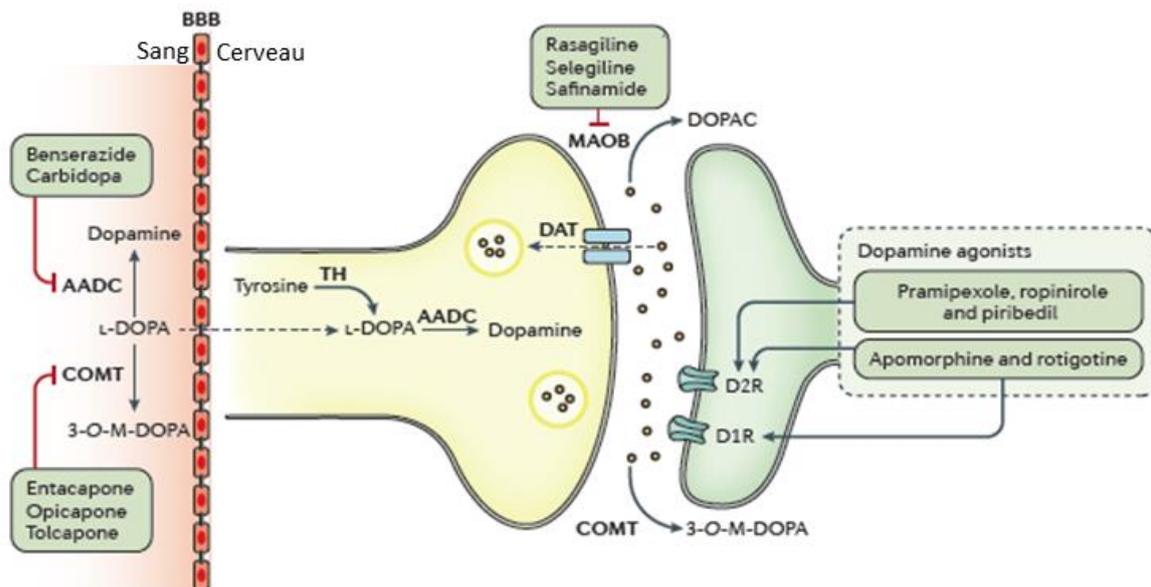


Figure 9: Représentation graphique des différents médicaments utilisés pour traiter les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson et leurs cibles moléculaires.

En présynaptique, trois principales cibles sont utilisées pour réduire les symptômes moteurs de la MP : i) une substitution de la L-DOPA combinée avec ii) des inhibiteurs actifs en périphérie de la décarboxylase d'acide amine aromatique (AADC) ou iii) des inhibiteurs de la catéchol-O-méthyltransférase (COMT). Dans la fente synaptique, des inhibiteurs de la monoamine oxydase de type B (MAOB) peuvent être prescrits pour réduire la dégradation de la dopamine, tandis que des agonistes de la dopamine peuvent être utilisés pour activer les récepteurs dopaminergiques post-synaptiques. 3-O-M-DOPA : 3-O-méthyl-DOPA ; BBB : Barrière hémato-encéphalique ; D1R : Récepteur à la dopamine D1 ; DAT : transporteur de la dopamine ; DOPAC : acide 3,4-dihydroxyphénylacétique ; TH : tyrosine hydroxylase.

Modifiée à partir de (Poewe et al., 2017).

b) Inhibiteurs de la métabolisation dopaminergique

Comme décrit au paragraphe précédent, des inhibiteurs enzymatiques de la métabolisation de la dopamine peuvent être utilisés en complément de la L-DOPA afin de faciliter et conserver plus longtemps son temps de demi-vie et son activité (pour revue: Maranis et al., 2011). Par exemple, la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) qui dégrade, notamment, la dopamine en 3-méthoxytyramine, peut être inhibée par la tolcapone (Dingemans et al., 1995), l'opicapone (Ferreira et al., 2016) et l'entacapone (Ruottinen and Rinne, 1996). Cette inhibition prolonge la demi-vie de la lévodopa de 30 à 50% (Keränen et al., 1994). D'autres inhibiteurs peuvent également être utilisés, tels que la sélégiline (Golbe et al., 1988), le safinamide (Stocchi et al., 2012) et la rasagiline (Parkinson Study Group, 2002, 2004), qui inhibent, de manière irréversible, la monoamine oxydase de type B (MAO-B) responsable de la dégradation de la dopamine en acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (DOPAC). Cependant, ce dernier a une efficacité limitée, c'est

pourquoi, au lieu d'une co-médication avec la lévodopa, ces inhibiteurs sont, en général, prescrits avant l'administration de L-DOPA à des patients aux premiers stades de la maladie, présentant des symptômes moteurs légers (Olanow et al., 2008; Parkinson Study Group, 2002).

c) *Agonistes dopaminergiques*

À l'instar des inhibiteurs enzymatiques, les agonistes DA, utilisés pour stimuler les récepteurs de la dopamine et activer leurs voies de signalisation, sont généralement prescrits en monothérapie à de jeunes patients (<70 ans) avec des symptômes moteurs de faibles intensités (Inzelberg et al., 2003). Ils peuvent également être administrés en tant qu'adjuvant de la lévodopa (pour revue: Pires et al., 2017). Bien qu'induisant d'importants effets secondaires comme des hallucinations, des nausées, des somnolences ou encore une hypotension (pour revue: Wood, 2010), deux familles d'agonistes DA sont actuellement utilisées, les ergolines et les non-ergolines. Ces deux types d'agonistes se fixent sur les récepteurs à dopamine de type D1 ou D2 présents au niveau des NEM du striatum qui modulent la voie directe et la voie indirecte des ganglions de la base, et par conséquent le contrôle de la motricité volontaire. Cependant, la diminution du taux de dopamine, dans le cadre de la MP, induit une perte de cette régulation et l'apparition des symptômes moteurs caractéristiques de la pathologie. Ainsi l'utilisation d'agonistes DA aide à la restauration de l'activité de ces deux voies et atténue les symptômes moteurs des patients parkinsoniens.

Des agonistes spécifiques des récepteurs D2 sont actuellement utilisés comme la bromocriptine (Steiger et al., 1996), la cabergoline (Hutton et al., 1993) ou encore le pramipexole (Holloway et al., 2004), le ropinirole (Lieberman et al., 1998) et le piribédil (Ziegler et al., 2003). Cependant, il n'existe pas d'agonistes spécifiques des récepteurs D1. En revanche, l'apomorphine, un agoniste puissant des récepteurs D1 et D2, injecté en sous-cutané, permet de réduire les fluctuations motrices plus ou moins importantes induites par la lévodopa chez des patients à un stade tardif de la maladie (Stibe et al., 1988)

d) *Fluctuations motrices et dyskinésies induites par la L-DOPA*

Comme décrit au chapitre précédent, la progression de la MP diminue graduellement l'efficacité de la pharmacologie mise en place pour réduire les symptômes moteurs. Cette baisse d'efficacité induit une augmentation des doses de lévodopa prescrites aux patients afin d'obtenir un effet thérapeutique. Cependant cette augmentation est responsable, en contrepartie, du développement d'effets secondaires moteurs tels que des fluctuations motrices ou encore des mouvements anormaux et involontaires appelés dyskinésies induites par la L-DOPA (DIL). Il est à noter que plus les patients sont diagnostiqués jeunes ou ont une dégénérescence DA sévère, plus le risque de développer ces perturbations motrices est élevé (Ahlskog and Muentner, 2001).

De manière plus générale, les agonistes, les inhibiteurs de métabolisation DA ou encore la lévodopa peuvent développer des fluctuations motrices. Ces fluctuations sont caractérisées par des akinésies ou des variations de réponse à la médication appelées effet « ON/OFF » (Fig. 10). En effet, un patient sous traitement peut répondre favorablement à ce dernier et présenter une réduction de ses symptômes moteurs (phase dite « ON ») ou bien ne plus répondre au traitement et perdre l'amélioration de sa motricité (phase dite « OFF ») ce qui dégrade les conditions de vie des patients (pour revue: Maranis et al., 2011). La lévodopa participe également au développement de DIL chez près de 50 à 90 % des malades, après 5 à 10 ans de traitement en moyenne (Cotzias et al., 1969; Yahr et al., 1969). Ces DIL sont des mouvements hyperkinétiques et dystoniques, involontaires et incontrôlables, voire douloureux, qui peuvent apparaître en phase ON, OFF ou les deux. Ces effets secondaires sont caractérisés par des mouvements de la tête accompagnés de dyskinésies grimaçantes et linguo-labiales auxquels s'ajoutent une choréoathétose et une dystonie du cou, du tronc et des membres (Prashanth et al., 2011). Ces troubles seraient dus à une production incontrôlée de dopamine par les neurones à 5-HT couplée à une hypersensibilité pathologique des récepteurs DA du putamen (Carta et al., 2007). De plus, les prises répétées de L-DOPA, en raison de sa courte demi-vie (1h30-3h), entraîneraient une stimulation pulsatile des récepteurs DA striataux et participeraient à l'élaboration de ces dyskinésies (Juncos et al., 1989).

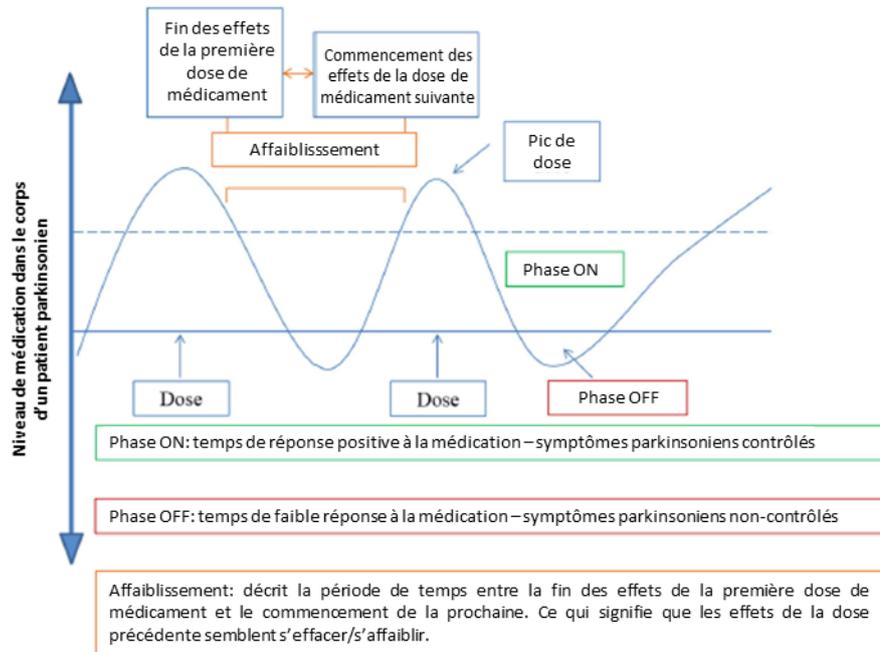


Figure 10: Représentation graphique de l'affaiblissement typique dans une journée des effets de la médication de patients parkinsoniens

Afin de pallier à ces troubles moteurs, l'amantadine, un faible antagoniste des récepteurs glutamatergiques N-méthyl-D acide aspartique (NMDA), peut être utilisé (Parkes et al., 1971). Une étude clinique, réalisée par Thomas et al., en 2004, sur 40 patients parkinsoniens traités depuis plus de 7 ans à la lévodopa, a permis de démontrer que l'amantadine est capable de réduire les DIL de 45% pendant au moins les 8 premiers mois (Thomas et al., 2004).

e) Etudes expérimentales de la restauration de l'action dopaminergique

Tous les traitements pharmacologiques décrits précédemment sont actuellement utilisés par les cliniciens pour réduire les symptômes moteurs des patients parkinsoniens. Cependant avec les effets secondaires qu'ils engendrent tels que les fluctuations motrices ou les DIL, il est nécessaire d'améliorer les traitements actuels ou bien d'élaborer de nouvelles stratégies de thérapies symptomatiques (pour revue: Lotia and Jankovic, 2016).

Pour les traitements actuels comme la lévodopa, des études cliniques s'intéressent à leur absorption intestinale dans le but d'augmenter leur vitesse d'intégration et leur temps d'action (Fernandez et al., 2015; Greig and McKeage, 2016; LeWitt et al., 2014).

En plus de la pharmacothérapie, des thérapies géniques sont actuellement étudiées afin d'être également utilisées pour restaurer les taux de dopamine striataux. Il existe pour cela des méthodes employant des vecteurs viraux ou des méthodes non-virales comme l'électroporation en vue de transférer des gènes d'intérêts dans une région précise du système nerveux central (pour revue: Lin et al., 2017). L'intégration de ces gènes peut alors moduler spécifiquement l'expression de protéines dans les cellules nerveuses. Par exemple, il est possible d'injecter des enzymes de synthèse de la dopamine telles que la TH, l'AADC et la GFP cyclohydrolase afin d'induire la production de dopamine dans le striatum et améliorer les symptômes moteurs (Azzouz et al., 2002; Christine et al., 2009; Jarraya et al., 2009). Des essais cliniques de phase I et II sont actuellement en cours (NCT01856439 ; NCT01973543).

2. Restauration de l'activité physiologique des ganglions de la base

Un autre axe thérapeutique pouvant être utilisé pour réduire les symptômes moteurs des patients parkinsoniens à la place, ou en plus, du rétablissement de l'action DA est la restauration de l'activité fonctionnelle des structures des ganglions de la base.

Pour rappel, suite à la privation DA striatale induite par la mort des neurones à dopamine de la SNpc, tout le système des ganglions de la base est dérégulé et notamment le GPi et le NST qui sont hyperactivés. L'une des stratégies thérapeutiques pour rétablir l'activité physiologique de ces structures consiste donc en une approche chirurgicale fonctionnelle à l'aide de lésions ou de stimulations à haute fréquence (SHF).

a) Ablation

Avant l'avènement de la lévodopa, dans les années 1950, le traitement mis en place pour réduire les symptômes moteurs des patients parkinsoniens consistait en une ablation des structures cérébrales dérégulées lors de la MP (Meyers, 1951). Ces lésions, chimiques, thermiques ou par ondes radio, sont généralement réalisées unilatéralement car elles présentent moins d'effets secondaires que les ablations bilatérales (Svennilson

et al., 1960). Par exemple, une excision du GPi, appelée pallidotomie (pour revue: Cif and Hariz, 2017), ou encore du thalamus, la thalamotomie (Nagaseki et al., 1986) ou du NST, la subthalamotomie (pour revue: Jourdain et al., 2014), sont capables de réduire les symptômes moteurs tels que la bradykinésie, les tremblements, la rigidité musculaire mais aussi les dyskinésies. Avec la découverte des effets cliniques de la lévodopa dans les années 1960, cette technique médicale, sévère et irréversible, a été délaissée au profit des thérapies pharmacologiques.

Avec la progression de la maladie, les médicaments utilisés ont rapidement perdu de leur efficacité et ont commencé à provoquer des effets secondaires tels que les DIL. Les ablations étant capables de réduire ces dyskinésies, de nombreux chercheurs et cliniciens se sont alors de nouveau intéressés aux lésions dans les années 1990. Cependant avec le développement de la SHF dans ces mêmes années, les ablations furent rapidement délaissées au profit de cette nouvelle méthode (pour revue: Krack et al., 2017)

b) Stimulation à haute fréquence

Réalisée pour la première fois sur le noyau intermédiaire ventral du thalamus (NIVT) de patients parkinsoniens par Benabid et ses collègues en 1987 (Benabid et al., 1987), la SHF permet d'obtenir les mêmes effets que les ablations mais sans leurs effets destructeurs irrévocables (pour revue: Krack et al., 2017). Bien que ses mécanismes d'action ne soient pas totalement appréhendés, cette méthode consiste à bloquer le signal électrique anormal des structures des ganglions de la base par une stimulation électrique. Pour cela, des électrodes de fin calibre sont installées bilatéralement en intracérébral et sont reliées en sous-cutané à un pacemaker, localisé en sous-claviculaire, et qui comporte un bouton activateur externe (Fig. 11). Cet interrupteur permet ainsi d'activer, réguler ou désactiver le courant envoyé aux électrodes, c'est-à-dire, d'adapter l'intensité de la stimulation en fonction des besoins du patient. La durée de celle-ci peut être de 60 à 90 μ s avec une intensité comprise entre 2.5 et 3.5 V et une fréquence entre 130 et 185 Hz (pour revue: Olanow et al., 2009).

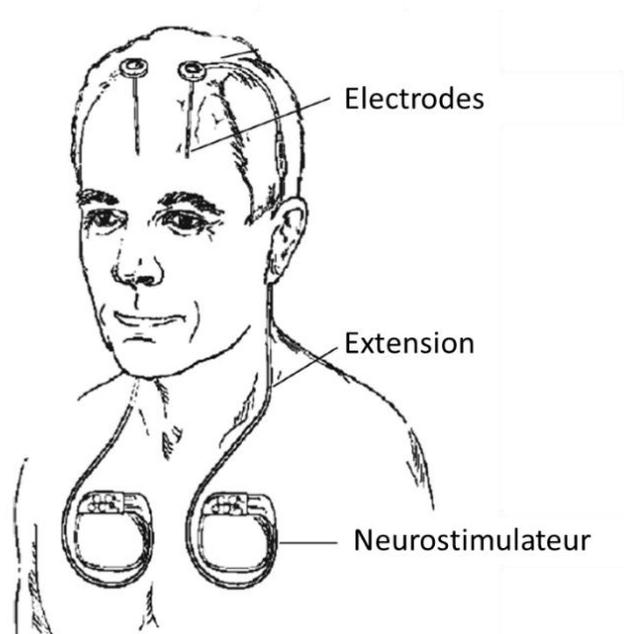


Figure 11: Représentation graphique du système utilisé pour une stimulation à haute fréquence.

Dessin réalisé par le Dr. Tagliati.

Modifiée à partir de (Olanow et al., 2009).

En plus d'une stimulation du NIVT, le GPi et le NST peuvent, également, être stimulés par haute fréquence. Ces deux structures, ayant un rôle plus important dans l'apparition des symptômes moteurs de la MP que le thalamus, ont rapidement été ciblées chez les malades (Deep-Brain Stimulation for Parkinson's Disease Study Group et al., 2001; pour revue: Odekerken et al., 2016). En effet, suite à la dérivation DA dans le striatum, la dérégulation de la voie directe et la voie indirecte des ganglions de la base engendre une suractivation du GPi et du NST. La stimulation électrique engendrée par les électrodes annule les suractivations pallidomiques (Siegfried and Lippitz, 1994) ou sous-thalamiques (Pollak et al., 1993), réduisant ainsi les symptômes moteurs (NST) et dyskinésiques (GPi) (Deep-Brain Stimulation for Parkinson's Disease Study Group et al., 2001).

Bien que ce traitement soit efficace et perdure dans le temps (5 à 7 ans), il reste souvent couplé à des agents pharmacologiques tels que la lévodopa. La SHF permet néanmoins une diminution de cette médication de 60% en moyenne. Des doses plus faibles d'administration de la L-DOPA réduisent, en outre, les risques d'apparition des dyskinésies. La réduction de ces dyskinésies peut atteindre jusqu'à 70% en période OFF et

65% en période ON, pour la SHF du NST qui est majoritairement utilisée de nos jours (pour revue: Odekerken et al., 2016).

Cependant, étant donnée la nature invasive de la SHF, des dommages cérébraux, des hémorragies, des infections et des effets secondaires notamment cognitifs et psychiatriques peuvent apparaître suite à l'opération. Cette chirurgie ne peut donc pas être réalisée sur des patients trop âgés ou avec un diagnostic incertain. Des critères de sélection stricts ont alors été mis en place réduisant l'application de cette procédure à 10 à 15% des patients seulement (pour revue: Walter and Vitek, 2004).

Bien qu'à ce jour les SHF soient généralement plus utilisées que les ablations, cette préférence est discutée dans la littérature en raison des nombreux avantages que présentent l'approche par ablation (pour revues: Hooper et al., 2008; Hariz and Hariz, 2013). Par exemple, cette dernière est moins coûteuse que les SHF, présente moins de risques d'infections, d'effets secondaires, de problèmes de matériel et ne requiert pas autant de contrôle et de soins post-opératoires. En outre, comme décrit précédemment, des dyskinésies peuvent apparaître lorsqu'il est nécessaire d'augmenter les doses d'une dopathérapie. Avec une pallidotomie, le risque de réapparition des dyskinésies est fortement réduit voire éliminé (pour revues: Gross, 2008; Hooper et al., 2008). Un autre point alimentant les discussions en faveur des ablations est la mise au point d'autres techniques de lésions ne nécessitant pas d'incision de la boîte crânienne.

c) Études expérimentales de la restauration de l'activité fonctionnelle des ganglions de la base

Les rayons ionisants gamma, aussi connus sous le nom de couteau gamma, et les ultrasons, tous deux guidés par de l'imagerie de résonance tels que l'IRM, sont deux approches lésionnelles capables de cibler une zone précise du cerveau et de la détruire. Étant non-invasives, ces techniques n'engendrent pas de complications liées à une chirurgie cérébrale (pour revues: Higuchi et al., 2017; Weintraub and Elias, 2017). Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour utiliser ces outils et réaliser des lésions dans des zones aussi profondes que le NST. En attendant l'utilisation du couteau gamma ou des ultrasons, des études cliniques sont actuellement en cours pour étudier les effets bénéfiques de la SHF dans d'autres zones du cerveau que celles

actuellement utilisées. Des centres nerveux, comme le NPP et la zone *incerta* (ZI) postérieure au NST, ont montré des améliorations motrices chez les modèles animaux de la MP (Ferraye et al., 2010; Kitagawa et al., 2005).

Une approche pharmacologique est actuellement étudiée pour diminuer l'hyperactivation des ganglions de la base. Il a été démontré que des agonistes ou des modulateurs allostériques des récepteurs métabotropiques du glutamate notamment sont capables d'inhiber l'hyperactivation du GPi (Nicoletti et al., 2011). Ces molécules réduisent alors les symptômes moteurs induits par la perte DA nigrale dans des modèles murins de la MP.

La thérapie génique peut également être utilisée. Cette technique se concentre notamment sur la diminution de l'hyperactivation sous-thalamique. En injectant le gène de l'acide glutamique décarboxylase, une enzyme retrouvée dans les neurones GABAergiques, il est possible de transformer le phénotype glutamatergique de ces neurones en phénotype GABAergique afin d'inhiber l'hyperactivation sous-thalamique (Levy et al., 2001; LeWitt et al., 2011).

3. Autres mécanismes étudiés

Étant donné la pluralité des mécanismes pathologiques, des techniques non-DA sont actuellement étudiées, tels que des antagonistes des récepteurs de l'adénosine, de l'alpha-2-adrénérique, de l'histamine, des récepteurs métabotropiques glutamatergiques mais aussi des agonistes des récepteurs nicotiques et sérotoninergiques ainsi que des inhibiteurs des cholinestérases et de la recapture noradrénérique (pour revues: Lin et al., 2017; Lotia and Jankovic, 2016). Ces cibles thérapeutiques diverses sont actuellement en cours d'analyse dans des modèles animaux et également chez l'Homme.

En conclusion, plusieurs stratégies ont été efficacement mises au point dans un but commun : la suppression des symptômes moteurs ou du moins leur réduction. En fonction des caractéristiques propres à chaque individu (âge, symptômes, sévérité de la maladie...), une adaptation du traitement est nécessaire et un, ou plusieurs, de ces traitements peuvent être utilisés. Néanmoins, malgré leur efficacité, ces approches

pharmacologiques et chirurgicales ne permettent pas de ralentir ou arrêter la progression de la MP. Leurs effets secondaires, leur temps d'action limité ou encore leur application à une faible proportion de malades pour la SHF, rend nécessaire l'amélioration des thérapies pour la MP sur le long terme. L'un des axes thérapeutiques relatifs à la dégénérescence neuronale actuellement étudié est la neuroprotection et la neurorégénération des neurones à dopamine de la SNpc subsistant chez les patients parkinsoniens.

B. Neuroprotection et neurorégénération

La neuroprotection et la neurorégénération ont pour but de ralentir, voire arrêter, la dégénérescence des cellules nerveuses dans diverses pathologies des systèmes nerveux central et périphérique. Pour d'autres maladies neurodégénératives, telle que la maladie d'Alzheimer, il a été estimé qu'un retardement de 5 ans des premiers troubles mnésiques engendrerait une diminution de 50% de la prévalence de la pathologie et qu'un délai de 10 ans la ferait potentiellement disparaître (Brookmeyer et al., 1998; DeKosky and Marek, 2003; Lang, 2010). Ainsi, une thérapie de neuroprotection/neurorégénération efficace pourrait avoir un impact social mais également économique considérable sur les maladies neurodégénératives liées à l'âge (Lang, 2010).

Dans le cadre de la MP, comme décrit précédemment, les neurones à dopamine de la SNpc meurent progressivement en induisant la majorité des symptômes moteurs retrouvés chez les patients parkinsoniens. Bien que les origines exactes de la dégénérescence neuronale soient encore inconnues, plusieurs mécanismes potentiels ont été identifiés tels qu'un stress oxydatif, un dysfonctionnement mitochondrial, des troubles protéosomiaux, lysosomiaux, de l'autophagique, de la neuroinflammation et des déficiences neurotrophiques. La pluralité de ces mécanismes et des acteurs moléculaires impliqués représente autant de cibles exploitables pour retarder l'apparition des premiers symptômes moteurs. Pour cela, des approches pharmacologique, génique et immunogénique sont actuellement utilisées. Ce chapitre s'attache à décrire, de manière non-exhaustive, les thérapies de neuroprotection et neurorégénération actuellement recherchées (Athauda and Foltynie, 2015).

1. Stress oxydatif et dysfonctionnements mitochondriaux

Lors de l'activation des neurones DA de la SNpc, une entrée massive de calcium a été décrite. Chez les patients âgés, cet apport calcique est laborieusement géré par la cellule. Le stress oxydatif mitochondrial est alors augmenté ce qui, à long terme, induit une mort cellulaire. Afin de contrecarrer cet effet délétère, l'hypothèse avancée est que l'entrée de calcium pourrait être réduite en bloquant le canal Ca_v 1.3 de type L présent à la membrane des neurones DA nigraux (Ritz et al., 2010). À ce jour, aucun antagoniste spécifique de ce canal n'existe, en revanche, des modulateurs de faible affinité comme par exemple l'isradipine, sont actuellement en essai clinique de phase III (Biglan et al., 2017). En plus de cette inhibition calcique, ce stress oxydatif peut être directement diminué en augmentant notamment les niveaux d'antioxydants tels que le N-acetylcystéine (NAC) (NCT01470027) (Katz et al., 2015), l'urate (Gong et al., 2012) ou le glutathion (NCT02424708, NCT01470027) (Hauser et al., 2009) ou en diminuant les niveaux de fer (Das et al., 2017).

2. Alpha-synucléine et dégradation

D'autres approches thérapeutiques retrouvées dans la littérature s'intéressent plus spécifiquement à l'alpha-synucléine délétère observée dans les cellules nerveuses des patients parkinsoniens. Afin de protéger les neurones restants, le but de cette thérapie est d'éliminer l'alpha-synucléine toxique (pour revue: Dehay et al., 2015). Pour cela, il est, par exemple, possible de moduler la phosphorylation (Ser129) post-traductionnelle associée à des formes pathologiques de cette protéine (Lee et al., 2011). La synthèse de l'alpha-synucléine et sa dégradation lysosomale ou protéosomale peuvent également être explorées afin de réduire sa concentration cytoplasmique et son agrégation. Cette dernière est également ciblée en thérapie par la surexpression ou l'activation des acteurs de la voie de désagrégation (Richter et al., 2014; Sardi et al., 2013; Steele et al., 2013). En parallèle, d'autres études tentent, quant à elles, d'éliminer l'alpha-synucléine délétère à l'aide d'une immunisation utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre l'alpha-synucléine (NCT02157714) (pour revue: Kalia et al., 2015).

3. Déficiences neurotrophiques

Les facteurs neurotrophiques, en conditions physiologiques, favorisent le développement et la croissance des neurones mais également leur survie. Ainsi, de par leurs propriétés, ils semblent être des acteurs indispensables à l'élaboration de thérapies neurorégénératrices pour les maladies neurodégénératives. Il a été démontré que le GDNF joue un rôle important dans la survie des neurones à dopamine du mésencéphale (Lin et al., 1993). Cependant, après deux études cliniques réalisées en double aveugle avec une approche génique par injection du GDNF dans le ventricule latéral ou le putamen de plus de 60 patients parkinsoniens, les résultats obtenus n'ont pas été ceux escomptés : aucune amélioration motrice n'a été démontrée mais de nombreux effets secondaires comme des vomissements et des dépressions ont été observés (Lang et al., 2006). Faisant partie de la famille des GDNF et possédant des caractéristiques quasiment identiques, l'intérêt thérapeutique s'est rapidement tourné vers la neurturine (Kotzbauer et al., 1996). Après deux études cliniques de phase I et II réalisées dans le putamen de patients parkinsoniens, les résultats obtenus sont mitigés (Marks et al., 2008, 2010). Pour cette raison, une autre étude clinique est actuellement en cours, injectant, cette fois-ci, la neurturine dans le putamen et la SNpc des malades (Marks et al., 2016).

Malgré de nombreuses approches prometteuses présentant des résultats positifs *in vitro* et *in vivo* chez différentes espèces animales, aucun des agents neuroprotecteurs testés à ce jour n'a montré de résultats positifs chez l'humain. L'une des raisons possibles de cet échec peut être due à une mise au point technique faite sur l'animale et non sur l'humain. En effet, le passage de l'animal à l'Homme engendre, entre autres, des problèmes de toxicité des doses de médicaments injectées ainsi que des difficultés à passer la BHE dès la phase I des essais cliniques.

Une connaissance incomplète des mécanismes anatomopathologiques de la MP, le manque de biomarqueurs spécifiques permettant de suivre la progression de la maladie et la difficulté à discriminer les effets protecteurs des effets symptomatiques des agents utilisés compliquent l'élaboration et l'analyse efficace d'une thérapie de neuroprotection. Par ailleurs, il en va de même avec le choix des patients participant aux études cliniques. En effet, l'inclusion de patients à des stades trop avancés de la maladie qui ne possèdent

alors pas ou peu de neurones DA nigraux ne présenteront donc pas d'améliorations motrices et biaiseront les résultats obtenus. Un autre paramètre qui devrait être pris en compte est la vitesse de développement de la pathologie. En effet, des différences de célérité dans l'évolution de la MP sont retrouvées chez les patients parkinsoniens ce qui complexifie alors l'analyse des traitements expérimentaux chez l'Homme.

Étant donné que les essais cliniques neuroprotecteurs sont très onéreux, leur mise en place doit être rigoureusement établie. Idéalement, ces études devraient inclure des patients récemment diagnostiqués présentant une mort faible et lente des neurones à dopamine de la SNpc. De plus, des molécules déjà connues pour passer la BHE devraient être utilisées dans ces essais cliniques afin d'être prescrites, sans risque, en association avec d'autres traitements thérapeutiques comme la lévodopa (pour revue: Stocchi and Olanow, 2013). La neuroprotection pourrait alors représenter une approche thérapeutique très prometteuse nécessitant néanmoins de nombreuses améliorations.

C. Neurorestauration

Étant donné que les traitements symptomatiques actuellement utilisés perdent de leur efficacité au cours de la progression de la MP et qu'aucun des traitements testés à ce jour pour les thérapies de neuroprotection et neurorégénération ne soit utilisé en routine, une autre stratégie thérapeutique a été proposée. Dans la mesure où aucune des thérapies décrites précédemment n'est en mesure de réparer les tissus lésés chez les malades parkinsoniens, les thérapies de remplacement cellulaire ont été proposées pour pallier à ce déficit. Le but de ces thérapies est de remplacer un tissu endommagé *in vivo* par de nouvelles cellules fonctionnelles.

Sachant que le cerveau adulte possède des capacités régénératives très limitées, l'utilisation de ce type de thérapie a très rapidement séduit la communauté scientifique. La première étape de cette approche a été de savoir s'il était possible de transplanter un tissu nerveux dans le cerveau adulte et s'il pouvait y survivre. La première tentative connue de transplantation cellulaire au niveau de l'encéphale a été réalisée en 1890 par W. Gilman Thompson (1890; pour revue: Barker et al., 2015). Ce premier essai fut toutefois infructueux à cause d'une mort neuronale importante. Il faudra attendre le

début du 20^{ème} siècle pour que Dunn mette en évidence une survie d'une allogreffe tissulaire corticale de rat (Dunn, 1917). Ces premiers succès de transplantation ont pu également mettre en évidence l'importance de l'âge des cellules greffées. Seules des cellules immatures provenant de rats âgés de 10 jours ont permis d'obtenir des transplants viables. En effet, il a été démontré par la suite qu'une incision axonale d'un neurone mature présentant une arborisation terminale est délétère pour sa survie ; à l'inverse, des cellules immatures qui ne présentent pas ou peu de croissance axonale, et encore moins d'arborisation, ont donc un risque de dégénérescence réduit. Finalement, suite à ces premiers résultats, il a alors été possible d'envisager sur un cerveau lésé une thérapie de remplacement cellulaire, aussi appelée neurorestauration.

Cette approche est particulièrement attrayante pour les maladies neurodégénératives présentant majoritairement une neurodégénérescence lente et progressive. Dans le cadre de la MP, cette thérapie de remplacement cellulaire a pour but de (i) substituer les neurones DA du sous-type SNpc dégénérés par de nouveaux neurones de même type pour (ii) rétablir le réseau neuronal de la voie nigrostriée et des ganglions de la base et ainsi (iii) ralentir, voire arrêter, les dommages occasionnés par la neurodégénérescence en augmentant la synthèse et la libération DA striatale à des concentrations physiologiques. Tout ceci permettrait à long terme de restaurer les symptômes moteurs associés. Cette thérapie a pu être étudiée et mise au point chez l'animal dans un premier temps, dès 1968 avec la découverte de substances capables de détruire spécifiquement les neurones à dopamine de la SNpc (Ungerstedt, 1968). Depuis près de cinquante ans, de nombreux chercheurs se sont attachés à mettre au point cette thérapie tout d'abord dans des modèles animaux de la MP avant de passer à une application chez l'Homme.

Le potentiel thérapeutique de deux types cellulaires différents a été testé pour la première fois sur des rongeurs dans les années 1970. Pour les citer, des cellules chromaffines de la médullosurrénale (CCMS), des cellules non-neuronales libérant toutefois des catécholamines, ainsi que des neurones fœtaux du MV donnant naissance aux futurs neurones à dopamine de la SNpc, ont été utilisés pour ces études. Étant donné les problèmes éthiques engendrés par l'utilisation de cellules fœtales malgré les résultats prometteurs, ce sont les CCMS qui furent transplantées pour la première fois

dans le cerveau de patients parkinsoniens (Date, 1996). La suite de ce chapitre s'attache à décrire l'ensemble de ces transplantations.

1. Premières transplantations pour la maladie de Parkinson :
les cellules chromaffines de la médullosurrénale

Comme expliqué précédemment, la première source de cellules utilisée pour contrecarrer la perte DA dans la MP a été les CCMS. Ces cellules ont été choisies de par leur capacité à libérer de la dopamine et des facteurs trophiques protégeant les neurones DA, leur plasticité phénotypique et leur capacité à réduire les risques de rejet puisqu'elles permettraient de réaliser des greffes autologues (Freed et al., 1981).

Les premières transplantations de CCMS ont été réalisées chez le rat par Olson and Malmfors dans une zone immuno-privilegiée : la chambre antérieure de l'œil (Olson and Malmfors, 1970). Ce greffon a été positionné adjacent à un greffon de tissu nerveux fœtal afin de montrer qu'il était possible qu'une source non-neurale de cellules catécholaminergiques survive. En plus de survivre, ces cellules ont montré qu'elles étaient également capables de migrer, acquérir la morphologie angulaire de neurones DA et de développer des neurites afin d'établir des contacts avec le tissu cérébral et de libérer de la dopamine (Olson and Malmfors, 1970). Par la suite, chez des rats ayant la SNpc lésée unilatéralement à la 6-OHDA, Freed et al. réalisent, en 1980, une greffe de ces cellules en intraventriculaire. Grâce au test de rotations à l'apomorphine, ces expériences ont permis de démontrer la capacité des CCMS à restaurer, 2 mois après la transplantation, la motricité dans un modèle animal de la MP. Cependant, ces greffons ne présentent pas d'innervation striatale à cause de l'incapacité des CCMS à libérer la dopamine par transmission synaptique mais plutôt par diffusion (Freed et al., 1981). À la suite de ces observations prometteuses, les premiers essais cliniques ont très rapidement été mis en place chez l'Homme (Backlund et al., 1985).

Ainsi, en 1985, Backlund et ses collègues transplantent des CCMS en unilatéral dans le noyau caudé (n=2) ou dans le putamen (n=2) de 4 patients parkinsoniens à un stade avancé de la maladie. Malgré des concentrations de métabolites catécholaminergiques élevées dans le liquide céphalo-rachidien (LCR), ces patients n'ont

pas présenté d'améliorations motrices majeures que ce soit un an, ou deux ans, après la transplantation (Backlund et al., 1985; Lindvall et al., 1987). En 1987, les expériences de Madrazo et al. contredisent les résultats obtenus par Backlund en montrant, quant à eux, une amélioration de l'akinésie, de la rigidité et des tremblements 3 et 10 mois après avoir transplanté des CCMS dans le noyau caudé de deux jeunes patients parkinsoniens de 35 et 39 ans (Madrazo et al., 1987). Ces résultats encouragent alors l'utilisation de ces cellules en thérapie de remplacement cellulaire et déclenchent alors une vague d'essai clinique dans le monde : plus de 350 malades sont ainsi transplantés avec des CCMS (Allen et al., 1989; Drucker-Colín et al., 1988; Jankovic et al., 1989). Malheureusement, suite à ces transplantations massives, la majorité des patients n'ont pas montré de réelles restaurations motrices sur le long terme, ni de réduction de la dopathérapie. Ces résultats peuvent potentiellement s'expliquer par une faible survie des transplants et par leur incapacité à établir une transmission synaptique DA (Goetz et al., 1989, 1991; Kompoliti et al., 2007). En parallèle, sur une étude de 56 patients, il a été démontré que ces transplantations augmentaient directement la mortalité (9%) et étaient responsables de l'apparition d'une morbidité psychiatrique chez les malades (22%) (Goetz et al., 1991).

Bien que ces cellules possèdent finalement un potentiel thérapeutique limité, elles ont néanmoins ouvert la voie aux thérapies de remplacement cellulaire dans la MP. La technique de transplantation a été conservée mais une substitution de la source de cellules a, en revanche, été effectuée. Malgré les problèmes éthiques engendrés par l'utilisation de neurones fœtaux du MV, ces derniers ont montré des résultats plus prometteurs que ceux observés avec les CCMS chez le rat. Pour cette raison, ils sont considérés comme la meilleure source de cellules à utiliser dans la MP en raison de leur capacité à donner naissance aux futurs neurones à dopamine de la SNpc.

2. Les neurones fœtaux du mésencéphale ventral

a) *Transplantation chez l'animal*

Les premières expériences utilisant les cellules DA fœtales de type MV de rats ont été réalisées, en 1979, chez le rat adulte lésé unilatéralement à la 6-OHDA (Björklund and Stenevi, 1979). Des blocs de tissu de MV fœtal ont été transplantés au niveau du ventricule latéral ou du cortex pariétal. Ces expériences ont permis de démontrer que ces cellules

pouvaient survivre, se différencier en neurones à dopamine et innervent le striatum dorsal dénervé. Des tests de rotations utilisant l'apomorphine et l'amphétamine ont mis en évidence la fonctionnalité de ces projections par l'amélioration d'une partie des déficits moteurs (Björklund and Stenevi, 1979; Björklund et al., 1980; Perlow et al., 1979).

Il a également été démontré qu'il était possible de transplanter des neurones DA fœtaux humains du MV. En effet, ces cellules transplantées, au niveau du cortex ou du ventricule adjacent au striatum de rats immunosupprimés à la cyclosporine, ont permis de démontrer leur potentiel thérapeutique avec une survie cellulaire, une différenciation en neurones DA et une réinnervation striatale présentant des contacts synaptiques aboutissant à une diminution des symptômes moteurs (Brundin et al., 1988; Clarke et al., 1988).

À la suite de ces découvertes, de nombreuses transplantations ont été réalisées avec les cellules fœtales. Elles ont permis, dans un premier temps, une meilleure compréhension des mécanismes fonctionnels sous-tendant ces transplantations et, dans un second temps, une amélioration des techniques de transplantations chez le rongeur ou le primate non-humain. Ces modifications ont permis d'optimiser cette thérapie pour une application chez l'Homme. Par exemple, de nombreuses études ont été menées sur des cellules dissociées comparées à des blocs de tissus entiers ainsi que sur l'âge des cellules greffées ou encore sur le site de transplantation.

(1) Cellules dissociées versus blocs de tissus

En 1980, Björklund et al. démontrent qu'il est préférable d'utiliser pour la transplantation des cellules dissociées enzymatiquement ou mécaniquement au lieu de blocs de tissus fœtaux de MV. En effet, des cellules en suspension permettent de réaliser des implantations à l'aide d'une seringue placée sur un appareil stéréotaxique. Cette technique de stéréotaxie est plus précise et atteint des structures plus profondes du cerveau tout en étant responsable d'une faible nécrose du tissu encéphalique. De plus, dans une greffe de cellules dissociées, la vascularisation du greffon, et par conséquent son apport en nutriment, est facilitée et accélérée. Ceci induit alors une meilleure survie du greffon mais également une restauration plus rapide des déficits moteurs. Un autre point

en faveur de cette transplantation est que celle-ci contient moins d'éléments vasculaires immunogéniques (Björklund et al., 1980; Stenevi et al., 1976; Redmond et al., 2008).

(2) Âge des cellules transplantées

L'âge des cellules à transplanter est également un paramètre important à prendre en compte lors de la thérapie de remplacement cellulaire. Plus le tissu est jeune plus sa survie et le nombre de cellules exprimant un marqueur des cellules catécholaminergiques, la TH, est important. En effet, les docteurs Stenevi, Björklund and Svendgaard ont montré en 1976 qu'une meilleure survie du greffon est obtenue en utilisant des précurseurs foetaux DA comparée à du tissu DA adulte (Stenevi et al., 1976). Chez les rats, Björklund et ses collègues mettent en évidence que l'âge optimal des cellules à transplanter équivaut au stade embryonnaire de 14-15 jours (E14-E15) (soit E12.5 chez la souris) c'est-à-dire avant leur dernière division cellulaire et leur développement axonal (Björklund et al., 1980). Des études, comme celles réalisées par Torres et ses collaborateurs, affinent ce résultat en démontrant que l'utilisation des cellules de rat à un stade encore plus jeune, E12.5, augmente davantage les chances de survie du greffon et du nombre de neurones DA du sous-type A9 et diminue la proportion de neurones sérotoninergiques (5-HT) après transplantation chez le rat (Bye et al., 2012; Fjodorova et al., 2017; Torres et al., 2007, 2008a). Toutefois, les greffons âgés de E12 sont équivalents à ceux de E14 en terme de capacité à restaurer les déficits moteurs (Torres et al., 2008b). Concernant l'âge optimal des cellules humaines foetales à utiliser pour la thérapie de remplacement de cellules, il est compris entre 6 et 9 semaines post-conception (Freeman et al., 1995). Ainsi, plus les cellules utilisées pour la transplantation sont précoces dans la différenciation DA, plus la proportion de neurones DA sera importante *in vivo*.

(3) Site de transplantation : striatum versus SN

Sachant que les neurones qui dégènèrent dans la MP sont localisés au niveau de la SN, il serait logique de transplanter les nouveaux neurones à cet endroit. Cependant, Björklund et al. ont démontré, en 1983, qu'un transplant striatal avait plus de chance de survivre et d'innover la région cible, le striatum, au vu de l'incapacité à restaurer la voie nigrostriée dégénérée (Björklund et al., 1983). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer cette incapacité comme une distance trop importante entre la SNpc et le

striatum pour que les cellules transplantées dans la SN puissent envoyer leurs projections axonales vers le striatum et une réponse inflammatoire mise en place lors des processus neurodégénératifs. Cependant, bien que les transplantations striatales augmentent les niveaux de dopamine et améliorent la motricité, les cellules transplantées à cet endroit ne rétablissent pas la voie nigrostriée ni le réseau des ganglions de la base dans son intégralité comme le ferait une transplantation au sein de la substance noire. De plus, elles ne reçoivent pas les facteurs trophiques appropriés ni les connexions afférentes propres à leur site d'origine, ce qui est source de débat concernant le striatum comme le meilleur site de transplantation pour une thérapie cellulaire de la MP. En outre, des travaux réalisés au sein de notre laboratoire et par celui de Thompson démontrent la possibilité de restaurer la voie nigrostriée en transplantant des neurones DA fœtaux du MV au niveau de la SN lésée chez la souris (Gaillard et al., 2009a; Thompson et al., 2009). Wictorin et al., l'ont également montré chez le rat et Wakeman et al., chez le primate non-humain (Wakeman et al., 2014; Wictorin et al., 1992).

(4) Survie cellulaire des neurones DA A9 et leurs projections

Après transplantation, le pourcentage de survie des cellules DA restantes est faible, de l'ordre de 0.1 à 1% pour toutes les cellules transplantées (pour revue: Brundin and Björklund, 1987). Il est par ailleurs estimé que le nombre de neurones DA dans le transplant est corrélé à la restauration motrice et qu'il faut entre 100 et 1000 cellules DA chez le rongeur pour obtenir un potentiel thérapeutique (Björklund and Isacson, 2002; Brundin et al., 1985).

Cependant, il n'est pas suffisant que les neurones possèdent un phénotype DA. En effet, afin de restaurer la voie nigrostriée et la motricité, il est nécessaire que les neurones DA greffés soient du sous-type SNpc en exprimant la TH et le canal potassique rectifiant entrant GIRK2 en grande quantité par exemple et soient capables de réinnervier le putamen et le noyau caudé (Grealish et al., 2010; Mendez et al., 2005). Retrouvés à la périphérie des transplants entourant des neurones DA de type A10 (Bye et al., 2012; Thompson et al., 2005a), ces cellules TH⁺ GIRK2⁺ doivent, en outre, posséder une activité électrophysiologique active comparable aux neurones DA de type A9 *in vivo* qui peut être

modulée par une application locale d'agonistes ou antagonistes DA. Ces nouveaux neurones doivent également pouvoir sécréter de la dopamine à des niveaux physiologiques que ce soit au niveau des synapses ou à une autre localisation afin de rétablir la motricité (Strecker et al., 1987; Wuerthele et al., 1981). La fonctionnalité de ces cellules a été prouvée grâce à la L-DOPA avec une meilleure réponse à la lévodopa chez les animaux après avoir été transplantée. Il a également été montré que ces cellules sont capables de recevoir des afférences d'autres structures cérébrales tels que le cortex afin d'avoir une intégration complète (Clarke et al., 1988; Mahalik et al., 1985). Toutes ces données montrent alors qu'il est possible de transplanter des précurseurs des neurones DA de type A9 qui, après maturation, peuvent s'intégrer et être fonctionnels, ce qui conforte ainsi l'utilisation d'une thérapie de remplacement cellulaire.

Cependant, le tissu de neurones DA fœtaux du MV transplantés est composé de plusieurs populations et sous populations neuronales tels que les neurones DA de type A8, A9, A10, GABAergiques et 5-HT. Il est à noter que Strecker et ses collègues démontrent qu'après une analyse par HPLC, les niveaux des métabolites 5-HT sont augmentés par rapport à la valeur physiologique dans le cerveau des rats transplantés en intra-striatal (Strecker et al., 1987). Ces résultats sont expliqués par une hyperinnervation striatale par les neurones 5-HT greffés conjointement avec les neurones DA issues de VM fœtaux (Takeuchi et al., 1991; Wright et al., 1991). Cette hyperinnervation 5-HT est, de plus, responsable de l'apparition de DIL chez des rats parkinsoniens (Carta et al., 2007).

(5) Compétences motrices

La restauration motrice peut être évaluée à l'aide de tests comportementaux plus ou moins fins et spontanés chez les rongeurs (pour revues: Brooks and Dunnett, 2009; Dunnett and Lelos, 2010). Comme décrit au chapitre précédent des tests de rotations induites par apomorphine ou amphétamines ont permis de démontrer une réduction des déficits moteurs de modèles animaux de la MP dans de nombreuses études (Gaillard et al., 2009a; Grealish et al., 2010; Kirik et al., 2001; Nikkhah et al., 1994; Rumpel et al., 2015; Thompson et al., 2009; Torres et al., 2008b). Des tests de motricité tels que le test du cylindre, de la démarche dans un couloir, de la poutre modifiée ont également mis en évidence une restauration motrice des animaux (Cordeiro et al., 2010; Grealish et al.,

2010; Rumpel et al., 2015; Torres et al., 2008b). En revanche, pour des tests de motricité analysant les compétences motrices fines, comme le test d'appréhension des membres antérieurs mesuré avec le test de l'escalier par exemple, les résultats sont contrastés. Certaines études montrent des restaurations partielles (Cordeiro et al., 2010; Nikkhah et al., 1995) voire pas de restauration (Olsson et al., 1995; Torres et al., 2008b). Au laboratoire, dans un modèle murin de la MP lésé à la 6-OHDA et transplanté avec des neurones DA fœtaux du VM, à E12.5, une restauration des compétences motrices fines a été mise en évidence 6 semaines après une transplantation intra-nigrale et non intra-striatale (Droguerre et al.). Ces variabilités de restauration motrice viendraient d'une difficulté plus grande à établir un large degré de reconnexion avec le striatum dorsal. Ainsi une reconstruction importante est nécessaire pour rétablir les compétences motrices fines (Dunnett et al., 1981a, 1981b).

Ainsi, malgré un faible taux de survie, les cellules transplantées en intra-striatal et intra-nigral sont capables de se différencier en neurones DA de type A9, nécessaires à la restauration des niveaux de dopamine physiologiques. La thérapie de remplacement cellulaire ainsi validée dans des modèles animaux de la MP avec la transplantation de neurones DA fœtaux du MV provenant d'animaux ou d'humains a très rapidement abouti à une application chez l'Homme (Brundin et al., 1988).

b) Transplantation chez l'humain

Les premières transplantations de cellules DA fœtales humaines issues du MV ont été réalisées en Suède et au Mexique en 1988. L'étude suédoise, publiée par Lindvall et ses collègues, est une étude ouverte sans contrôle. Des fœtus humains avortés de 8 à 10 semaines de gestation ont été transplantés unilatéralement dans le putamen de deux patientes parkinsoniennes de 48 et 55 ans. Ces deux patientes ont présenté des améliorations motrices significatives sur le long terme ainsi qu'une meilleure réponse à la lévodopa. Une analyse de la ¹⁸fluorodopa (¹⁸F-dopa) observée par TEP a permis de mettre en évidence une augmentation de 130% de la recapture DA au niveau du putamen traduisant ainsi un accroissement du nombre de terminaisons DA striatales fonctionnelles 6 mois après l'opération (Lindvall et al., 1988). L'étude mexicaine, quant à elle, a permis la transplantation d'un patient dans le noyau caudé en utilisant des cellules fœtales âgées

de 13 semaines de gestation. Suite à cette opération, les symptômes moteurs du patient se sont améliorés (Madrazo et al., 1988). Avec ces premiers résultats positifs obtenus chez l'Homme, un large panel d'études ouvertes s'est développé à travers le monde (Barker and Dunnett, 1999; Brundin et al., 2000; Freed et al., 1992; Kordower et al., 1995, 1998, Mendez et al., 2000, 2005; Peschanski et al., 1994; Piccini et al., 1999). Ces études cliniques ont permis de démontrer que des transplants intra-striataux de neurones DA fœtaux du MV peuvent survivre, s'intégrer et induire significativement des effets bénéfiques moteurs sur le long terme chez les patients parkinsoniens, malgré de grandes variabilités inter-patient (Barker et al., 2013; Dunnett et al., 2001; Kefalopoulou et al., 2014; Lindvall and Hagell, 2000; Winkler et al., 2005).

Cependant, afin de s'affranchir d'un possible effet placebo, deux études en double aveugle avec des contrôles ont par la suite été réalisées. L'une a été effectuée par Freed et al., en 2001, sur des patients présentant une forme sévère de la MP, tandis que l'autre a été réalisée par Olanow et ses collègues en 2003 sur des patients parkinsoniens avec une forme précoce. Globalement, ces études n'ont pas apporté les résultats escomptés. Que ce soit pour les études de Freed ou Olanow, les améliorations motrices ont été faibles et non significatives. Les meilleures récupérations motrices ont été obtenues par de jeunes patients (30 à 35% d'améliorations) (Freed et al., 2001; Olanow et al., 2003). Ces résultats sont cohérents avec la survie des neurones DA dans les transplants des patients parkinsoniens. Après analyses immunohistochimiques en *post-mortem*, il s'est avéré qu'entre 7 000 et 40 000 cellules TH positives ont survécu par côté transplanté. Ce nombre de neurones supposés DA est 2 fois moins important que l'étude ouverte publiée par Kordower et ses collègues en 1995 (Kordower et al., 1995). De plus, à l'instar des transplantations réalisées chez le rongeur, des neurones DA de type A9 et A10 sont présents dans les transplants des patients et les cellules TH⁺ GIRK2⁺ sont préférentiellement retrouvées en plus grandes proportions à la périphérie du transplant (Mendez et al., 2005). Cette même étude démontre également que la proportion de neurones DA de la SNpc est plus importante lorsque les cellules sont transplantées dans le putamen comparée aux transplantations au sein de la SN. Comme décrit précédemment et appuyant la théorie de la propagation comme les maladies à prions, après analyses *post-mortem* des patients parkinsoniens transplantés, des études, dont

celles menées par Kordower et Li en 2008 ont démontré la présence de CL constitués d'alpha-synucléine et d'ubiquitine visibles dans 8 à 10% des cellules transplantées (Cisbani et al., 2017; Kordower et al., 2008; Li et al., 2008). Malgré leur présence, ces CL ne semblent pas altérer le bon fonctionnement des neurones DA.

De plus, dans les études en double aveugle, de nombreux patients ont développé des dyskinésies induites par le greffon (DIG) au bout de 6 mois, nécessitant quelquefois une intervention chirurgicale telle que la SHF. Comme pour les expériences réalisées chez l'animal, ces dyskinésies peuvent apparaître à cause de la combinaison d'un relargage incontrôlé de dopamine au sein du striatum par les neurones 5-HT par exemple et une hypersensibilité DA des neurones striataux (Barker and Kuan, 2010; Winkler et al., 2005).

Les résultats décevants obtenus avec les essais cliniques en double aveugle et ceux, inconstants des études ouvertes, mettent en relief de nombreux facteurs influençant l'incidence des transplantations (Gaillard and Jaber, 2011). Par exemple, l'une des causes possibles d'échec des greffes à induire un rétablissement moteur peut être due à un manque ou une trop faible dose des traitements d'immunosuppresseurs. Par exemple, pour l'étude d'Olanow, les patients ont reçu un traitement à faible dose d'immunosuppresseur pendant 6 mois et ont présenté une restauration motrice progressive. Toutefois, passée cette période, les patients ont graduellement perdu les progrès moteurs obtenus jusqu'à revenir à leurs capacités motrices pré-transplantation dès le dix-huitième mois des essais cliniques. Ainsi, il est supposé que la présence du greffon induit, sur le long terme, une réponse inflammatoire qui doit être régulée par des traitements immunosuppresseurs.

Plusieurs inconstances dans la conception des protocoles de transplantation participent également à la faible efficacité des greffes chez les patients parkinsoniens. Il est, en effet, nécessaire de standardiser au mieux la préparation et la qualité des cellules à transplanter. L'âge, le nombre, la composition, la dissociation, la conservation et le site de transplantation de ces neurones DA fœtaux du MV sont autant de paramètres à ajuster afin de mettre en place des thérapies efficaces et reproductibles présentant un minimum d'effets secondaires. Par exemple, la plupart des transplantations réalisées sur l'Homme ont été effectuées au niveau du putamen. Néanmoins, seule une innervation intégrale du

noyau caudé et du putamen est en mesure de rétablir efficacement les symptômes moteurs.

Finalement, le choix des patients sélectionnés pour les essais cliniques est également un paramètre à prendre en compte. En effet, l'efficacité de la thérapie dépend de la sévérité de leur pathologie, ainsi que de leur réponse à la lévodopa.

Ces facteurs sont tout autant de possibilités d'améliorations du protocole de transplantation possibles afin d'augmenter l'efficacité des thérapies de remplacement cellulaire. Fort de ces analyses et modifications, une nouvelle étude clinique est actuellement en cours. Mise au point en 2014, cette étude, appelée TRANSEURO, dont le premier patient a été transplanté début 2015, est une étude menée sur 3 ans.

Malgré de nombreuses perspectives prometteuses, l'utilisation des cellules fœtales et le manque de reproductibilité et de contrôle de ces préparations cellulaires pour une transplantation reste un problème. À grande échelle, il est donc difficile d'utiliser les neurones DA fœtaux du MV comme source de cellules. Une autre source de cellules est donc nécessaire afin de contourner les problèmes cités précédemment.

III. Chapitre III : Sources cellulaires alternatives pour la thérapie de remplacement cellulaire de la maladie de Parkinson

De nombreux chercheurs se sont intéressés aux cellules souches en tant que source de cellules alternatives de la neurorestauration pour la MP. Celles-ci permettraient, en théorie, d'obtenir un nombre illimité de cellules pouvant être différenciées spécifiquement en neurones à dopamine de la SNpc. En effet, de par leurs propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation, les cellules souches indifférenciées peuvent se reproduire à l'identique par division cellulaire afin de proliférer (division symétrique : une cellule mère donne naissance à deux cellules filles identiques). De plus, en réponse à des stimuli, ces cellules peuvent également se spécialiser, par différenciation, pour produire tous les types cellulaires d'un organisme entier (division asymétrique : une cellule mère donne naissance à deux cellules filles, l'une qui lui est identique et l'autre qui se différencie).

Dans le cadre de la MP et de la restauration de la motricité, le but de cette stratégie thérapeutique est d'obtenir *in vivo* des neurones à dopamine du sous-type nigral présentant les mêmes caractéristiques morphologiques, génétiques, épigénétiques, moléculaires et électrophysiologiques que les neurones A9 endogènes, suite à la transplantation de cellules précurseurs issues de cellules souches. Cependant, la transplantation de cellules indifférenciées au niveau de l'encéphale, ou dans toutes autres localisations au sein de l'organisme, peut engendrer une survie et une prolifération cellulaire pouvant être à l'origine de tératomes (Bjorklund et al., 2002). Ainsi, afin de contrecarrer tout risque de formation tumoral, il est nécessaire d'engager les cellules dans une voie de différenciation appropriée avant toute transplantation (Baier et al., 2004; Brederlau et al., 2006). Pour provoquer la différenciation des cellules, de manière reproductible et efficace *in vitro*, les protocoles mis en place, à ce jour, s'inspirent des

mécanismes moléculaires impliqués lors du développement embryonnaire des neurones DA de type A9. Les acteurs clés impliqués dans le développement embryonnaire des neurones DA de la SNpc pouvant être utiles lors de la modélisation phénotypique *in vitro* sont décrits dans le paragraphe suivant (Andersson et al., 2006a). Par la suite, les différents types de protocoles utilisés *in vitro*, pour différencier des cellules multi- et pluripotentes en neurones DA, sont présentés ainsi que les résultats obtenus après leur transplantation au sein du cerveau de différents modèles animaux de la MP.

A. Développement embryonnaire des neurones DA de la SNpc

Lors du développement embryonnaire du système nerveux central, une régionalisation spécifique se met en place le long du tube neural suite à l'expression précise d'un ensemble de gènes. Ainsi, le tube se divise dans un sens antéro-postérieur en télencéphale, en mésencéphale, en rhombencéphale et en moelle épinière. Quant à l'axe ventro-dorsal, il se partage en plaque du plancher, en lame basale, en lame alaire et en plaque du toit. C'est à partir des cellules de la plaque du plancher localisées au niveau du mésencéphale que les neurones DA nigraux matures sont générés (pour revue: Arenas et al., 2015).

L'expression combinée de facteurs sécrétés et de facteurs de transcription induit, dans un premier temps, la formation de la plaque du plancher au niveau du MV. Les cellules souches neurales de cette zone se spécifient ensuite afin de produire des progéniteurs neuronaux DA. Ces derniers vont par la suite proliférer et se différencier en neurones immatures puis matures, constituant *in fine* les neurones DA de la SNpc, l'ATV et NRR. Des études de gain et de perte de fonction ont permis de déterminer l'identité et le rôle de plusieurs de ces facteurs. Les différents acteurs moléculaires clés impliqués dans chaque étape de la neurogénèse DA de la SNpc chez la souris sont décrits ci-après (Fig. 12).

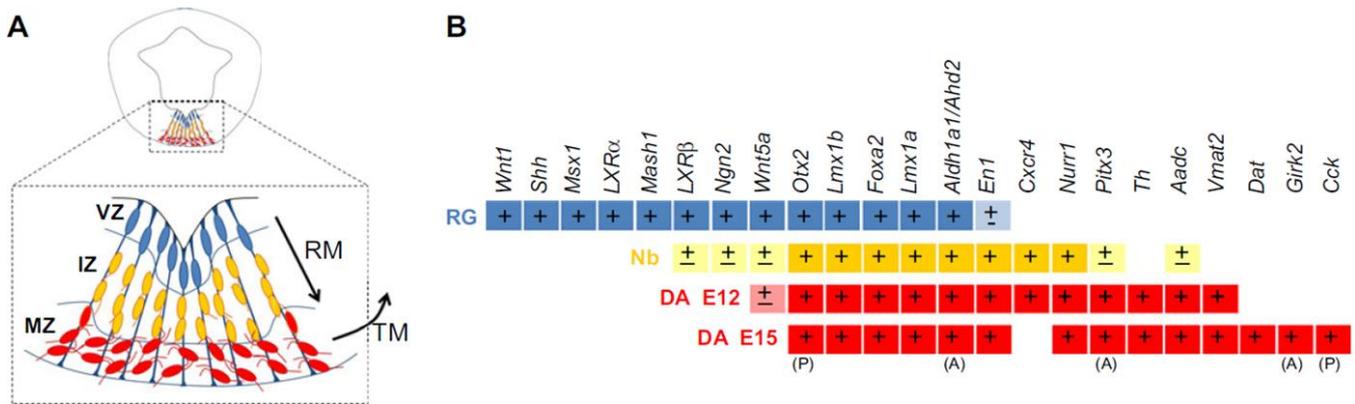


Figure 12: Illustration de l'expression de gènes contrôlant le développement des neurones dopaminergiques du mésencéphale ventral chez la souris.

A) Représentation graphique d'une section de la partie mésencéphalique du tube neural chez la souris à E11.5 avec un grossissement de la plaque du plancher (A). Les progéniteurs DA mésencéphaliques contenus dans la zone ventriculaire (VZ) migrent radialement vers la zone intermédiaire (IZ) à l'aide des cellules de la glie radiaire (RG, en bleu) et deviennent des neuroblastes post-mitotiques (Nb, en jaune) puis vers la zone marginale (MZ) où ils débutent leur différenciation en neurones dopaminergiques (DA) matures (en rouge). Lors de leur maturation les cellules migrent tangentielle pour former la substance noire parse compacte. **B)** Principaux morphogènes et facteurs de transcription participant au développement des neurones à dopamine du mésencéphale ventral chez la souris et exprimés par les cellules de la glie radiaire, les neuroblastes et les neurones dopaminergiques. RM : migration radiale ; TM : migration tangentielle ; ± : faible niveau d'expression ; + : exprimé ; A : principalement du mésencéphale antérieur ; P : principalement du mésencéphale postérieur.

Modifiée à partir de Arenas et al., 2015.

1. Induction du mésencéphale ventral

La régionalisation du tube neural en plaque du plancher, au niveau du mésencéphale, est la première étape du développement des neurones DA nigraux (pour revue: Blaess and Ang, 2015). Celle-ci débute au 8^{ème} jour du développement embryonnaire chez la souris. L'expression de plusieurs facteurs de transcription, tels que Otx2, Pax2/5, Engrailed-1/2 (Bally-Cuif and Wassef, 1995; Joyner, 1996; Puellas et al., 2004), ainsi que des facteurs sécrétés, tels que le facteur de croissance de fibroblaste-8 (aussi connu sous le nom de FGF-8), WNT1 et sonic hedgehog (SHH), participent collectivement et de manière précise à la localisation et la taille du MV le long du tube neural (Fig. 12) (Chung et al., 2009; Hynes et al., 1995; Ye et al., 1998). Par exemple, il a été montré que les deux facteurs de sécrétion FGF-8 et SHH interagissent mutuellement et participent, de manière dose-dépendante, au développement des neurones du MV (Ye et al., 1998). Ces morphogènes sont communément utilisés *in vitro* dans les protocoles de

différenciation. SHH est notamment capable d'activer FoxA1/2, nécessaire à l'induction de la plaque du plancher et au maintien de l'expression de SHH dans les cellules de la plaque du plancher (Kittappa et al., 2007).

Une fois la régionalisation des cellules du MV terminée, les cellules de la plaque du plancher, exprimant le marqueur CORIN et Glast/Scl1a (Ono et al., 2007), se spécifient par la suite en progéniteurs DA mésencéphaliques et prolifèrent.

2. Spécification et prolifération des progéniteurs DA du mésencéphale ventral

La spécification des cellules souches neurales mésencéphaliques est initiée au niveau de la zone ventriculaire du tube neural dès le 9^{ème} jour embryonnaire et permet le développement de progéniteurs DA capables de proliférer et se différencier. L'expression des facteurs sécrétés et des facteurs de transcription, cités au paragraphe précédent, est conservée au sein de ces progéniteurs lors de cette étape du développement (Fig. 12). D'autres facteurs sont également exprimés et prennent part à la détermination phénotypique des cellules tels que les facteurs de transcription LMX1A et LMX1B (Deng et al., 2011). Spécifique de l'émergence des progéniteurs DA du MV, LMX1A est induit par SHH et est localisé dans les cellules CORIN⁺. La surexpression de LMX1A est capable d'induire la formation de neurones à dopamine mésencéphalique alors que son inhibition réduit la proportion des neurones post-mitotiques (Andersson et al., 2006a; Deng et al., 2011). Ceci confirme alors le rôle crucial de LMX1A dans la spécification et la survie des neurones DA mésencéphaliques lors du développement. En aval de LMX1A, l'activation de Msx1 induit l'expression d'une protéine pro-neurale essentielle au développement et à la différenciation des neurones DA de type A9 : la neurogénine 2 (Ngn2). Ce facteur permet également l'inhibition de Nkx6.1, un acteur de la neurogénèse et de la différenciation en motoneurone (Andersson et al., 2006b). Pour finir, LMX1B participe également à cette étape du développement embryonnaire via l'inhibition de l'apparition du phénotype des neurones oculomoteurs et du noyau rouge et via la formation d'une boucle auto-régulatrice avec LMX1A (Chung et al., 2009; Deng et al., 2011).

Suite à leur spécification, les progéniteurs du MV se différencient jusqu'à atteindre un stade mature de neurones à DA de la SNpc, ATV et NRR tout en migrant jusqu'à leur position finale.

3. Différentiation, maturation, migration et intégration des neurones DA de la SNpc

La différenciation des progéniteurs DA mésencéphaliques commencent dès E10.5, lorsque les cellules deviennent post-mitotiques et expriment le récepteur nucléaire Nurr1 aussi appelé Nr4a2 (Law et al., 1992; pour revue: Wallén and Perlmann, 2003). Ce dernier induit alors l'expression d'autres facteurs de maturation et de maintenance des neurones DA du MV tel que Pitx3. Dans les neurones DA de type A9, Pitx3 est produite par les cellules avant la TH contrairement aux neurones à dopamine de l'ATV exprimant Pitx3 en aval de la TH. Pitx3 active également *aldha1* responsable de la production d'acide rétinolique impliqué dans la survie neuronale (Smidt et al., 1997). En plus de Pitx3, Nurr1 induit l'expression de protéines jouant un rôle dans la synthèse, le stockage et le transport de la dopamine tels que la TH, DAT, VMAT-2 (Iwawaki et al., 2000; Sacchetti et al., 2001).

Dès que les progéniteurs DA du MV quittent le cycle cellulaire, ces derniers commencent à migrer ventralement de la zone ventriculaire du tube neural vers la surface pial du mésencéphale (Shults et al., 1990). Ces cellules migrent le long de la glie radiaire de la plaque du plancher pour atteindre la zone marginale (Hanaway et al., 1971). C'est dans cette zone que les progéniteurs se différencient afin de constituer, *in fine*, les neurones DA de type A8, A9 et A10 du MV. En plus de la migration radiale, les neurones de type A9 migrent également tangentiellement vers les parties latérales du MV, ce qui n'est pas le cas des neurones A10 (Hanaway et al., 1971). Ces neurones DA matures expriment alors des facteurs cellulaires spécifiques à chaque population DA. Par exemple, les neurones de la SNpc expriment GIRK2 (Schein et al., 1998) et un DAT glycosylé contrairement à la grande majorité des neurones DA de l'ATV qui expriment, eux, la Calbindine 1 (Liang et al., 1996). Toutefois, une petite population mésencéphalique exprime à la fois GIRK2 et Calbindine 1 (Reyes et al., 2012). Au final, ces différences moléculaires participeraient, entre autre, à la vulnérabilité des neurones DA de type A9

dans la MP comparées à celles, dans une moindre mesure, des neurones DA de l'ATV (pour revues: Vogt Weisenhorn et al., 2016; Andereg et al., 2015).

En conclusion, chaque étape du développement embryonnaire est caractérisée par l'expression de marqueurs cellulaires spécifiques jouant un rôle clé qui varie dans le temps et l'espace. En vue de générer des neurones DA nigraux *in vitro* à partir de cellules souches, l'ensemble de ces facteurs sont d'autant d'outils disponibles pour l'élaboration de protocoles de différenciation.

B. Génération de neurones DA dérivés de cellules souches

Ayant à disposition des cellules pouvant se différencier en un type cellulaire précis et des molécules clés du développement embryonnaire, il est nécessaire de savoir s'il est possible de générer, à partir de ces cellules, un nombre suffisant de neurones DA nigraux, identiques aux neurones DA de type A9 endogènes. Ces cellules différenciées doivent également pouvoir survivre et s'intégrer *in vivo* afin de restaurer efficacement les niveaux physiologiques de dopamine dans le striatum dorsal dans le but de réduire les déficits moteurs, sans présenter de risque de formation tumorale ou de rejet immunitaire.

Les types de cellules souches pouvant être utilisées dans le cadre d'une thérapie cellulaire sont multiples et variées. Les cellules souches se distinguent en fonction de leur potentiel de différenciation en quatre catégories : les cellules souches totipotentes, pluripotentes, multipotentes et unipotentes. Ce sont les cellules souches pluripotentes (CSP) et multipotentes qui sont les plus étudiés pour le remplacement cellulaire dans la MP. Facilement manipulables *in vitro*, les CSP peuvent proliférer et donner naissance à tous les types cellulaires d'un organisme, alors que les cellules multipotentes ont un potentiel plus restreint et se différencient en un seul type cellulaire souvent défini par l'organe à partir duquel elles sont dérivées (Arenas, 2002). Par exemple, pour les cellules nerveuses, les cellules souches neurales multipotentes sont capables de se différencier uniquement en neurones, en oligodendrocytes et en astrocytes (Gage, 2000; McKay, 1997). La suite de mon manuscrit vise à décrire les différentes proportions de cellules souches différenciées en neurones DA de la SNpc ainsi que l'intégration de ces cellules *in*

vivo et leur impact sur le comportement moteur, suite à leurs transplantations dans le cerveau de différentes espèces animales.

1. Cellules souches multipotentes

Il existe chez l'être humain de nombreuses sources de cellules multipotentes et deux principaux types sont utilisés dans le cadre de la MP : les cellules souches neurales (CSN) (Altman and Das, 1965) et les cellules souches mésenchymateuses (CSM) (Politis and Lindvall, 2012).

a) Cellules souches neurales

Comme cité précédemment, les CSN peuvent générer des neurones, des oligodendrocytes et des astrocytes du système nerveux central (Reynolds and Weiss, 1992; revue: Ma et al., 2009). D'origine multiple, ces cellules peuvent provenir du mésencéphale ventral d'embryons avortés, de niches cellulaires neurales comme la zone sous-ventriculaire (aussi connu sous le nom de SVZ) de sujets adultes vivants (Li and Xie, 2005; Lin and Iacovitti, 2015) mais également morts (Marfia et al., 2011) ou encore lors de la différenciation de CSP *in vitro* (Gage, 2000; Joannides et al., 2007; Reubinoff et al., 2001). Les cellules, une fois récupérées, peuvent être cultivées et différenciées *in vitro* (Fig. 13).

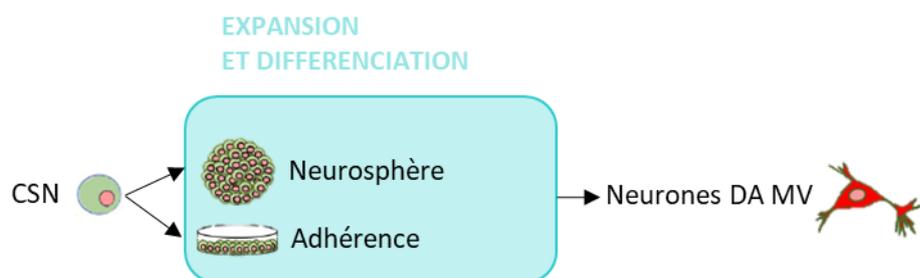


Figure 13: Protocoles de différenciation des cellules souches neurales (CSN) en neurones dopaminergiques du mésencéphale ventral (DA du MV).

Après avoir isolé des CSN (en vert) d'un tissu, celles-ci peuvent proliférer en suspension en formant des neurosphères, aussi appelées rosettes neurales, ou bien par adhérence. Le retrait des facteurs d'induction neurale présents dans le milieu de culture permet la différenciation des CSE en cellules DA et plus précisément en neurones DA MV (en rouge).

Modifié à partir de (Arenas et al., 2015).

Les méthodes de différenciation des CSN utilisent des facteurs de croissances et des morphogènes sur des cellules en suspension ou adhérentes en mono-couche (Caldwell, 2001). Pour la méthode en suspension, les CSN peuvent proliférer dans des boîtes de culture de faibles adhérences afin de former des agrégats cellulaires en 3D appelés neurosphères ou rosettes neurales (Elkabetz et al., 2008). Lors de cette étape, le milieu utilisé contient notamment un composant spécifique des cultures de neurones, le N2, mais également des facteurs de croissance qui ont une action mitogénique et qui favorisent ainsi la prolifération cellulaire, comme par exemple le facteur de croissance de fibroblastes-2 ou basique (aussi connu sous le nom de FGF-2 et FGF basique), le facteur neurotrophique issu du cerveau (aussi connu sous le nom de BDNF), ou encore le facteur trophique dérivé de la glie (aussi connu sous le nom de GDNF) (Gensburger et al., 1987). La spécification cellulaire est, quant à elle, initiée par l'ajout de morphogènes spécifiques des neurones DA du mésencéphale ventral comme SHH, FGF-8 et, pour les cellules humaines, l'acide rétinoïque (Papanikolaou et al., 2008). Pour induire la différenciation, les facteurs de croissance et les morphogènes sont ensuite retirés du milieu de culture. Les agrégats cellulaires sontensemencés dans des boites de cultures recouvertes de molécules d'adhérence comme la poly-L-lysine ou encore la poly-ornithine et la fibronectine. Des milieux de cultures et des molécules d'adhérence identiques sont utilisés pour le protocole de différenciation des CSN adhérentes en mono-couche (Caldwell, 2001). Il est également possible de cultiver ces cellules dans les mêmes conditions mais en co-culture avec des astrocytes par exemple (Wagner et al., 1999).

(1) Cellules souches neurales embryonnaires

La différenciation des progéniteurs DA mésencéphaliques commencent dès E10.5, lorsque les cellules deviennent post-mitotiques et expriment le récepteur nucléaire Nurr1 aussi appelé Nr4a2 (Law et al., 1992; pour revue: Wallén and Perlmann, 2003). Ce dernier induit alors l'expression d'autres facteurs de maturation et de maintenance des neurones DA du MV tel que Pitx3. Dans les neurones DA de type A9, Pitx3 est produite par les cellules avant la TH contrairement aux neurones à dopamine de l'ATV exprimant Pitx3 en aval de la TH. Pitx3 active également *aldha1* responsable de la production d'acide rétinoïque impliqué dans la survie neuronale (Smidt et al., 1997). En plus de Pitx3, Nurr1

induit l'expression de protéines jouant un rôle dans la synthèse, le stockage et le transport de la dopamine tels que la TH, DAT, VMAT-2 (Iwawaki et al., 2000; Sacchetti et al., 2001).

Comme décrit dans le chapitre précédent, des CSN issues du MV de fœtus humains ont déjà été transplantées chez des patients parkinsoniens et ont démontré leur efficacité. Cependant, au vu du nombre élevé de fœtus utilisé par patient et des problèmes éthiques engendrés par leur utilisation, de nombreux chercheurs ont tenté d'augmenter la proportion de CSN embryonnaires en faisant proliférer les CSN avant la transplantation. À partir des protocoles décrits ci-dessus, il a été montré qu'il était possible d'augmenter la proportion des cellules DA exprimant la TH en obtenant entre 20 à 25% voire 55% des cellules TH à partir des CSN du mésencéphale embryonnaire de rat (Studer et al., 1998) et d'humain (Sánchez-Pernaute et al., 2001; Wang et al., 2004). Une fois transplantées dans le striatum de rats lésés à la 6-OHDA, le test de rotations à l'amphétamine démontre une réduction des troubles moteurs en moyenne de 75% et 35% avec les cellules de rongeur et humaines respectivement (Carvey et al., 2001; Sánchez-Pernaute et al., 2001; Studer et al., 1998). De plus, les cellules différenciées *in vivo* survivent et induisent en moyenne 1200 cellules TH⁺ par transplant pour les cellules de rats et 950 pour les cellules humaines.

Comme décrit auparavant, il est possible d'avoir recours à la technique de modulation génique pour modifier spécifiquement l'expression de protéines cellulaires (Conley et al., 2004; Lin et al., 2017). Afin d'augmenter le nombre de neurones à dopamine de la SNpc générés *in vitro* à partir des CSN, un ou plusieurs facteurs intervenants à différents temps du développement embryonnaire ont été utilisés (Kim et al., 2007; Park et al., 2006; Roybon et al., 2008; Wagner et al., 1999). Certaines de ces études démontrent, notamment, une augmentation du nombre de cellules TH⁺ (Kim et al., 2007; Park et al., 2006; Wagner et al., 1999). Ces résultats s'opposent à ceux obtenus par Roybon et al. ainsi que ceux de Jensen et al. qui suggèrent que le potentiel de différenciation de ces cellules est trop avancé pour être modulé de manière efficace (Jensen et al., 2011; Roybon et al., 2008).

Suite aux problèmes éthiques suscités par l'utilisation des CSN embryonnaires, de nombreux chercheurs se sont intéressés aux CSN présentes chez l'adulte.

(2) Cellules souches neurales adultes

Pour rappel, les CSN adultes sont retrouvées au sein de plusieurs niches cellulaires du système nerveux central comme la SVZ. Étant donné que ces cellules possèdent un potentiel neurogénique limité, l'objectif premier de ces études a été de stimuler la prolifération et la différenciation de ces cellules endogènes afin qu'elles remplacent les neurones DA de la SN dégénérés chez les patients parkinsoniens. Cependant, le nombre de CSN endogènes disponible étant faible ou déjà engagé dans un sous-type neuronal précis, cette approche thérapeutique reste, encore à ce jour, hypothétique (Lie et al., 2002; pour revue: Morrison, 2016).

Afin de contourner ces problèmes de disponibilité, une seconde stratégie est actuellement en cours d'étude. Cette dernière consiste à prélever directement les CSN des niches et d'induire leur prolifération et leur spécification *in vitro*, avant de les greffer *in vivo* (Westerlund et al., 2005). À partir de CSN issues de la SVZ de rongeurs ou d'humain, de nombreuses études ont démontré la possibilité de générer *in vitro* des neurones exprimant la TH. Après la greffe de ces neurones dans le striatum de rongeurs, une amélioration fonctionnelle a été décrite (Chen et al., 2007; Meissner et al., 2005; Shim et al., 2007; Zhang et al., 2003). Cependant, étant donné le faible taux de survie de ces cellules greffées et le nombre peu important de cellules présentant un phénotype neuronal DA, les améliorations comportementales observées seraient majoritairement dues aux cellules gliales issues des CSN greffées (Cave et al., 2014).

À l'instar des CSN embryonnaires, un ou plusieurs facteurs intervenants à différents temps du développement embryonnaire ont été utilisés en vue d'augmenter le nombre de neurones à dopamine de la SNpc générés *in vitro* à partir des CSN (Kim et al., 2006b; Lee et al., 2009; Parish et al., 2008; Shim et al., 2007). Par exemple, il a été montré que la proportion de cellules TH⁺ augmente de 10 fois lors de la surexpression de Wnt5a (Parish et al., 2008), jusqu'à 250 fois lors de la surexpression de Nurr1 dans des CSN provenant d'un tissu adulte (Shim et al., 2007) et plus de 18 fois lors de la co-surexpression de Nurr1 et FoxA2 dans des CSN d'embryon de souris (Lee et al., 2009). Dans ce dernier cas, une réduction du risque de formation de tératomes a également été observée grâce à la propriété de sortie du cycle cellulaire de FoxA2 (Lee et al., 2009).

Ainsi, bien que l'utilisation de ces cellules soit attrayante pour une thérapie de remplacement cellulaire, les difficultés d'isolement, de prolifération et de différenciation en neurones DA de la SNpc matures, nécessitent une optimisation technique. Trois études cliniques utilisant des CSN provenant de patients parkinsoniens sont actuellement en cours de réalisation afin de mettre au point un protocole standardisé (NCT01329926, NCT02452723, NCT03128450). Au vu de la difficulté de prélèvement des CSN, un autre type de cellules multipotentes est actuellement étudiée : les cellules stromales mésenchymateuses (CSM).

b) Cellules stromales mésenchymateuses

Les cellules stromales mésenchymateuses sont des cellules souches multipotentes qui se définissent comme des progéniteurs non-hématopoïétiques. Ces cellules sont présentes, à la fois chez l'adulte et l'embryon, dans différents tissus de l'organisme tels que la moelle osseuse, le tissu adipeux, les muscles, les os, le cordon ombilical... (pour revue: Gugliandolo et al., 2016). Leurs sites de résidence multiples, leur facilité de prélèvement et d'isolement (notamment au niveau du tissu adipeux et de la moelle osseuse), leur propriété d'immunosuppression ainsi que la possibilité de greffes autologues, font des CSM une source cellulaire intéressante à étudier pour la thérapie de remplacement cellulaire de nombreuses pathologies (pour revue: Gugliandolo et al., 2016). Par exemple, à l'aide de l'activation de voies de signalisations et de facteurs de transcription tels que LMX1A et WNT5a ou encore des modifications épigénétiques, il a été démontré qu'il était possible de différencier des CSM de la moelle osseuse de rat (Chen et al., 2017; Dezawa et al., 2004), de macaques rhésus (Wang et al., 2015a), d'humain (Fan et al., 2014; Zhang and Alexanian, 2012) en neurones DA. Ces derniers peuvent réduire significativement les déficits moteurs après avoir été transplanté dans le striatum (Dezawa et al., 2004) ou la SNpc (Chen et al., 2017) de rats lésés à la 6-OHDA ou de macaques rhésus lésés au MPTP (Wang et al., 2015a). De plus, une étude clinique ouverte, portant sur la transplantation de CSM dérivées de cellules de la moelle osseuse autologues, a été réalisée chez 7 patients parkinsoniens âgés de 22 à 62 ans. Transplantées unilatéralement dans la SVZ latérale, il a été montré que ces greffes n'améliorent que faiblement la motricité des patients mais qu'elles permettent de réduire la dopathérapie des patients (Venkataramana et al., 2010). Une nouvelle étude clinique

ayant pour but d'étudier la sécurité et l'efficacité de la distribution en intraveineux de CSM dérivées de moelle osseuse chez les patients parkinsoniens idiopathiques est actuellement en préparation (NCT02611167).

La facilité d'accès des CSM pouvant directement être prélevée chez le patient lui-même ainsi que leur action de neuroprotection et de survie dans un environnement cérébral lésé, font de ces cellules une source attrayante pour la thérapie cellulaire de la MP (pour revue: Gugliandolo et al., 2016). Cependant, leur potentiel thérapeutique en clinique reste, encore à ce jour, restreint au vu de leur faible efficacité (Venkataramana et al., 2010). Cela pourrait être dû à une différenciation en neurones DA de la SNpc matures et fonctionnels incertaine (Jensen et al., 2011).

En conclusion, malgré la production de cellules TH⁺ à partir des cellules souches multipotentes que ce soit pour les CSN ou les CSM, les difficultés liées à leur utilisation et notamment leur faible capacité de proliférations et de différenciation en neurones matures ont engendré la recherche d'une autre source de cellules avec un potentiel de prolifération et différenciation plus large : les CSP.

2. Cellules souches pluripotentes

Deux grands types de cellules pluripotentes sont majoritairement utilisés dans le cadre de la thérapie de remplacement cellulaire de la MP : les cellules souches embryonnaires (CSE) et les cellules souches pluripotentes induites (aussi connu sous le nom de cellules iPS).

a) Cellules souches embryonnaires

Bien que pouvant être obtenues à partir de teratocarcinomes (Stevens, 1970), de gonades (Shamblott et al., 1998) ou d'embryons à un stade de post-implantation précoce (Evans and Kaufman, 1981), les CSE majoritairement étudiées en thérapie cellulaire sont obtenues à partir d'embryons surnuméraires conçus lors de fécondations *in vitro* et plus précisément à partir de la masse interne de blastocyste au 5^{ème} et 6^{ème} jour de fécondation. Une fois isolées, ces cellules peuvent être cultivées *in vitro* et différenciées en cellules somatiques aussi bien chez la souris (Evans and Kaufman, 1981; Okabe et al., 1996), que chez le primate non-humain (Thomson et al., 1995, 1998a) que chez l'Homme

(Reubinoff et al., 2000; Thomson et al., 1998b). Cependant, étant capable de se différencier en un plus large panel cellulaire que les CSM, leur différenciation requiert plus de précision et de finesse dans la régulation des morphogènes et leurs messagers secondaires responsables de leur maturation en neurones DA nigraux afin d'éviter tout risque de tératomes (Murry and Keller, 2008).

(1) Génération de neurones DA à partir de CSE *in vitro*

Il existe au moins deux types de protocoles pour différencier des CSE en neurones DA matures : l'utilisation de facteurs de croissances et de morphogènes sur des cellules en suspension, ou adhérentes, ou la co-culture de cellules combinant les CSE avec une couche de cellules nourricières. Bien qu'efficaces séparément, ces deux techniques peuvent d'ailleurs être combinées afin d'augmenter leur rendement. Il est également possible de compléter ces protocoles par la surexpression de facteurs de transcription clés du développement embryonnaire (Murry and Keller, 2008). La suite de mon manuscrit s'attarde, plus particulièrement, sur la description de la proportion de neurones à dopamine obtenus à partir des CSE, avec ces différentes méthodes de différenciation (Fig. 14), ainsi que l'impact anatomique et moteur de la transplantation des cellules dérivées des CSE *in vitro*.

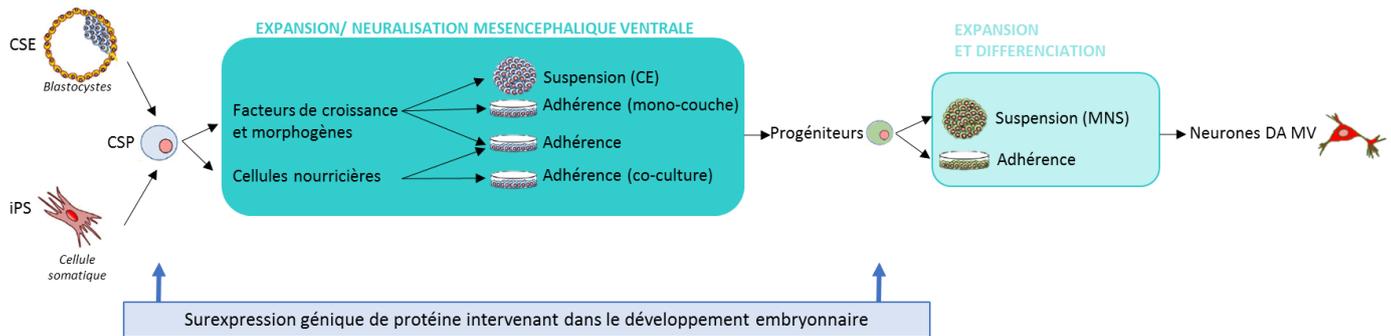


Figure 14: Protocoles de différenciation des cellules souches pluripotentes (CSP) en neurones à dopamine du mésencéphale ventral (DA du MV).

Les CSP (en bleu), que ce soit les cellules souches embryonnaires (CSE) ou les cellules souches pluripotentes induites (iPS) peuvent proliférer et induire leur neuralisation en suspension en formant des corps embryonnaires (CE) ou en adhérant à la boîte de culture à l'aide de facteurs de croissance et de morphogènes et/ou de cellules nourricières afin d'obtenir des progéniteurs neuronaux (en vert). Ces progéniteurs peuvent eux aussi proliférer en suspension en formant des masses neurales sphériques (MNS) ou par adhérence puis se différencier en cellules dopaminergiques et plus précisément en neurones DA MV (en rouge). Afin d'accroître la proportion de neurones DA MV obtenus *in vitro*, des protéines participant au développement embryonnaire de ces neurones peuvent être surexprimés au stade des CSP ou des progéniteurs.

Modifié à partir de (Arenas et al., 2015).

(a) Protocole par ajout de facteurs de croissance et morphogènes

Il existe deux approches de prolifération différentes pour le protocole par ajout de facteurs de croissance et de morphogènes : une croissance cellulaire en suspension formant des agrégats cellulaires en 3D appelés corps embryonnaires (CE) ou un développement en 2D par adhérence en monocouche.

(i) Corps embryonnaires

Le protocole de CE, mis au point par Lee et al. en 2000, est un procédé en 5 étapes qui inclut dans un premier temps (i) l'expansion de cellules indifférenciées en présence d'un facteur inhibant la différenciation : le facteur inhibiteur de leucémie LIF. Obtenues en nombre suffisant, ces cellules génèrent alors (ii) des CE en suspension qui sont constitués des 3 feuillets retrouvés chez l'embryon : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme. Ces CE adhèrent ensuite dans des boîtes de culture afin de (iii) sélectionner et (iv) amplifier les cellules issues de la partie ectodermique de ces agrégats. Lors de cette étape d'amplification cellulaire, les cellules peuvent être cultivées par adhérence ou en

suspension en formant des rosettes ou des masses neurales sphériques (MNS) (Cho et al., 2008a). L'ajout de FGF basique et d'acide ascorbique (AcAsc) dans le milieu de cultures aide à l'expansion et à la stabilité des cellules. L'addition de morphogènes participant spécifiquement au développement des neurones DA du MV, tels que SHH et le FGF-8, participent, quant à eux, à la spécification des CSN (Bain et al., 1995; Kim et al., 2009c). Le retrait de ces tous facteurs, exceptée l'AcAsc, induit spontanément (v) la différenciation et la maturation *in vitro* des cellules issues des CSE (Conley et al., 2004).

De nombreuses études ont utilisé le protocole de CE mis au point par Lee pour produire des neurones à dopamine en le complétant, ou non, par l'ajout d'autres morphogènes et facteurs de croissance pour des CSE murines ou humaines (Chung et al., 2005; Kim et al., 2002a; Kirkeby et al., 2012; Lee et al., 2000a; Okabe et al., 1996). Il est alors possible d'obtenir des neurones DA fonctionnels, libérant de la dopamine et améliorant les symptômes moteurs. Avec un protocole de CE classique, environ 10-30% des neurones sont positifs pour la TH (Lee et al., 2000a; Rodríguez-Gómez et al., 2007). La plus grande proportion de neurones TH⁺ induite *in vitro* a été obtenue par Cho et al. en 2008. À l'aide du protocole de double agrégation réalisées avec des CSE humaines, 86% des neurones générés ont exprimé la TH (Cho et al., 2008b).

(ii) *Protocole en mono-couche*

Le protocole de prolifération et de différenciation des cellules adhérentes en monocouche fait partie des techniques utilisées pour obtenir des neurones à dopamine *in vitro*. Moins hétérogène que les CE, les CSE sont directement attachées aux boîtes de culture grâce à une matrice extracellulaire de matrigel ou grâce à des molécules d'adhésion telles que la laminine ou la poly-ornithine/fibronectine (Murry and Keller, 2008). À partir de CSE murines et humaines il est possible d'obtenir des neurones DA (Chambers et al., 2009; Grealish et al., 2014; Kriks et al., 2011; Qiu et al., 2017). Par exemple, avec ce protocole, Schultz et ses collègues ont différencié 75% des neurones obtenus en neurones DA dérivés de CSE humaines (Schultz, 2007).

(b) Protocole de co-culture

Le protocole de différenciation en co-culture des CSE peut utiliser différents types de cellules nourricières (Kawasaki et al., 2000; Reubinoff et al., 2000; Roy et al., 2006; Thomson et al., 1998b). Par exemple, les CSM décrites précédemment, bien qu'employées comme source de cellules pour produire directement des neurones à dopamine, sont également utilisées dans ce protocole pour induire la différenciation des CSE (Kawasaki et al., 2000). Des CSM, comme les cellules PA6, MS5, S17 ou S2, expriment des facteurs de surfaces participant à la neurogenèse et sécrètent des molécules induisant la différenciation DA par des mécanismes encore inconnus à ce jour (Barberi et al., 2003; Perrier et al., 2004). Le phénotype des cellules différenciées est d'environ 20-25% pour des neurones TH⁺ à partir de CSE de souris (Baier et al., 2004; Hayashi et al., 2008; Morizane et al., 2002) et environ 35-70% à partir de CSE humaines (Park et al., 2004; Perrier et al., 2004; Zeng et al., 2004) ou de cellules de primates non-humain (Kawasaki et al., 2002; Perrier et al., 2004).

Bien que l'utilisation du protocole de co-culture soit plus simple et plus rapide que les protocoles de CE, son optimisation et sa standardisation sont difficiles à réaliser. Par exemple, à l'inverse des méthodes utilisant des morphogènes avec des concentrations et des temps d'exposition contrôlés, les mécanismes responsables de la différenciation neuronale des cellules nourricières sont inconnus. À ceci s'ajoute un autre niveau de difficulté limitant ainsi l'utilisation de ce protocole en clinique. En effet, une majorité des cellules utilisées en co-culture proviennent d'une espèce biologique différente des humains ce qui induit un risque de xénotransmissions pathologiques (Hayashi et al., 2008). Pour contrecarrer ce problème, des protocoles exempts de xéno-contaminants ont été développés (Amit et al., 2004; Mallon et al., 2006; Sidhu et al., 2008).

(c) Protocole de co-culture et morphogènes

Dans la littérature, des protocoles de différenciations ont été effectuées en combinant ceux utilisant des morphogènes avec ceux de co-cultures. L'association de ces deux techniques permet alors une augmentation de la proportion des cellules TH⁺ chez la souris, le primate non-humain et l'Homme (Chiba et al., 2008; Park et al., 2004; Sanchez-Pernaute et al., 2008; Shintani et al., 2008; Sonntag et al., 2007; Yang et al., 2008; Yue et

al., 2006). Par exemple, Buytaert et al. montrent que la proportion de cellules TH⁺ humaines double en présence de GDNF (443 ± 105 cellules TH⁺ par puits cultivés en co-culture avec des cellules PA6 contre 934 ± 136 avec des cellules PA6 et du GDNF) (Buytaert-Hoefen et al., 2004).

En plus des protocoles de morphogènes ou de co-cultures modifiés pour induire une différenciation DA nigrale, il est possible d'augmenter cette induction neuronale DA de type MV en activant des voies de signalisation intrinsèques. En effet, des facteurs de transcription impliqués lors du développement embryonnaire des neurones DA de la SNpc peuvent être surexprimés au sein des CSE.

(d) Protocole avec CSE modifiées génétiquement

Afin de modifier spécifiquement l'expression de protéines cellulaires, il est possible d'avoir recours à la technique de modulation génique (pour revue: Lin et al., 2017). Par exemple, pour obtenir des neurones à dopamine de la SNpc, un ou plusieurs facteurs intervenants à différents temps du développement embryonnaire ont été utilisés (Chung et al., 2002; Friling et al., 2009; Kim et al., 2006b; Martinat et al., 2006; Parish et al., 2008).

Ainsi, l'expression forcée de LMX1A entraîne la différenciation de CSE de souris en neurones à DA du mésencéphale ventral avec 45 à 75% de cellules TH⁺ différenciées par l'utilisation d'un protocole de CE et de 75 à 95% pour un protocole en mono-couche (Friling et al., 2009). À partir de CSE humaines, il a été démontré la possibilité de différencier entre 40 à 70% de cellules TH⁺ Tuj1⁺ (Cai et al., 2009; Fathi et al., 2015; Sánchez-Danés et al., 2012), dont 70% co-expriment GIRK2 (Sánchez-Danés et al., 2012).

La surexpression de Nurr1 dans des CSE de souris permet, quant à elle, d'obtenir 90% de neurones TH⁺ quand ils sont cultivés en co-culture avec des morphogènes. Cette surexpression augmente tous les marqueurs neuronaux des neurones à dopamine mésencéphaliques mais n'augmente pas les autres marqueurs neuronaux ou gliaux. De plus, les cellules transplantées dans le striatum de souris survivent, se différencient dix fois plus en cellules TH⁺ que les cellules non-transfectées et présentent des caractéristiques électrophysiologiques identiques à celles des neurones

mésencéphaliques (Cho et al., 2006a; Chung et al., 2005; Kim et al., 2002a; Martinat et al., 2006; Parish et al., 2008).

Bien que les résultats obtenus avec la surexpression de Pitx3 dans les CSE de souris montrent une augmentation des marqueurs neuronaux DA du MV, cette dernière est en moindre proportion par rapport aux cellules transfectées avec Nurr1. Néanmoins, les cellules présentent plus de cellules AHD2⁺. Ceci suggère alors que la transfection de Pitx3 influence la spécialisation et/ou la maintenance des neurones de type A9 alors que Nurr1 joue un rôle dans la spécialisation des neurones DA du mésencéphale seulement (Chung et al., 2005; Hedlund et al., 2008). Leur co-surexpression dans des CSE de souris ou humaines permet d'obtenir 90% des cellules TH⁺ de manière identique à la surexpression de Nurr1. De plus, leur co-expression augmente de 3 fois le nombre de neurones DA matures exprimant le DAT et n'induit aucune augmentation d'autres phénotypes neuronaux comme le phénotype GABAergique ou sérotoninergique (Martinat et al., 2006).

Bien que les transfections permettent d'augmenter le nombre de neurones à dopamine *in vitro*, l'utilisation de méthodes virales et les modifications de l'ADN génomiques peuvent être responsables d'instabilité génique souvent délétères lors d'une application clinique (pour revue: Lin et al., 2017). De plus, malgré la présence de morphogènes dans le milieu de culture et l'expression forcée de facteurs de transcription induisant efficacement la différenciation en neurones DA, cette dernière n'est pas homogène pour toutes les cellules mais désynchronisée à la fois dans le temps et l'espace. Afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique, la variabilité cellulaire peut être réduite en ôtant les cellules non essentielles à la transplantation et qui peuvent avoir un rôle *in vivo* inapproprié. Pour cela, les cellules d'intérêt sont isolées par cytométrie en flux activée par fluorescence (FACS) ou par tri cellulaire magnétique (MACS) (Conley et al., 2004). Par exemple, en 2008, Hedlund et ses collègues ont montré qu'après une sélection des cellules Pitx3⁺ réalisée par FACS, ces dernières présentent un enrichissement de 99.6% de précurseurs DA du mésencéphale ventral Pitx3 avec 99.9% de co-localisation avec la TH (Hedlund et al., 2008).

Pour conclure, avec une mise au point multiple et variée des méthodes de différenciation, de nombreux chercheurs ont démontré la possibilité de produire, *in vitro*, des neurones DA du sous-type A9 à partir des CSE murines, primates non-humains et humaines. Le potentiel thérapeutique de ces cellules a ensuite été testé chez plusieurs espèces animales.

(2) Transplantation des précurseurs DA dérivés de CSE

Suite aux transplantations intracérébrales, il a été possible d'étudier le potentiel de restauration anatomique et moteur des CSE de souris, de primates non-humains ou d'humains en vue de les confronter à celui des cellules DA fœtales du MV.

(a) Cellules de rongeurs

Il a été démontré que des précurseurs DA dérivés de CSE de souris transplantées en intra-striatal peuvent survivre, se différencier en neurones matures DA et restaurer, progressivement et sur le long terme, les déficits moteurs induits chez des rats lésés par la 6-OHDA (Bjorklund et al., 2002; Martinat et al., 2006; Rodríguez-Gómez et al., 2007; Shintani et al., 2008; Thinyane et al., 2005). Björklund et al. ont montré, en 2002, une restauration des niveaux de dopamines striataux par TEP et IRM fonctionnelle et une amélioration de la motricité globale analysée par un test de rotation à l'amphétamine (Bjorklund et al., 2002). Ceci démontre ainsi qu'il est possible d'utiliser des CSE comme source de cellules en remplacement des cellules fœtales. Cependant, dans cette étude, 5 rats sur 25 sont morts à cause de la formation de tératomes. Toutefois, en utilisant des cellules suffisamment induites dans leur voie de différenciation, aucun tératome ne se développent consécutivement à la transplantation (Baier et al., 2004; Barberi et al., 2003; Friling et al., 2009; Shintani et al., 2008).

(b) Cellules de primates non-humains

Les cellules progénitrices dérivées de CSE de primates non-humains se différencient en neurones TH⁺ *in vitro* à hauteur de 70% (Perrier et al., 2004; Yue et al., 2006). Transplantées par la suite dans le striatum de rats lésés à la 6-OHDA, environ 790 cellules TH⁺ sur les 100000 transplantées survivent par greffon (Kriks et al., 2011; Sanchez-

Pernaute et al., 2008; Yue et al., 2006). Takagi et ses collègues ont démontré qu'une lignée cellulaire de primate (singe *cynomolgus*) est capable de produire 24% de cellules TH⁺ (Takagi et al., 2005). Ces cellules ont ensuite été transplantées bilatéralement dans le putamen d'un modèle primate de la MP induit par MPTP. Dix semaines après la transplantation, une récupération de la posture et de la mobilité a été observée chez les primates transplantés. En outre, aucun singe ayant subi une greffe n'a développé de dyskinésies. Une restauration de la recapture de la dopamine striatale a été mise en évidence grâce à la ¹⁸F-fluorodopa et la TEP en lien avec l'analyse post-mortem montrant 2130 ± 645 cellules TH⁺ présentes dans le greffon. De plus, aucune formation tumorale n'a été décrite, bien que ces cellules continuent de proliférer (7996 ± 3300 cellules BrdU⁺, un marqueur de prolifération).

(c) Cellules humaines

Concernant les cellules humaines, des nombreuses expériences ont démontré qu'il était possible de différencier des CSE humaines en neurones à DA *in vitro*. Toutefois, leur capacité à rétablir la motricité reste très modeste une fois transplantées dans le striatum de rats lésés à la 6-OHDA (Brederlau et al., 2006; Park et al., 2004). En effet, bien qu'environ 40% de neurones TH⁺ sont obtenus *in vitro*, le pourcentage *in vivo* de cellules TH⁺ est très faible, voire inexistant. (Martinat et al., 2006; Zeng et al., 2004). En améliorant le protocole, plusieurs études ont mis en évidence, à ce jour, une survie plus importante des neurones DA ainsi qu'une restauration motrice efficace (Cho et al., 2008b; Kriks et al., 2011; Sonntag et al., 2007; Yang et al., 2008). En 2007, Sonntag et al. ont montré que pour une lignée cellulaire sur deux, une survie d'environ 160 ± 74 cellules TH⁺ pour 7 rats transplantés sur 12. Parmi ces animaux, 3 seulement ont présentés une restauration motrice comprise entre 10 et 94%, lors du test de rotations induites par l'amphétamine (Sonntag et al., 2007). La plus grande proportion de neurones TH⁺ obtenus avec le protocole CE par Cho et ses collègues en 2008 ont, également, démontré une survie de 10732 ± 4132 cellules TH⁺ dans le striatum de rats lésés à la 6-OHDA. Après analyse des tests de rotations utilisant l'apomorphine et l'amphétamine ainsi que le test d'akinésie des pattes antérieures, ceux-ci démontrent un rétablissement moteur pour les rats transplantés (Cho et al., 2008b). Kriks et al. ont démontré, ultérieurement, que 5 mois après la transplantation dans le striatum de rats lésés à la 6-OHDA, 15000 cellules TH⁺ sont

observées dans le greffon, induisant, ainsi, une restauration complète de la motricité pour des tests de comportement tels que le test de la rotation induites par l'amphétamine, le test de la marche, le test de l'akinésie des pattes antérieures et le test du cylindre. De plus, les neurones 5-HT ou GABAergiques sont présents en très petite quantité dans le transplant et proviennent de l'hôte (Kriks et al., 2011). La survie, la différenciation DA et l'intégration de précurseurs DA dérivés de CSE humaines ont également été démontré après transplantation au sein du noyau caudé et de la substance noire de primate non-humain (Daadi et al., 2012). Concernant le risque de formation de tératome, bien que l'étude de Sonntag et al. a indiqué la mort de deux rats du à la présence de tératomes (Sonntag et al., 2007), l'absence de tumeurs a été soulignée pour les autres publications (Cho et al., 2008b; Kriks et al., 2011; Roy et al., 2006; Yang et al., 2008).

En conclusion, l'utilisation de CSE animales ou humaines a permis de mettre en évidence la possibilité d'utiliser une source cellulaire différentielle des cellules DA fœtales du MV afin de produire de nouveaux neurones DA de la SNpc et restaurer les déficits moteurs observés dans les modèles animaux de la MP. Une étude clinique chinoise est actuellement en train de recruter des patients parkinsoniens afin d'étudier la sécurité et l'efficacité des précurseurs DA dérivés de CSE humaines dans le cadre d'une thérapie de remplacement cellulaire (NCT03119636). Cependant, en vue de réaliser des transplantations efficaces chez l'Homme, tout en évitant au maximum les risques de rejet à cause d'incompatibilité immunologique et l'utilisation d'immunosuppresseurs sur le long terme, il est préférable d'utiliser une source cellulaire humaine et notamment celles issues du patient lui-même.

Les techniques de reprogrammation cellulaire, élaborées au début du 21^{ème} siècle, ont démontré que des cellules différenciées ne sont pas assujetties de manière irréversible à leur spécification finale. En effet, en utilisant des facteurs appropriés, il est possible de reprogrammer et de différencier un type de cellules en un autre. Ces approches sont très attrayantes pour la thérapie de remplacement cellulaire et permettent de passer outre les problèmes de rejets et d'éthiques en utilisant des cellules provenant directement des patients. Une des stratégies de reprogrammation et de différenciation cellulaire pour les cellules somatiques adultes (CSA) consiste en une reprogrammation en cellules souches pluripotentes, aussi appelées cellules souches

pluripotentes induites puis en une redifférenciation en utilisant des protocoles identiques à ceux des CSE (Takahashi and Yamanaka, 2006; Wernig et al., 2008a)

b) Cellules souches pluripotentes induites

Pour produire des cellules pluripotentes à partir de CSA plusieurs techniques de reprogrammation ont été étudiées.

(1) Reprogrammation

Les premières expériences de reprogrammation cellulaire ont consisté en un transfert de noyau de cellule somatique dans un oocyte aussi appelé clonage cellulaire (Briggs and King, 1952; Wilmut et al., 1997). La fusion de cellules somatiques adultes avec des CSE permet également l'obtention des CSP (Miller and Ruddle, 1976). Bien qu'ayant la capacité de reprogrammer des cellules somatiques en CSP, ces techniques sont difficiles et chronophages. De plus, elles ne permettent pas de se défaire des problèmes éthiques en lien avec l'utilisation d'un matériel embryonnaire. Il faudra attendre 2006, pour que les docteurs Yamanaka et Takahashi proposent un procédé supplémentaire de reprogrammation (Takahashi and Yamanaka, 2006). Ils ont ainsi démontré que 4 facteurs de transcription exprimés par les CSP (OCT4, Sox2, c-Myc et Klf4) introduits dans des fibroblastes de souris par transduction rétrovirale sont capables d'effectuer des modifications génomiques et épigénétiques suffisamment importantes pour reprogrammer ces cellules fibroblastiques en CSP. Ce sont les iPS. Plusieurs études ont depuis validé l'utilisation de cette technique (Hochedlinger and Plath, 2009; Jaenisch and Young, 2008; Kim et al., 2009b; Takahashi et al., 2007). Malgré des différences génétiques et épigénétiques, ces cellules présentent une morphologie et des caractéristiques cellulaires communes avec les CSE en terme d'auto-renouvellement et de pluripotence (Chin et al., 2009; Deng et al., 2009). Peu de temps après, avec une combinaison de facteurs légèrement différentes (Nakagawa et al., 2008; Okita et al., 2007; Wernig et al., 2008b), une reprogrammation des fibroblastes humains et même de patients parkinsoniens a été démontré avec la même efficacité que les fibroblastes de souris (Lowry et al., 2008; Park et al., 2008; Soldner et al., 2009).

Cependant, l'utilisation de méthodes virales intégrant de manière aléatoire les gènes de facteurs de transcription de pluripotence peuvent altérer le potentiel de différenciation ou encore intensifier le phénotype tumoral des CSP (Soldner et al., 2009). Des stratégies alternatives non-virales de distribution de transgènes n'induisant pas de modifications irréversibles de l'ADN génomique des cellules, ont également démontré leur efficacité (pour revues: Hu, 2014; Lowry and Plath, 2008). Par exemple, des équipes ont utilisé une grande variété de matériels biologiques tels que des virus D'ARN non-intégrés, des vecteurs épisomaux (Mack et al., 2011; Yu et al., 2009), des lentivirus excisables ou inactivables (Hockemeyer et al., 2008; Soldner et al., 2009), des transposons (Kaji et al., 2009; Woltjen et al., 2009), des vecteurs adénoviraux non intégratifs (Zhou and Freed, 2009; pour revue: Stadtfeld et al., 2008a) et plasmidiques (Okita et al., 2013), des ARN synthétiques retirés après la reprogrammation (Warren et al., 2010), de molécules de signalisation ou des inhibiteurs chimiques (Huangfu et al., 2008; Zhang et al., 2012) et des protéines recombinantes (Kim et al., 2009a). Bien que ces approches non-intégratives soient moins efficaces que les méthodes virales, elles restent néanmoins prometteuses pour une utilisation en clinique.

La reprogrammation efficace de cellules somatiques autres que fibroblastiques a également été mise en place (Aasen et al., 2008; Loh et al., 2009; Okita et al., 2013; Stadtfeld et al., 2008b). Cependant, l'efficacité de cette reprogrammation semble être dépendante du type de cellules somatiques utilisées. Par exemple, Aasen et al. ont rapporté que le pourcentage de cellules reprogrammées en iPS est au moins 100 fois plus importante à partir de keratinocytes (1%) que de fibroblastes (<0.1%) (Aasen et al., 2008). De plus, la spécificité de la source cellulaire induit une adaptation du type de facteurs utilisés lors de la reprogrammation (pour revue: Stadtfeld and Hochedlinger, 2010).

(2) Génération de neurones DA à partir d'iPS in vitro

En plus d'avoir des caractéristiques moléculaires et morphologiques communes aux CSE, les cellules iPS répondent de manières similaires aux protocoles de différenciation en neurones à DA de la SNpc décrits précédemment pour la différenciation des CSE (Barker et al., 2015; Cooper et al., 2010; Hargus et al., 2010; Kikuchi et al., 2011).

Soldner et al. ont démontré, en 2009, que la proportion de cellules TH⁺ obtenues *in vitro* est fortement similaire à celle des cellules dérivées de CSE humaines (Soldner et al., 2009).

(3) Transplantation des précurseurs DA dérivés d'iPS

Le potentiel thérapeutique des précurseurs DA du MV a été étudiée chez la souris, le rat et le primate non-humain après transplantation dans le striatum (Kikuchi et al., 2011; Wernig et al., 2008a). Hargus et al. dès 2010 ont démontré qu'une forte proportion de neurones DA dérivés d'iPS de patients parkinsoniens peuvent survivre jusqu'à seize semaines post-transplantation, dans un striatum de rats lésés à la 6-OHDA, à hauteur de $4\,890 \pm 640$ cellules dont $53.4 \pm 6.6\%$ sont GIRK2⁺. Ces neurones sont capables de s'arboriser et d'envoyer quelques projections au niveau du striatum dorsal. Après analyses immunohistochimiques, aucune cellule ne présente d'agrégat d'alpha-synucléine ou d'ubiquitine, ni de tumeur. De plus, une restauration de la motricité a été mise en évidence par les tests de rotations induites par l'apomorphine ou l'amphétamine. En revanche, étant donné la faible connectivité DA striatale du greffon, aucune amélioration motrice n'a été observée pour les tests du cylindre et d'ajustement du pas (Hargus et al., 2010). Il a également été montré par Kikuchi et ses collègues, en 2011, que ces cellules peuvent également survivre et se différencier en neurones à dopamine de la SNpc une fois transplantées dans le striatum de primates non-humains engendrant alors une légère amélioration motrice (Kikuchi et al., 2011).

En conséquence, les iPS reprogrammées de personnes saines ou atteintes de la MP sont une source de cellules attractives pour produire de nouveaux neurones DA du sous-type A9 pour la thérapie de remplacement cellulaire. Les techniques de reprogrammation des CSA utilisées pour les iPS ont également été utilisées pour reprogrammer directement des CSA en un autre type de CSE comme des précurseurs ou des neurones DA de la SNpc sans passer par un stade de pluripotence (Fig. 15).

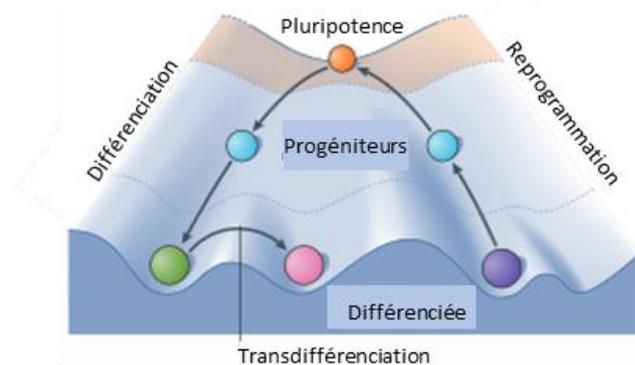


Figure 15: Représentation graphique de la plasticité cellulaire : différenciation, reprogrammation et transdifférenciation.

Le schéma de Waddington, représenté ici, met en relief la capacité de différenciation des cellules pluripotentes en cellules matures en passant par un stade intermédiaire (progéniteurs) ; mais également l'aptitude des cellules à transiter d'un état différencié à un état pluripotent (reprogrammation). De plus, ces cellules différenciées peuvent se convertir en un autre type cellulaire différencié (transdifférenciation). Modifiée à partir de (Takahashi and Yamanaka, 2016).

C. Génération de neurones DA dérivés de cellules somatiques adultes

Les cellules somatiques non-neuronales ou non-DA sont une autre source de cellules utilisée dans le cadre de la MP. En effet, grâce à une différenciation directe, c'est-à-dire, sans passer par un stade de pluripotence comme les iPS, une CSA peut se convertir en précurseurs ou en un type différent de cellules somatiques : c'est la conversion directe ou transdifférenciation (Fig. 15). Ainsi, une cellule somatique peut se reprogrammer en CSN, ce sont les CSN induites (CSNi), en neurones aussi appelés neurones induits (Ni), mais également en cellules de la crête neurale et en cellules gliales (pour revue: Gopalakrishnan et al., 2017). Outre le gain de temps et d'argent lié à un protocole moins et plus homogène, l'intérêt de ces reprogrammations, par rapport aux cellules iPS est la diminution de la formation tumorale car elles contournent le stade de pluripotence. De plus, ces cellules induites semblent présenter moins de variabilité épigénétique et une meilleure fonctionnalité des neurones matures (Lujan and Wernig, 2013; Marro et al., 2011). Différentes stratégies méthodologiques peuvent être utilisées pour cette conversion directe. Il est par exemple possible d'activer les gènes neuraux, de déstabiliser les mécanismes cellulaires responsables du phénotype somatique ou encore de réinitialiser la conformation de la chromatine (pour revue: Gopalakrishnan et al., 2017).

Pour cela, une surexpression combinée et spécifique de facteurs est réalisée dans les cellules à l'aide des outils de reprogrammation comme des facteurs de transcriptions (Vierbuchen et al., 2010), des ARN (Ambasudhan et al., 2011; Yoo et al., 2011) et/ou des molécules de signalisation et des inhibiteurs chimiques (pour revues: Gopalakrishnan et al., 2017; Hu, 2014). Dans ce chapitre, seules les CSNi et Ni sont présentés.

1. Neurones induits

En 2010, Vierbuchen et ses collègues ont été les premiers à obtenir des neurones *in vitro* à partir de cellules somatiques par conversion directe. En effet, en surexprimant 3 facteurs de transcription participant au développement embryonnaire des neurones (Ascl1, Brn2 et Myt1l). En effet, des neurones GABAergiques et glutamatergiques, générant des potentiels d'action et formant des contacts synaptiques, ont été obtenus *in vitro* à partir de fibroblastes embryonnaires et post-nataux de souris (Vierbuchen et al., 2010). Peu de temps après et avec un facteur de transcription supplémentaire (NeuroD1), Pang et al. ont cultivé des neurones à partir de fibroblastes embryonnaires et post-nataux humains (Pang et al., 2011). Depuis, des études ont conforté ces premiers résultats de transdifférenciation neuronale murine et humaine (Ambasudhan et al., 2011; Kim et al., 2011a). Par la suite, plusieurs études et notamment celle de Caiazzo et al. en 2011, ont démontré la possibilité de reprogrammer des cellules somatiques en neurones à DA matures et fonctionnels du MV que ce soit avec des fibroblaste adultes de souris (environ 18% de cellules TH⁺ par rapport aux cellules totales) ou d'humains sains (3%) ou atteints de MP (3%) (Ambasudhan et al., 2011; Caiazzo et al., 2011; Kim et al., 2011a; Pfisterer et al., 2011). Après transplantations dans le striatum de souris ou de rats lésées à la 6-OHDA, les Ni dopaminergiques issus de fibroblastes de souris peuvent survivre, se différencier en neurones DA fonctionnels à hauteur de 350 à 1900 cellules TH⁺ par greffon pour l'étude de Kim et al. en 2011. Ces derniers sont capables d'améliorer les symptômes moteurs analysés par le test de rotation à l'amphétamine (Kim et al., 2011a; Liu et al., 2012).

D'autres sources de CSA tels que les astrocytes sont capables de produire des neurones *in vitro* et notamment des neurones DA (Addis et al., 2011; Aravantinou-Fatorou et al., 2015; Ding et al., 2014). La reprogrammation de cette source de cellules est

particulièrement intéressante dans la cadre de conversion directe *in vivo*. Il a été démontré que des astrocytes striataux peuvent directement être différenciés en Ni DA dans un modèle murin de la MP (Rivetti di Val Cervo et al., 2017; pour revue: Torper and Götz, 2017).

Bien que la possibilité d'obtention de Ni *in vitro* et *in vivo* efficace existe, la reprogrammation reste de faible rendement et les Ni présentent des limites de prolifération. Afin de contourner ces difficultés, une transdifférenciation en CSN directement peut être effectuée. Ces cellules possèdent alors un potentiel de prolifération et différenciation plus large que celui des Ni (pour revues: Gopalakrishnan et al., 2017; Kim et al., 2011b).

2. Reprogrammation en cellules souches neurales (CSNi)

Une reprogrammation directe de fibroblastes de souris en cellules souches neurales a été induite par la surexpression d'un seul facteur de transcription Sox2. Après caractérisation, il a été démontré que ces cellules expriment les marqueurs de cellules souches neurales et présentent une morphologie similaire. Ces CSNi sont capables de proliférer, de s'agréger en neurosphère et de se différencier en neurones, en oligodendrocytes et en astrocytes (pour revue: Kim et al., 2011b). Des CSNi peuvent être obtenus à partir de fibroblastes de souris (Tian et al., 2015). Après avoir été transplantés dans le striatum de souris lésées au MPTP, ces précurseurs DA sont capables de survivre et de s'intégrer sans risque de tératomes. Ils se différencient en neurones DA induisant une amélioration motrice pour le test du rotarod (Tian et al., 2015). D'autres cellules somatiques peuvent également être reprogrammées en CSNi comme les cellules de Sertoli chez la souris (Sheng et al., 2012).

Finalement, malgré une plus faible efficacité de rendement comparé aux CSP, la transdifférenciation reste une approche prometteuse qui nécessite néanmoins une meilleure compréhension des mécanismes sous tendant cette différenciation afin d'augmenter la proportion des neurones DA obtenus (pour revue: Playne and Connor, 2017).

Ainsi de nombreuses sources de cellules alternatives aux cellules fœtales ont été étudiées ces trois dernières décennies, chacune comportant des avantages et des inconvénients pour leur utilisation dans le cadre d'une thérapie de remplacement cellulaire de la MP (Tableau 3). Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la différenciation et transplantation de cellules précurseurs des neurones DA de la SNpc dérivées de CSE murines.

	Avantages	Inconvénients
Cellules DA fœtales du MV	<ul style="list-style-type: none"> Efficacité de restauration des déficits moteurs chez certains groupes de patients 	<ul style="list-style-type: none"> Problèmes éthiques Disponibilité tissulaire limitée Risque de rejet immunitaire
CSE	<ul style="list-style-type: none"> Prolifération illimitée Potentiel à générer tous les types cellulaires (pluripotence) Génération d'une banque de cellule souche 	<ul style="list-style-type: none"> Risque de formation de tératomes Différenciation et composition hétérogène Protocoles de différenciation complexes et chronophages Risque de rejet immunitaire Problèmes éthiques
CSN	<ul style="list-style-type: none"> Potentiel de différenciation restreint (multipotence) Faible risque de formation de tératomes 	<ul style="list-style-type: none"> Capacité de prolifération limitée Capacité de différenciation neuronale réduite suite à une prolifération sur le long terme Risque de rejet immunitaire Problèmes éthiques (CSN fœtales)
CSM	<ul style="list-style-type: none"> Facilement récoltées Possibilité d'être générées à partir des cellules de patients Pas de problèmes éthiques 	<ul style="list-style-type: none"> Différenciation en « vrais » neurones dopaminergiques fonctionnels reste incertaine
iPS	<ul style="list-style-type: none"> Prolifération illimitée Potentiel à générer tous les types cellulaires (pluripotence) Génération d'une banque de cellule souche Possibilité d'être générées à partir des cellules de patients Pas de risque de rejet immunitaire Pas de problèmes éthiques 	<ul style="list-style-type: none"> Risque de formation de tératomes Différenciation et composition hétérogène Protocoles de différenciation complexes et chronophages Technique onéreuse Conservation de prédispositions génétiques de la MP si des cellules autologues sont utilisées
Ni	<ul style="list-style-type: none"> Faible risque de formation de tératomes Possibilité d'être générées à partir des cellules de patients Homogénéité cellulaire Protocoles de différenciation rapides et peu coûteux Pas de risque de rejet immunitaire Pas de problèmes éthiques 	<ul style="list-style-type: none"> Capacité de prolifération limitée Faible efficacité de la transdifférenciation Conservation de prédispositions génétiques de la MP si des cellules autologues sont utilisées
CSNi	<ul style="list-style-type: none"> Faible risque de formation de tératomes Possibilité d'être générées à partir des cellules de patients Homogénéité cellulaire Protocoles de différenciation rapides et peu coûteux Pas de risque de rejet immunitaire Pas de problèmes éthiques 	<ul style="list-style-type: none"> Capacité de prolifération limitée Faible efficacité de la transdifférenciation Conservation de prédispositions génétiques de la MP si des cellules autologues sont utilisées

Tableau 3: Tableau des avantages et des inconvénients des différentes sources cellulaires alternatives pour une thérapie de remplacement cellulaire de la maladie de Parkinson.

DA : Dopaminergiques ; MV : mésencéphale ventral ; CSE : cellules souches embryonnaires ; CSN : cellules souches neurales ; CSM : cellules souches mésenchymateuses ; iPS : cellules souches pluripotentes induites ; Ni : neurones induits ; CSNi : cellules souches neurales induites.

Modifié à partir de (Jensen et al., 2011; Stoker et al., 2017) .

IV. Objectifs de thèse

Ce projet de thèse s'inscrit dans le cadre de l'amélioration des techniques de thérapie de remplacement cellulaire mises en place dans le cadre de la MP. Ceci dans le but de restaurer les taux de dopamine striataux et de réduire les symptômes moteurs développés par les patients parkinsoniens.

Comme décrit précédemment, les premières études de thérapies cellulaires se sont intéressées aux neurones fœtaux du MV, à l'origine des futurs neurones DA de la SNpc. L'efficacité de ces cellules a été validée chez l'Homme, après leur transplantation au sein du striatum de plusieurs centaines de patients à travers le monde. Au sein du laboratoire, il a été démontré que des transplantations intra-nigrales de neurones DA fœtaux issus du MV de souris, à E12.5, sont capables de rétablir la voie nigrostriée dégénérée d'un modèle murin de la MP lésé à la 6-OHDA et de réduire, chez ces animaux, les déficits moteurs fins comme l'appréhension des membres antérieures (Gaillard et al., 2009 ; Droguerre et al.). Cependant, les problèmes de disponibilités, d'éthiques et de standardisation de protocoles engendrés par l'utilisation de cellules fœtales a forcé la recherche d'une autre source de cellules.

Le but de cette thèse a été de produire des neurones à dopamine du type nigral, *in vitro*, à partir de cellules souches pluripotentes murines et d'étudier le potentiel thérapeutique de ces cellules après transplantation au sein de la substance noire ou du striatum dans un modèle murin de la MP.

Plusieurs études ont démontré la possibilité d'une restauration motrice dans des modèles de rongeurs de la MP, en transplantant des précurseurs DA du MV issues de CSE murines en intra-striatal et en utilisant majoritairement des tests de rotations induites par des drogues (amphétamine ou apomorphine) (Ganat et al., 2012; Kim et al., 2002a; Okabe et al., 1996; Rodríguez-Gómez et al., 2007). Cependant, aucune de ces études n'a étudié l'influence des CSE de souris sur les compétences motrices fines après transplantation au sein de la SN.

Pour répondre à cette problématique, des cellules souches embryonnaires murines de la lignée cellulaire D3 Tau-GFP ont été différenciées *in vitro* à l'aide du protocole de CE décrit au chapitre précédent. Cependant, les résultats préliminaires *in vitro* ont présenté une majorité de neurone DA de type ATV issus des CSE D3 Tau-GFP. Afin d'augmenter la proportion des neurones DA de type SNpc générée *in vitro*, LMX1A, un facteur de transcription participant à la spécification des neurones DA mésencéphaliques, a été utilisé.

Ainsi les objectifs de ma thèse ont été d'étudier **i)** l'impact de la séquence codante de LMX1A sur la différenciation neuronale des CSE D3 Tau-GFP *in vitro* puis **ii)** après transplantation au sein du striatum ou de la SN de souris ayant préalablement subi une lésion nigrale à la 6-OHDA. De plus, **iii)** les effets de l'expression forcée de ce facteur de transcription sur la restauration des taux de dopamines striataux et la réduction des déficits moteurs fins ont été analysés. Les résultats des CSE LMX1A ont été comparés à ceux obtenus avec des cellules différenciées à l'identique mais n'ayant pas intégré la séquence codante de LMX1A, les CSE CONTRÔLE.

Nos résultats mettent en évidence que l'expression forcée de LMX1A induit une augmentation de précurseurs et de neurones DA du type nigral *in vitro*. Après transplantation dans la SN ou le striatum, les cellules survivent, expriment des marqueurs de neurones DA du type nigral et projettent vers le striatum. L'expression forcée de LMX1A semble augmenter la proportion de neurones DA matures après transplantation dans le striatum qui serait responsable d'une réduction des déficits moteurs induits par la 6-OHDA. Cependant, le taux de survie des cellules greffées en position striatale est plus faible en comparaison des cellules greffées en position nigrale.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Cellules souches embryonnaires de souris

Issues de la masse interne de blastocystes de souris 129S2/SvPAs, la lignée de cellules souches embryonnaires D3 (ATCC) a été utilisée lors de cette étude (Doetschman et al., 1985). Ces cellules ont été modifiées génétiquement dans le laboratoire du Docteur P.Vanderhaegen (Institut de Recherche Interdisciplinaire en Biologie Humaine et Moléculaire (IRIBHM), Bruxelles, Belgique) par l'introduction du gène de la protéine fluorescente verte (connu sous le nom de GFP), sous le contrôle du promoteur de la protéine Tau : cellules D3 Tau-GFP. Cette modification génétique permet d'obtenir des neurones matures fluorescents qui peuvent être identifiés après transplantation.

B. Intégration et surexpression de la séquence codante du gène LMX1A

Des résultats préliminaires réalisés au laboratoire ont montré que les cellules D3 Tau-GFP pouvaient se différencier *in vitro* en neurones à dopamine grâce à un protocole détaillé ultérieurement. Cependant, ces neurones DA présentaient majoritairement un sous-type ATV par la co-expression du marqueur catécholaminergique, la TH et le marqueur communément utilisé pour identifier les neurones DA de l'ATV, la Calbindine. Afin d'augmenter la proportion des neurones DA du sous-type SNpc, le facteur de transcription, LMX1A, impliqué dans la spécification des neurones DA de la plaque du plancher mésencéphalique a été utilisé (Andersson et al., 2006a).

1. Transfection plasmidique et sélection antibiotique

Pour amplifier l'expression de LMX1A dans les cellules ES D3 Tau-GFP, l'amplificateur du promoteur de la nestine et la séquence codante du gène *LMX1A* provenant du laboratoire du Professeur J.Eriksson (Karolinska Institute, Stockholm, Suède) ont été clonés dans le plasmide pSF-CMV-Ub Hygro-SV40 Ori (Oxford, Genetics). Ce plasmide circulaire contient également le promoteur d'un antibiotique l'hygromycine et ainsi que son gène de résistance (Fig. 16).

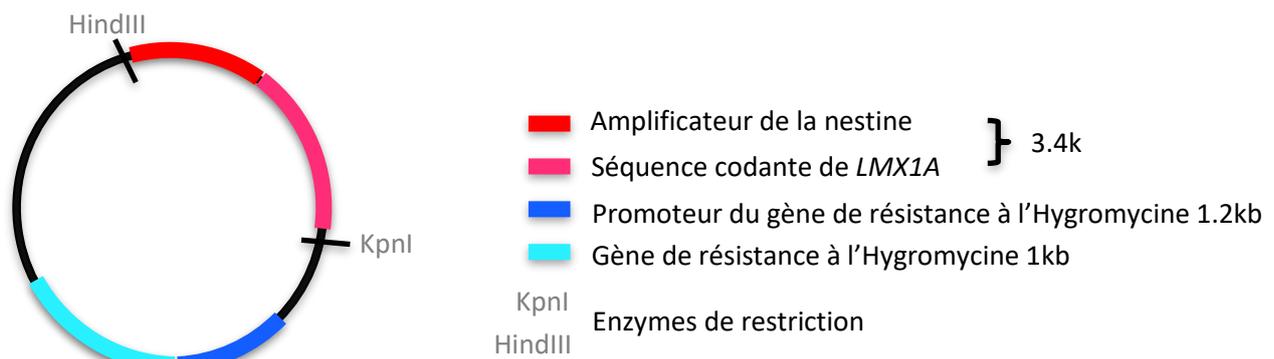


Figure 16: Schéma simplifié du plasmide pSF-CMV-Ub Hygro-SV40 Ori pSF-CMV-Ub Hygro-SV40 Ori

Le plasmide pSF-CMV-Ub Hygro-SV40 Ori pSF-CMV-Ub Hygro-SV40 Ori a été cloné avec l'amplificateur du promoteur de la nestine et la séquence codante du gène *LMX1A* afin de forcer l'expression de *LMX1A* au sein des CSE D3 Tau-GFP.

Afin de transférer les cellules, la séquence codante de *LMX1A*, la technique de nucléofection a été utilisée. Cette technique utilise un signal électrique pour créer des pores dans les membranes plasmiques et nucléaires des cellules afin de permettre le passage du plasmide à l'intérieur des cellules. Environ $2 \cdot 10^6$ cellules/mL et $5 \mu\text{g}$ de plasmide ont été mélangés dans une cuvette Amaxa (Mouse ES Cell Nucleofactor[®] Kit, Amaxa, Lonza) avec $100 \mu\text{L}$ de solution Nucleofactor[®] spécifique des CSE de souris. Les cellules et les plasmides ont ensuite été transférés grâce à l'appareil Nucleofactor[®] I (programme A-24, Amaxa, Lonza). Pour prévenir de possibles dégâts et pertes cellulaires, les cellules ont été transférées à l'aide d'une pipette en plastique (Amaxa) et mises en culture sur des boîtes gélatinées (0.1%, Sigma) dans $500 \mu\text{L}$ d'un milieu spécifique aux cellules souches embryonnaires appelé milieu KO-ES et comprenant du knock-out Dulbecco's Minimum Essential Medium (KO-DMEM, Invitrogen) complété avec du sérum de veau fœtal (SVF, 15%, Invitrogen), une solution d'acides aminés non-essentiels MEM ($100 \mu\text{M}$, Invitrogen), de la pénicilline (100U/mL , Invitrogen), de la streptomycine ($100 \mu\text{g/mL}$, Invitrogen), de la L-glutamine (2mM , Sigma) et du 2-mercaptoéthanol ($55 \mu\text{M}$, Invitrogen). Ce milieu est supplémenté en facteur inhibiteur de leucémie aussi connu sous le nom de LIF (1400U/mL , Millipore) afin de maintenir la pluripotence des cellules ES. Pour forcer l'intégration du gène *LMX1A* dans le génome des cellules et sélectionner celles ayant une expression stable du gène, un antibiotique, l'hygromycine ($400 \mu\text{g/mL}$, Invitrogen), a été ajouté au milieu de culture deux jours après la nucléofection. Parmi les colonies résistantes à l'hygromycine, 16 d'entre elles ont été sélectionnées et amplifiées.

Leur ADN a ensuite été analysé pour vérifier l'intégration de la séquence codante de LMX1A.

2. Évaluation de l'intégration de la séquence codante de LMX1A

Afin de vérifier l'intégration de la séquence codante de LMX1A, l'ADN des cellules a été extrait et une réaction en chaîne par polymérase (aussi connu sous le nom de PCR) a été réalisée. Concernant l'extraction de l'ADN, les membranes plasmiques et nucléaires des cellules ont été lysées et leurs protéines digérées en utilisant 400µL d'une solution de lyse et 25µL de protéinase K couplé à une incubation de 15 minutes à 50°C (immunoPREP DNA Mini Kit, Analytikjena). Une solution de liaison (400µL) a ensuite été utilisée pour dénaturer les protéines, spécialement celles liées à l'ADN, et également abaisser le pH afin que l'ADN puisse se lier à la colonne pour être purifié. Pour dessaler l'ADN, des solutions nettoyantes à hautes et moyennes concentrations en éthanol (500µL et 750µL) ont été utilisées. L'ADN a finalement été élué grâce à 200µL de tampon d'éluion et a été conservé à -20°C.

Pour la PCR, le tube contenant 100ng d'ADN purifié a été réchauffé à 98°C pendant 30 secondes afin de séparer les deux brins d'ADN. La température a ensuite été diminuée jusqu'à 45-72°C pendant 10 à 30 secondes pour permettre l'hybridation des amorces sens (0.5µM) et antisens (0.5µM). L'élongation de nouveaux brins a été effectuée en utilisant des désoxyribonucléotides (dNTPs, 200µM) et l'ADN polymérase Phusion® (20U/mL) à 72°C pendant 5 à 10 minutes dans un tampon High-Fidelity Phusion®. Du chlorure de magnésium (MgCl₂, 1mM) est contenu dans ce tampon pour assurer une activité optimale de la polymérase. Ce cycle a été répété 30 fois pour augmenter le nombre de nouveaux brins. Les produits PCR ont ensuite été analysés par migration sur un gel d'agarose (0,7%).

C. Production, différenciation et caractérisation des cellules souches embryonnaires de souris

1. Protocole de différenciation *in vitro*

Afin d'évaluer si l'intégration de la séquence codante de LMX1A dans les cellules souches pluripotentes participe de manière significative à leur spécification *in vitro* en

neurones à dopamine du sous-type SNpc, les CSE CONTRÔLE et les CSE LMX1A ont été différenciées suivant un protocole amélioré de différenciation en 5 étapes développé initialement par Lee et ses collègues en 2000 (Lee et al., 2000a) (Fig. 17). Ce kit spécifique utilise la formation de CE composés des 3 feuilletts de l'embryon afin de différencier des cellules souches pluripotentes en neurones DA (Human/Mouse Dopaminergic Neuron Differentiation Kit, R&D Systems).

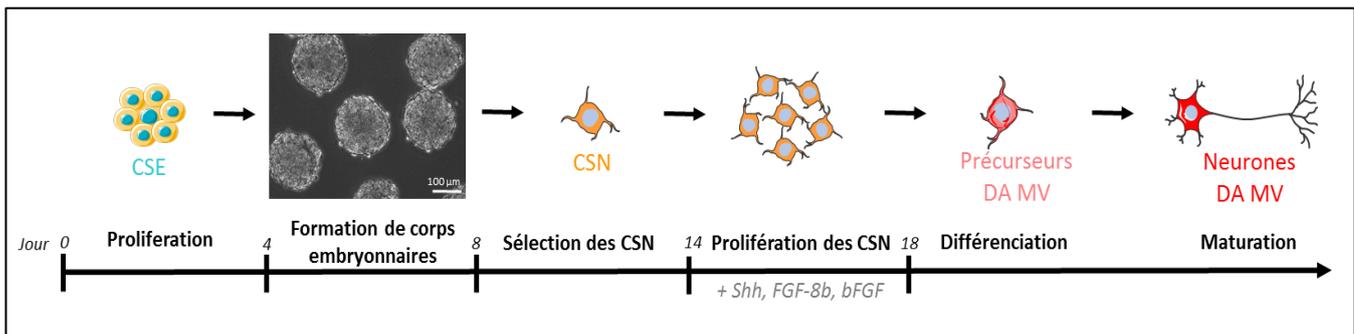


Figure 17: Représentation graphique du protocole de différenciation en cinq étapes utilisé pour différencier des cellules souches embryonnaires en neurones dopaminergique du mésencéphale ventral.

Le protocole de différenciation en corps embryonnaire est un procédé en cinq étapes qui inclut dans un premier temps l'expansion des CSE (Lee et al., 2000). Obtenues en nombre suffisant, ces cellules génèrent alors des corps embryonnaires en suspension qui sont constitués des 3 feuilletts retrouvés chez l'embryon : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme. Ces CE adhèrent ensuite dans des boîtes de culture afin de sélectionner et amplifier les cellules souches neurales (CSN) issues de la partie ectodermique de ces agrégats. L'expansion et la stabilité de ces cellules se fait grâce au FGF basique (bFGF). Lors de cette étape, des morphogènes spécifiques des neurones DA du mésencéphale ventral comme le sonic hedgehog (SHH) et le FGF-8, sont également ajoutés au milieu de culture afin d'induire la spécification des CSN. Finalement, lors du retrait de ces facteurs, la différenciation neurale se produit spontanément.

a) Étape I : Prolifération des CSE

Les CSE D3 Tau-GFP ont été ensemencées ($1.5 \times 10^5 / \text{cm}^2$) dans des boîtes de culture (100mm^2 , TPP) préalablement traitées à la gélatine (0.1%, Sigma) et contenant une couche de cellules nourricières : des fibroblastes embryonnaires de souris (Gibco), aussi connu sous le nom de MEF ($2.10^6 \text{cellules} / 100 \text{mm}^2$) et ensemencées 24h auparavant. Les cellules ont été cultivées dans le milieu KO ES supplémenté en LIF (1400U/mL, Millipore), changé tous les jours durant 4 jours.

À la fin de cette étape, la pluripotence des CSE CONTRÔLE et des CSE LMX1A a été testé par cytométrie de flux à l'aide des marqueurs de pluripotence OCT3/4 et SSEA1 (BD Mouse Pluripotent Stem Cell Transcription Factor Analysis Kit, BD Stemflow™, BD

Biosciences). Pour cela, les cellules ont été dissociées en cellules isolées de manière enzymatique grâce à la trypsine (0.5%, 5 minutes, 37°C, 5% CO₂, Invitrogen) et l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA, 0.04%, Invitrogen) dans un tampon phosphate salin (aussi connu sous le nom de PBS, 1X, Invitrogen) afin de déterminer la concentration cellulaire. Pour le marquage de SSEA1, les entre 200 000 et 500 000 cellules vivantes ont été incubées 1h à 4°C directement avec l'anticorps primaire (Acl) SSEA1 (1 : 100, monoclonal de souris, Abcam ab16285) suivi de 1h à 4°C d'incubation avec l'anticorps secondaire (AclI) anti-souris Alexa 647 (1 : 500, Invitrogen A31571) Pour le marquage d'OCT3/4, les cellules ont été fixées avec le tampon de fixation BD Cytofix buffer® (1.10⁷cellules/mL) pendant 20 minutes à température ambiante (TA) puis perméabilisées avec un tampon de perméabilisation et lavage BD Perm/Wash buffer®, 10 minutes à TA. Les cellules ont été incubées avec un anticorps primaire directement couplé OCT3/4 PerCP-Cy5.5 (20µL/100µL contenant 1.10⁶cellules) pendant 30 minutes, dans le noir, à TA. Les marquages non-spécifiques ont été éliminés à l'aide d'isotype contrôle pour chaque marqueur (Isotype contrôle Alexa Fluor® 647 et PerCP-Cy5.5, BD Biosciences) et des billes marquées pour chaque anticorps ont été utilisées pour calculer la compensation pour chaque fluorochrome. Le cytomètre analyseur FACS Verse a été utilisé pour analyser la fluorescence des cellules marquées par OCT4 ou SSEA1.

b) Étape II : Formation de corps embryonnaires

Suite à la validation de la pluripotence des cellules, des CE ont été formés pour induire la différenciation cellulaire. Pour cela les cellules ont été dissociées en cellules isolées grâce à la trypsine (0.5%, 5 minutes, 37°C, 5% de CO₂, Invitrogen) et EDTA (0.04%, Invitrogen) dans du PBS 1X (Invitrogen) et ont étéensemencées (3.5x10⁴/cm²) dans des boîtes de cultures bactériennes non-adhérentes (100*15mm, BD Falcon). Le milieu de culture KO ES a été utilisé, mais non supplémenté en LIF afin de permettre la différenciation. Le milieu a été changé au bout de 2 jours. Au quatrième jour les CE formés ont été transférés dans des boîtes de cultures adhérentes (100mm², TPP) et cultivés pendant 24h, afin de permettre leur adhésion.

c) Étape III : Sélection des cellules souches neurales

Après 24h de culture, la sélection des précurseurs neuronaux, c'est-à-dire des cellules positives pour le marqueur nestine, a été initiée en remplaçant le milieu KO ES par du milieu sans sérum ITS-Fn (DMEM/F12 (Invitrogen) sans HEPES (1:1) complétement en insuline de veau (5µg/mL, I), transferrine humaine (100µg/mL, T), sodium sélénium (S) et fibronectine (Fn)). Le milieu a été changé tous les 2 jours pendant 6 jours.

d) Étape IV : Prolifération des cellules souches neurales

Afin de que les cellules nestine⁺ prolifèrent, ces dernières ont été dissociées des corps embryonnaires adhérents par la trypsine (0.5%, 5 minutes, 37°C, 5% CO₂, Invitrogen) et de l'EDTA (0.04%, Invitrogen) etensemencées (1.10⁵cellules/20mm²) sur des lamelles en verre (Assistant 1001/1002) pré-coatées avec de la poly-L-ornithine (15µg/mL, Sigma) et de la fibronectine (1µg/mL) dans du milieu de culture N2 (constitué de DMEM/F12, insuline 5µg/mL, progestérone 6.3ng/mL, Putrescine 16µg/mL, sélénite 5.2ng/mL, 100U/mL de pénicilline, 100µg/mL de streptomycine (Invitrogen) à un pH de 7.5) complété pendant 4 jours en facteurs de croissance et morphogènes : FGF basique, SHH, FGF-8b, et AcAsc, (tous ces facteurs proviennent de chez R&D system). Le milieu a été changé toutes les 36 heures.

e) Étape V : Différenciation en neurones dopaminergiques

La différenciation des cellules souches neurales est induite par le retrait de tous les facteurs de croissance et morphogènes. Le milieu de différenciation a été constitué de milieu N2 complété avec l'AcAsc et a été changé toutes les 36 heures. Les cellules ont été cultivées jusqu'à 10 jours de différenciation lors de cette étape.

2. Caractérisation phénotypique par immunocytofluorescence

a) Anticorps utilisés

Le phénotype pluripotent des cellules a été vérifié en utilisant des Acl dirigés contre les protéines OCT4 (1 : 500, polyclonal de lapin, Abcam ab18976), SSEA1 (1 : 100, monoclonal de souris, Abcam ab16285). Un anticorps contre la GFP (1 : 1000, polyclonal

de poulet, Abcam 13970 ; 1 : 1000, polyclonal de chèvre, Abcam ab6673 ; 1 : 1000, polyclonal de lapin, Invitrogen A6455) a été utilisé pour identifier les neurones matures. Le phénotype des neurones DA a été défini en utilisant des anticorps primaires dirigés contre la TH (1 : 500, monoclonal de souris, Immunostar 22941), contre DAT (1 : 200, monoclonal de rat, Abcam ab5990). Nous avons utilisé les anticorps dirigés contre Nurr1 (1 : 500, polyclonal de lapin, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Sc-990), FoxA2 (1 : 500, monoclonal de lapin, Abcam ab108422), et contre LMX1A (1 : 500, polyclonal de lapin, Abcam ab139726) pour marquer les précurseurs DA. Un anticorps contre GIRK2 (1 : 200, polyclonal de lapin, Covalab pab0321) a été utilisé pour identifier les neurones DA de type SNpc et un anticorps contre la Calbindine (1 : 2000, polyclonal de lapin, Swant CB-38) pour distinguer les neurones DA de type ATV. Les phénotypes GABAergiques, sérotoninergiques, cholinergiques et glutamatergiques ont été analysés en utilisant des anticorps dirigés contre GABA (1 : 1000, polyclonal de lapin, Sigma A2052), la sérotonine (1 : 1000, polyclonal de chèvre, Abcam ab), la choline acétyltransférase (ChAT, 1 : 100, polyclonal de chèvre, Millipore AB144P) et contre le transporteur vésiculaire du glutamate 1 (VGLUT1, 1 : 200, monoclonal de souris, Millipore MAB5502) respectivement. Un anticorps contre la GFAP (1 : 1000, polyclonal de poulet, Abcam ab4674) a été utilisé pour identifier les astrocytes.

Les AclI anti-poulet Fluoprobes (FP) 488 (1 : 500, Interchim FPSA1110), anti-chèvre Alexa 488 (1 : 500, Invitrogen A11055), anti-lapin Alexa 488 (1 : 500, Invitrogen A21200), anti-chèvre Alexa 568 (1 : 500, Invitrogen A11057) anti-souris Alexa 568 (1 : 500, Invitrogen A10037), anti-lapin Alexa 568 (1 : 500, Invitrogen A10042), anti-rat FP-547 (1 : 500, Interchim FP-SB6120), anti-poulet Alexa 647 (1 : 500, Invitrogen A21449), anti-souris Alexa 647 (1 : 500, Invitrogen A31571), anti-lapin Alexa 647 (1 : 500, Invitrogen A31573) ont été utilisés pour la révélation des anticorps primaires.

b) Immunomarquages

Les cellules ont été fixées avec du paraformaldehyde (PFA, 4%, pH7.4, VWR) pendant 20 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées à TA dans une solution de blocage contenant du PBS 1X, Triton (X-100, 0.01%, Prolabo) et d'albumine de sérum bovin aussi connu sous le nom de BSA (3%, Santa Cruz Technologies)

afin d'assurer l'accès aux sites antigéniques et la saturation des sites antigéniques non-spécifiques. Puis, les Acl dirigés contre les protéines d'intérêts ont été incubés une nuit (ou deux pour les Acl dirigés contre DAT et GIRK2) à 4°C dans une solution de PBS 1X contenant 1% de BSA. Le jour suivant, la solution contenant les Acl a été retirée, les cellules ont été lavées par 3 fois pendant 10 minutes avec du PBS 1X et ont été incubées avec les AclII (1 : 500, dilué dans du PBS 1X et BSA 1%, 1h, TA) dirigés contre les Acl. Après 3 rinçages de 10 minutes dans du PBS 1X, un marquage du noyau a été réalisé en utilisant du 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI, 1 : 500, Sigma) dilué dans du PBS 1X et incubé pendant 15 minutes à TA. Enfin les cellules ont été rincées 3 fois, 10 minutes, avec du PBS 1X. Les lamelles ont ensuite été montées sur des lames gélatinées grâce à un milieu de montage : Slow Fade (Life technologies).

D. Lésion et transplantation de souris C57BL/6

1. Animaux

Toutes les expériences menées sur les animaux ont été conduites en conformité avec les règles établies par le Ministère Français de l'Agriculture et de la Forêt (Décret 87849) et les directives de l'Union Européenne (2010/63/EU). Les principes de réduction du nombre d'animaux utilisés et de minimisation des souffrances ont été respectés. Les animaux utilisés pour cette étude sont des souris femelles C57BL/6 âgées de 4 mois, pesant environ 25g (R. Janvier Le Genest-Saint Isles, France), au nombre de soixante. Ces souris ont été logées seules, dans des cages standards ventilées à $21 \pm 1^\circ\text{C}$, sous un cycle jour/nuit de 12 heures, avec accès *ad libitum* à la nourriture de souris et à l'eau potable.

2. Lésion nigrale à la 6-OHDA

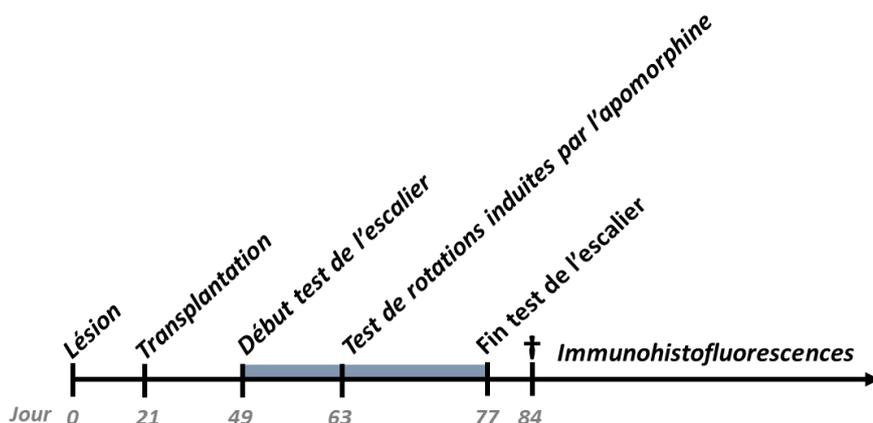


Figure 18: Conception expérimentale des expériences de lésions et transplantations réalisées sur les souris C57BL/6.

Les souris C57BL/6 ont subi une lésion de leur SN par l'injection de 6-OHDA. Trois semaines après la chirurgie lésionnelle, les souris ont été transplantées avec des cellules dérivées de CSE CONTRÔLE ou des CSE LMX1A après 4 jours de différenciation *in vitro* au sein du striatum ($n=9$ pour chaque condition cellulaire) ou de la SN ($n=10$ pour chaque condition cellulaire). Quatre semaines post-transplantation, des groupes de souris contrôles ($n=8$), de souris lésées uniquement ($n=8$), et des souris transplantées ont commencé le test de l'escalier afin de mesurer les capacités d'appréhension des membres antérieurs des souris une fois par semaine pendant cinq semaines (barre horizontale grise). À la sixième semaine post-greffe, les souris ont également subi un test de rotations induites par l'apomorphine afin d'étudier les taux de dopamine striataux des souris. Finalement, neuf semaines après les transplantations, les souris ont été perfusées et des immunohistofluorescences ont été réalisées sur les coupes des cerveaux.

Pour évaluer le potentiel thérapeutique des précurseurs DA dérivés des CSE CONTRÔLE et des CSE LMX1A, nous avons utilisé le modèle murin de la MP communément employé au laboratoire et qui a été validé sur le plan neuroanatomique et fonctionnelle. Ce modèle consiste à injecter au niveau de la SN de la 6-OHDA (Fig. 18) qui a été démontrée comme induisant une perte de neurones DA au niveau de la SNpc et de leurs projections striatales comprise entre 80 et 95%. (Gaillard et al., 2009 ; Droguerre et al.,). Ainsi, 53 souris adultes de 4 mois ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine (Imalgène 500, 100mg/kg de souris, Merial) et Xylasine (Rompun 2%, 10mg/kg de souris, Bayer), dilués dans du chlorure de sodium stérile (NaCl, 0.9%, Aguettant), à hauteur de 100 μ L/10g de poids vif de souris. Après avoir été placées dans un appareil stéréotaxique, chaque animal a reçu une seule injection de 1 μ L de 6-OHDA (8 μ g/ μ L, Sigma) dissoute dans une solution stérile de NaCl (0.9%) contenant 0.1% d'AcAsc afin d'éviter une oxydation. Ce volume a été injecté dans la substance noire gauche des

animaux (coordonnées AP : -3.2 mm par rapport au bregma, L : 1.4 mm par rapport à la ligne médiane et P : 3.8 mm par rapport à la dure-mère, selon un atlas stéréotaxique de la souris (Franklin and Paxinos, 2008)). L'injection a été effectuée manuellement à faible vitesse (0.5µL/minute) en utilisant une seringue Hamilton de 5µL. L'aiguille a été maintenue en place pendant cinq minutes suite à l'injection, afin de réduire le reflux dans le tractus d'injection et de faciliter une bonne diffusion de la 6-OHDA. À l'issue de la chirurgie, la plaie crâniale des souris a été nettoyée et refermée à l'aide d'agrafes et les animaux ont été placés sous lampe chauffante jusqu'à leur réveil. De l'eau chocolatée a été donnée aux souris, maximum une semaine après l'opération, afin de les aider à récupérer de la chirurgie. Dès le lendemain de la lésion, des rotations spontanées ont été observées chez tous les animaux lésés.

3. Transplantation nigrale ou striatale

Comme décrit dans l'introduction, les cellules souches pluripotentes utilisées dans cette étude peuvent induire la formation de tératomes. Il est donc nécessaire, pour toutes thérapies de remplacement cellulaire, d'utiliser des cellules souches suffisamment induites dans leur voie de différenciation afin que les cellules n'expriment plus les marqueurs de pluripotence comme OCT4 et SSEA1. À *contrario*, des cellules ayant atteint leur maturité neuronale ont un risque plus élevé de dégénérer lors de la greffe, à cause de la section des projections dendritiques et axonales. Par conséquent, la clé d'une transplantation neuronale réussie est d'obtenir un maximum de cellules suffisamment induites dans la différenciation mais non-matures. Des cellules immatures post-mitotiques comme les précurseurs DA des futurs neurones A9 sont la population cellulaire que nous avons jugée la plus adéquat pour une thérapie de remplacement cellulaire. Pour obtenir cette population, les cellules dérivées des CSE CONTRÔLE et des CSE LMX1A *in vitro* après quatre jours de différenciation (J4) ont été utilisées pour la transplantation.

Avant la transplantation, un test de mycoplasme a été réalisée afin d'éliminer tout risque de présence de parasites cellulaires. Ce test étant négatif, le tapis de cellules adhérentes des boîtes de cultures a été détaché de manière enzymatique grâce à la trypsine (0.025%) et EDTA (0.04%) dans du PBS 1X pendant 3 minutes à 37°C et 5% de CO₂. Cette séparation enzymatique a été arrêtée à l'aide de milieu de culture KO-ES. Un

maximum d'efforts a été réalisé pour éviter de dissocier les cellules lors de leur collecte afin de conserver un tapis de cellules avec une conformation 3D proche, autant que possible, d'une structure tissulaire. Afin de retirer la trypsine-EDTA, les cellules ont été centrifugées (3 minutes, 220g, TA) puis resuspendues à hauteur de 100 000 cellules/ μ L, dans du milieu de culture contenant du N2 et de l'AcAsc. Les cellules ont été conservées dans de la glace et protégées de la lumière jusqu'au moment de leur transplantation.

Pour la transplantation (Fig. 18), les animaux lésés à la 6-OHDA au niveau de la SN, 3 semaines auparavant, ont été anesthésiés puis placés sur un appareil stéréotaxique comme décrit pour la lésion nigral. Environ 1.5 μ L de milieu contenant environ 150.000 cellules ont été transplantées soit dans la SN (n=10 pour les deux conditions cellulaires), soit dans le striatum (n=9 pour les deux conditions cellulaires), à l'aide d'une seringue Hamilton de 5 μ L. Les coordonnées stéréotaxiques utilisées pour la transplantation au niveau de la SN ont été les mêmes que celles définies lors de la lésion DA nigrale. Quant aux transplantations intra-striatales, elles ont été réalisées aux coordonnées suivantes : Antéro-postériorité : 0.5mm ; Latéralité : 2mm par rapport au bregma et de profondeur 2.8mm par rapport à la surface du cerveau. Cinq minutes après l'injection, la seringue a été retirée lentement afin de minimiser le reflux de la suspension cellulaire. À la suite de la transplantation, les animaux ont été placés sous surveillance à l'animalerie pour un rétablissement complet avant d'entamer, au cours de la quatrième semaine post-transplantation, les tests de comportements.

E. Analyses fonctionnelles et anatomiques

1. Tests de comportement

Afin d'évaluer la récupération fonctionnelle des souris, deux tests de comportements ont été effectués sur des groupes de souris contrôles (n=8), de souris lésées (n=8), de souris lésées puis transplantées avec les CSE CONTRÔLE dans le striatum (n=9) ou la substance noire (n=10), de souris lésées puis transplantées avec les CSE LMX1a dans le striatum (n=9) ou la substance noire (n=10) afin de mesurer le degré de dénervation DA striatal ainsi que les compétences motrices fines des souris. Cependant, seules les souris ayant révélé ultérieurement une survie de greffon, au sein du striatum

ou de la SN 9 semaines après la greffe, ont été incluses dans les résultats des tests de comportement présentés ci-après. Ceci a ainsi réduit le nombre de souris transplantées avec des CSE CONTRÔLE à 3 et 9 pour les greffes intra-striatales et intra-nigrales respectivement. Pour les CSE LMX1A, 4 souris transplantées au sein du striatum et 7 souris dans la SN ont présenté un transplant. De plus, il est à noter que, suite à la perte de 15 souris lésées sur 53 après la lésion à la 6-OHDA et dans le but de transplanter un nombre plus important de souris, le groupe des souris lésées initialement prévu a été utilisé pour les transplantations et les résultats comportementaux présentés dans cette étude sont issus d'un groupe de souris lésées et testés ultérieurement. Cependant, l'analyse anatomique de leur lésion a révélé une perte des cellules catécholaminergiques TH⁺ et des projections DA nigrales identiques à celles des groupes de souris lésées puis transplantées en nigral ou striatal avec les CSE CONTRÔLE ou les CSE LMX1A. Ces expériences ont été réalisées par une ancienne thésarde du laboratoire M. Droguerre.

a) Mesure des taux de dopamine striataux : test de rotations induites par l'apomorphine

Afin d'examiner la capacité des cellules greffées à réduire les déficits moteurs induits par la 6-OHDA, le test de rotations induites par l'apomorphine a été utilisé pour mesurer les taux de dopamine au niveau du striatum, 6 semaines après la transplantation (Fig. 18). Pour cela, les rotations (360°) antihoraires par rapport au côté lésé ont été analysées suite à l'injection en sous-cutané d'une solution d'apomorphine (0.5mg/kg, Sigma) dissoute dans du NaCl (0.9%) et contenant un anti-oxydant la vitamine C (20mg/kg, Sigma). Tout de suite après l'injection, les animaux ont été placés dans un bol métallique de 40 cm de diamètre et fixé à un harnais au niveau du dos de l'animal (Fig. 19). Ce harnais, maintenu par des fils plastiques, est relié à un câble métallique souple connecté à un compteur, le rotomètre, qui permet l'enregistrement des rotations horaires et anti-horaires par une interface informatique, selon la technique mise au point par les Dr. Ungerstedt et Arbuthnott en 1970 (Ungerstedt and Arbuthnott, 1970). Les rotations ont été enregistrées pendant des sessions de 60 minutes. Les souris présentant un minimum de quatre tours par minute contralatéraux au côté de la lésion ont été analysées.

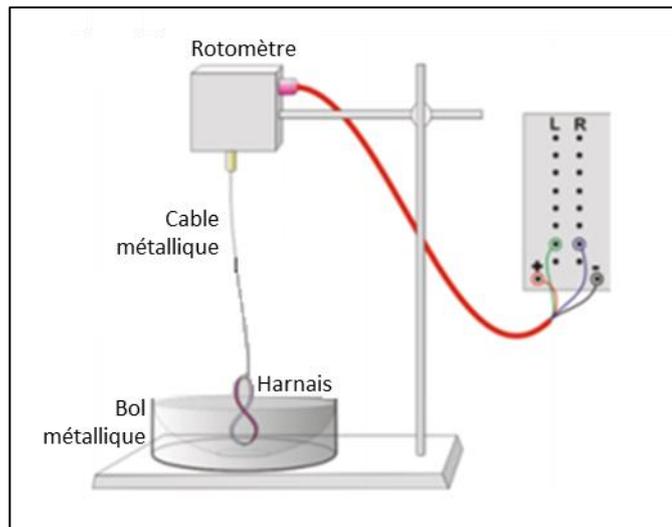


Figure 19 : Représentation graphique de l'équipement utilisé lors du test de rotations induites par l'apomorphine.

L : gauche (left) ; R : droit (right). Modifiée à partir de Lane and Dunnett, (2011).

b) Mesure de l'appréhension des membres antérieurs : test de l'escalier

Le test de l'escalier a ensuite été utilisé afin d'analyser les compétences de motricité fine des animaux en évaluant leur capacité d'appréhension de leurs pattes antérieures après la transplantation. Pour cela, chaque souris a été placée pendant 1h dans un dispositif en plexiglas composé de deux compartiments dont l'un contient un double escalier avec huit marches de chaque côté (Campden Instruments, Loughborough, UK) (Fig. 20) (Baird et al., 2001; Montoya et al., 1991). Des pellets de nourriture (20mg, BioServe, Frenchtown, NJ) ont été disposées sur chacune de ces marches. Chaque escalier a été sous la surveillance d'une caméra miniature monochrome (25images/seconde, résolution 500x582, ViewPoint Life Sciences, Lyon, France). Après avoir habitué les animaux aux pellets et au dispositif, les valeurs basales de chaque animal ont été mesurées, avant la lésion, suite à l'analyse d'1 session par semaine pendant 3 semaines. Leur capacité de préhension a, par la suite, été analysée entre 4 et 8 semaines post-transplantation, en fonction du pourcentage du nombre de pellets collectées en controlatéral par rapport au côté ipsilatéral.

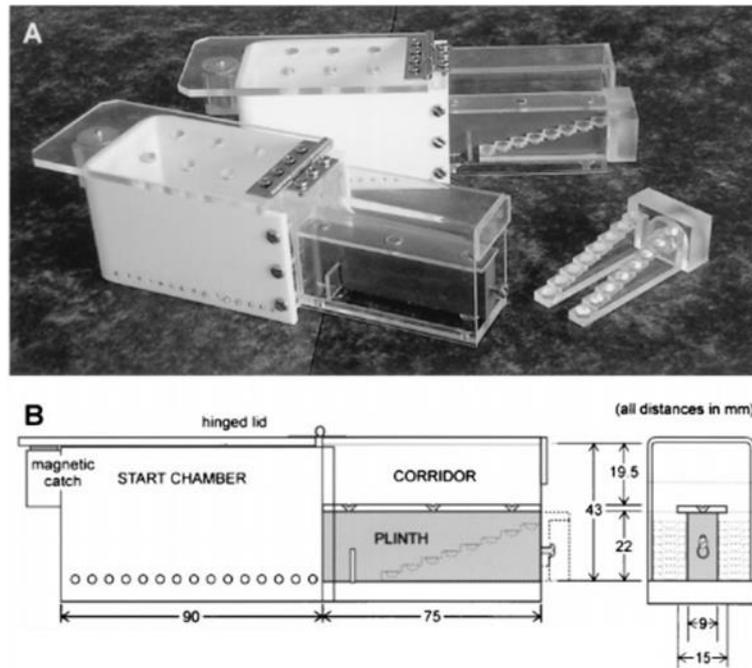


Figure 20: Photographie (A) et représentation graphique (B) du dispositif utilisé pour mesurer les capacités de préhension des pattes antérieures des souris : test de l'escalier.

À partir de (Baird et al., 2001).

2. Caractérisation phénotypique du greffon et de ses projections

a) Immunohistochimies

Afin de récupérer leur cerveau, les souris ont subi une anesthésie létale de Xylazine (20 mg/kg ; Rompun 2%) et Kétamine (100 mg/kg ; Imalgène 500) dissous dans du NaCl (0,9%) par injection intra-péritonéale suivie d'une perfusion intra-cardiale de NaCl (100mL, 0.9%, 37°C) puis de PFA (250mL, 4%, 4°C dans du tampon phosphate (PB) 0.1M). Après récupération des cerveaux, ceux-ci ont été post-fixés dans du PFA (4%, 4°C dans PB 0.1M) sur la nuit puis cryoprotégés pendant 24 heures dans du saccharose (30%, H₂O, VWR) avant de les couper au microtome (Leica RM 2145) en 6 séries de coupes coronales ou horizontales de 40µm.

Les coupes ont ensuite été rincées 3 fois dans du tampon tris salin (TBS, 0.05 M, pH :7.6) et les sites antigéniques non-spécifiques ont été bloqués pendant 90 minutes à l'aide d'une solution de blocage (TBS 0.05 M, pH :7.6, BSA 3%, Triton X-100 0.3%), sous agitation, à TA. Des Acl ont ensuite été ajoutés à la solution de blocage pendant 1 (ou 2 nuits pour les Acl GIRK2 et DAT) à 4°C sous agitation. Des Acl identiques à ceux utilisés en

immunocytofluorescences ont été utilisés en immunohistochimie. Les coupes ont ensuite été rincées 3 fois au TBS (0.05 M, pH : 7.6) puis mises en présence d'AcII dans la solution de blocage pendant 60 minutes à TA et sous agitation. Après avoir rincé les AcII, les coupes ont été montées sur des lames gélatinées puis couvertes avec du milieu de montage (DePeX, VWR).

F. Analyses de données et quantifications

Afin d'analyser nos cellules immunomarquées *in vitro*, 3 à 6 photos de chaque lamelle ont été prises à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Microscope Axio Zeiss Imager.M2) à l'objectif 20, 40 ou 63. Une quantification manuelle a été effectuée pour les différents marqueurs utilisés à l'aide du logiciel AxioVision.

Les coupes de cerveaux immunomarquées ont été analysées et photographiées à l'aide du même microscope à épifluorescence cité au paragraphe précédent ou à l'aide d'un microscope confocal (Bio-Rad MRC 1024) de la plateforme ImageUP de Poitiers. L'analyse du phénotype des cellules dérivées des CSE CONTRÔLE et des CSE LMX1A différenciées *in vivo* pour chaque transplant a été estimée sur 1 série de coupes sur 6 puis, le nombre total de cellules immunomarquées a été extrapolé selon la formule d'Abercrombie (Abercrombie, 1946) :

$$P = \frac{1}{f} \times \frac{AM}{(D + M)}$$

Avec P : la correction du nombre des cellules immunomarquées présentes dans le greffon ; f : la fréquence de sélection des sections ; A : le nombre de cellules positives pour un marquage ; M : l'épaisseur de la section ; D : le diamètre moyen du neurone.

G. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel Graphpad Prism V7.0. Tous les résultats présentés dans cette thèse correspondent à la moyenne des échantillons accompagnée de l'erreur standard moyenne (sem) et une valeur du P inférieure à 0.05 a été acceptée comme étant statistiquement significatif. Pour les résultats obtenus *in vitro*, suivant ou non une loi normale, les tests de Student non apparié

ou de Mann-Whitney ont été réalisés. Concernant les analyses comportementales ou anatomiques, le nombre restreint de souris présentant un greffon au sein du striatum neuf semaines après les greffes ont entravé l'utilisation de tests statistiques pour valider nos résultats.

RÉSULTATS

PARTIE I: Obtention de neurones dopaminergiques de type nigral à partir de cellules souches embryonnaires murines.

Des résultats préliminaires, réalisés par un ancien post-doctorant, B. Saha, au sein du laboratoire, ont permis de démontrer qu'il était possible d'obtenir des neurones DA à partir des cellules souches embryonnaires de souris D3 Tau-GFP en utilisant le protocole de différenciation modifié en cinq étapes, développé initialement par Lee et collaborateurs en 2000 (Lee et al., 2000b). Cependant, la majorité des neurones DA obtenus étaient du sous-type ATV. En effet, ces neurones co-expriment la TH et la calbindine, un marqueur de l'ATV (Fig. 21).

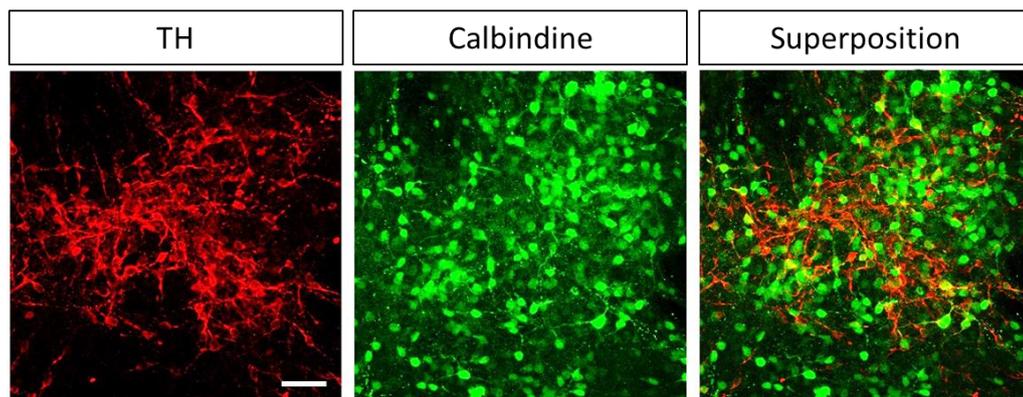


Figure 21: Photomicrographies à épifluorescence de cellules différenciées in vitro présentant un phénotype des neurones dopaminergiques du sous-type ATV.

Photomicrographies à épifluorescence de cellules différenciées in vitro co-exprimant la TH (rouge, image gauche) et la Calbindine (vert, image du milieu). La superposition des deux marquages est représentée sur l'image de droite. Échelle : 50 μ m.

Par conséquent, le premier objectif de ma thèse a été d'augmenter la proportion des neurones DA du sous-type nigral. Pour cela, LMX1A, un facteur de transcription a été utilisé ayant auparavant démontré sa participation à la spécification des neurones DA de la plaque du plancher mésencéphalique lors du développement embryonnaire et sa capacité à augmenter le nombre de neurones DA du MV *in vitro* après intégration génomique (Friling et al., 2009).

A. Intégration de la séquence codante de LMX1A

Afin d'augmenter le nombre de neurones DA et notamment ceux de type nigral, les cellules souches embryonnaires D3 Tau-GFP ont été transfectées, par électroporation, avec un plasmide contenant la séquence codante du gène *LMX1A* sous le contrôle d'un amplificateur du promoteur de la nestine, une protéine filamentaire exprimée dans les cellules souches neurales. Suite à la transfection, dix-sept colonies ont été récoltées et leur génome a été analysé à l'aide de PCR (Fig. 22). Au sein de ces dix-sept colonies analysées, huit d'entre elles, soit 47%, ont intégré la séquence codante de LMX1A et de l'amplificateur du promoteur de la nestine plasmidique dans leur génome (colonies 2, 4, 5, 6, 9, 15, 16 et 17) (Fig. 22).

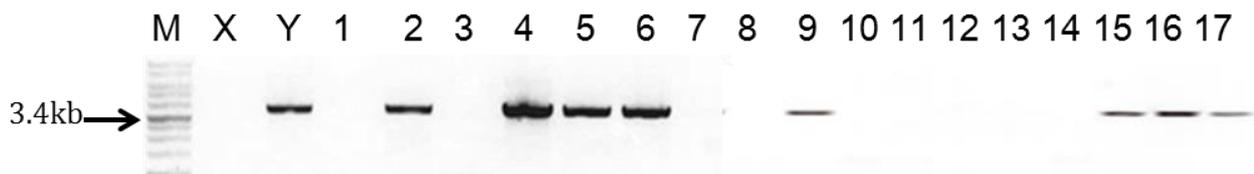


Figure 22: Photographie du gel de PCR montrant l'intégration de la séquence codante de LMX1A dans les cellules D3 Tau-GFP.

Photographie du gel de PCR révélant l'intégration de la séquence codante de LMX1A et de l'amplificateur du promoteur de la nestine (3.4kb) dans le génome des huit colonies cellulaires (2,4,5,6,9,15,16 et 17) sur dix-sept (1-17) récoltées après électroporation et prolifération des cellules. X : H₂O ; Y : plasmide seul ; M : marqueur de taille.

Parmi les huit colonies ayant intégré la séquence plasmidique, les deux colonies avec ayant la meilleure vitesse de prolifération et un minimum de cellules différenciées ont été choisies afin d'être différenciées *in vitro*. Cependant, dans ces travaux, seuls les résultats de la colonie 6 sont présentés, dénommée, ici, CSE LMX1A. La suite de ce manuscrit s'attache à décrire la caractérisation cytologique *in vitro* des CSE LMX1A et des CSE non-transfectées appelées, ici, CSE CONTRÔLE et ce, tout au long du protocole de différenciation.

B. Analyses phénotypiques des CSE CONTRÔLE et CSE LMX1A

Aux différents stades de différenciation, le phénotype des cellules CSE CONTRÔLE et CSE LMX1A, générées *in vitro*, a été analysé par immunofluorescences. Dans un premier temps, avant toute différenciation neuronale, le phénotype pluripotent des deux sources de cellules a été vérifié. Puis, suite à l'obtention de CE, le phénotype neural des cellules issues de ces amas cellulaires a été étudié. Le phénotype des cellules différenciées et notamment les phénotypes DA du MV, a été, par la suite, analysé afin d'étudier l'impact de l'intégration de la séquence codante de LMX1A sur la différenciation neuronale. Pour finir, la perte de pluripotence et la proportion maximale de cellules précurseurs DA du MV ont été étudiées dans le but de déterminer les meilleures conditions cellulaires possibles pour la transplantation des CSE CONTRÔLE et CSE LMX1A au sein du striatum ou la substance noire de souris lésées à la 6-OHDA.

1. Validation de la pluripotence des cellules souches embryonnaires

Avant de débiter le protocole de différenciation, le phénotype pluripotent des cellules CSE CONTRÔLE et CSE LMX1A a été étudié. Pour cela, des immunofluorescences et une cytométrie de flux ont été réalisées à l'aide d'anticorps dirigés contre des marqueurs de pluripotence tels que OCT4 et SSEA1. Nos résultats montrent que les deux sources de cellules ont proliféré en cluster, une caractéristique des cellules ES, et ont exprimé les deux marqueurs de pluripotence testés démontrant ainsi le caractère pluripotent des cellules que ce soit pour les CSE CONTRÔLE (OCT4 : 56.6 % \pm 6.1, n=3 ; SSEA1 : 85.2 % \pm 2.7, n=3) ou les CSE LMX1A (OCT4 : 66.4 % \pm 2.3, n=3 ; SSEA1 : 76.6 % \pm 4.2, n=3) (Fig. 23).

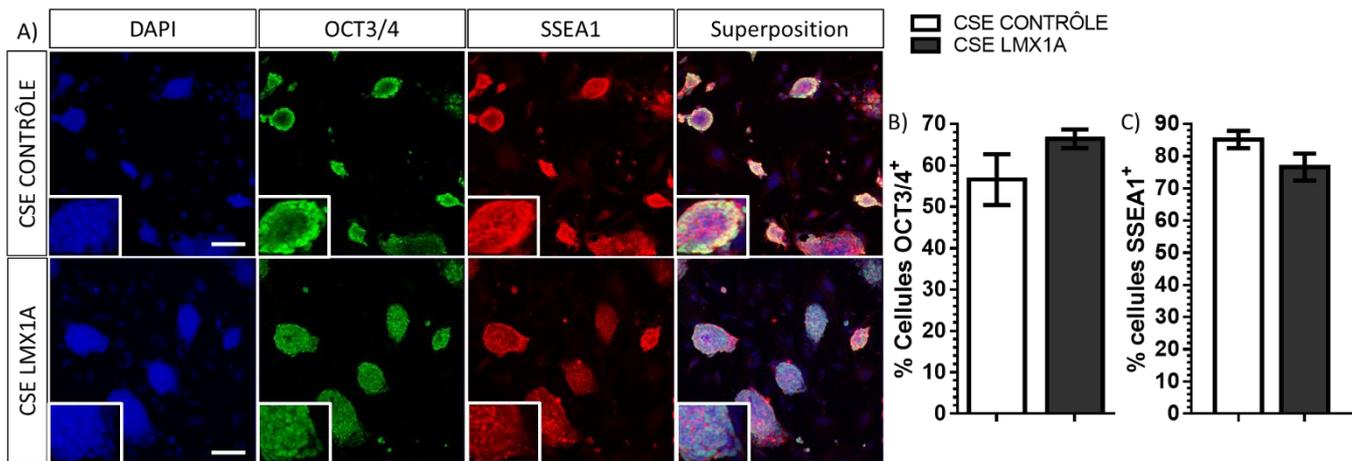


Figure 23: Photomicrographies à épifluorescence des cellules souches embryonnaires en prolifération in vitro et présentant un phénotype de pluripotence.

Photomicrographies à épifluorescence de cellules souches embryonnaires in vitro illustrant l'expression de OCT4 (vert) et SSEA1 (rouge). La ligne du haut montre les images des CSE CONTRÔLE en prolifération au stade I du protocole de différenciation tandis que la ligne du bas expose les images des CSE LMX1A. La superposition des deux marquages est représentée dans la colonne de droite alors que le marquage des noyaux est illustré dans la colonne de gauche. Un zoom de chaque photomicrographie est présenté dans le cadre blanc en bas à gauche. Echelle : 100 μ m. Les données des histogrammes indiquent le pourcentage moyen de cellules OCT4⁺ (B, n=3 pour les deux conditions cellulaires) et SSEA1⁺ (C, n=3 pour les deux conditions cellulaires) après analyse par cytométrie de flux, pour les cellules CSE CONTRÔLE (blanc) et CSE LMX1A (gris). Les barres d'erreurs représentent \pm sem.

Ainsi, après avoir validé le caractère pluripotent des cellules et obtenu un nombre suffisamment important de cellules, la différenciation neurale des CSE CONTRÔLE et CSE LMX1A a été initiée.

2. Caractérisation du phénotype des cellules souches neurales dérivées des cellules souches embryonnaires

Le premier objectif d'un protocole de différenciation neuronal est d'obtenir un nombre important de CSN dans le but d'optimiser la génération de neurones matures. Dans cette étude, la différenciation neurale des CSE a été induite par la formation de CE et plus précisément au niveau de l'ectoderme. Après sélection des cellules ectodermiques, le phénotype neural a été caractérisé à l'aide d'un anticorps dirigé contre un marqueur filamentaire des CSN, la nestine et, ce, à la fin de l'étape de prolifération précédant celle de différenciation neuronale. Les résultats mettent en évidence la présence de cellules souches neurales et, ce, de façon majoritaire pour les CSE CONTRÔLE ainsi que les CSE LMX1A (Fig. 24). En effet, respectivement 92.7 % \pm 2.5 (n=5) et 94.8 % \pm

2.4 (n=5) des cellules ont exprimé la nestine. À ce stade du protocole, peu de cellules se sont spontanément différenciées en neurones après analyse du marqueur neuronal Tau-GFP : $1.4\% \pm 0.2$ pour les CSE CONTRÔLE (n=11) et $1.9\% \pm 0.3$ pour les CSE LMX1A (n=11). Aucune différence significative entre les deux sources de cellules n'a été démontré pour le pourcentage de cellules nestine⁺ (Fig. 24A, test de Mann-Whitney : $p > 0.05$) ou pour le pourcentage de cellules Tau-GFP⁺ par rapport au DAPI (Fig. 24B, test de Student non-apparié : $p > 0.05$). Par conséquent, à partir des CE, il a été possible d'obtenir un nombre important de CSN, avec un minimum de cellules ayant d'ores et déjà initiée leur différenciation. De plus, l'intégration de la séquence codante de LMX1A n'a pas induit de différence significative dans l'obtention des CSN ou leur différenciation.

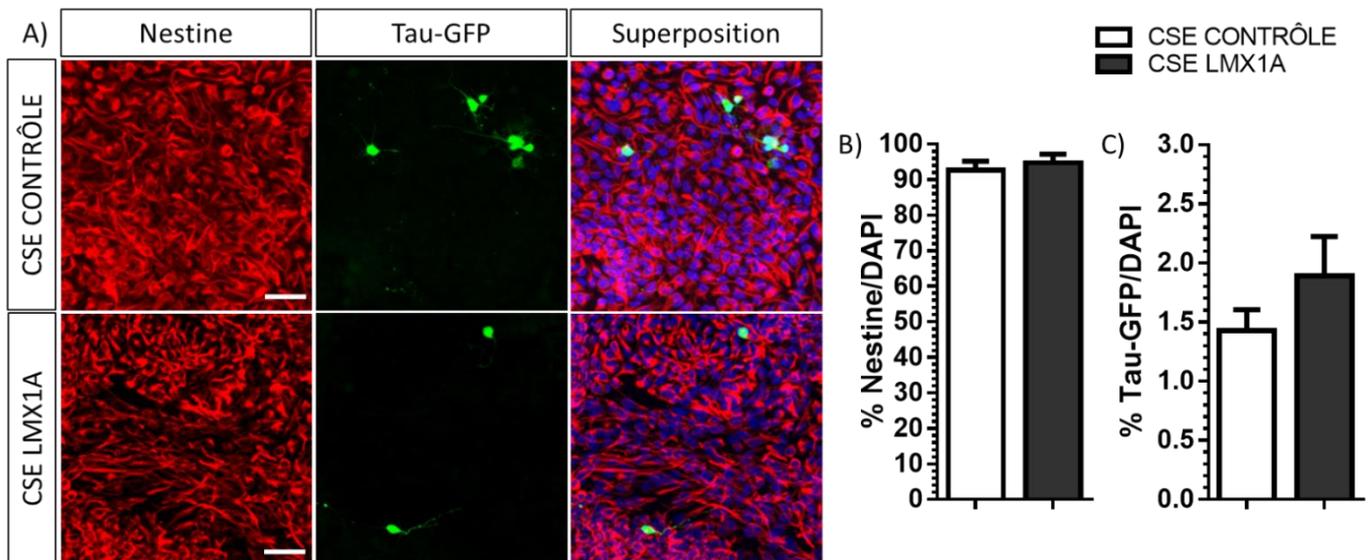


Figure 24: La majorité des cellules issues de la couche ectodermique des CE présente un phénotype neural in vitro.

À la fin du stade de prolifération des cellules issues des CE (Stade IV), les CSE CONTRÔLE, comme les CSE LMX1A, expriment le marqueur neural nestine en grande majorité (>90%) (A rouge, B) et un faible pourcentage du marqueur neuronal Tau-GFP⁺ (<3%) (A vert, C). (A) Les photomicrographies à épifluorescence à grossissement x40 (A) de la ligne du haut montre les images des CSE CONTRÔLE tandis que la ligne du bas expose celles des CSE LMX1A. La superposition des deux marquages est représentée dans la colonne de droite. Echelle : 50 μ m. Les données des histogrammes indiquent le pourcentage moyen de cellules nestine positives (B, n=5 pour les deux conditions cellulaires) et Tau-GFP⁺ (C, n=11 pour les deux conditions cellulaires) par rapport au DAPI pour les cellules CSE CONTRÔLE (blanc) et CSE LMX1A (gris). Les barres d'erreurs représentent \pm sem. B : Test de Mann-Whitney, $p > 0.05$. C : Test de Student non-apparié, $p > 0.05$.

Lors de la prolifération des CSN, les morphogènes SHH et FGF-8 présents dans le milieu de culture ont activé des voies de signalisation afin d'initier spécifiquement le développement de précurseurs DA du MV. Lors du retrait de ces facteurs, la différenciation neurale s'est effectuée spontanément *in vitro* et le phénotype des cellules différenciées a été analysé.

3. Caractérisation du phénotype des cellules différenciées dérivées de cellules souches embryonnaires murines

Suite à la différenciation des CSN, nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, à la proportion de neurones générés *in vitro* (Fig. 25). Ainsi, après dix jours de différenciation (J10) *in vitro*, $41.7 \% \pm 2.2$ (Fig. 25B, n=21) et $34.8 \% \pm 2.6$ (Fig. 25B, n=21) des CSE CONTRÔLE et CSE LMX1A respectivement expriment le marqueur neuronal Tau-GFP en moyenne. Aucune différence significative n'a été observée entre les CSE CONTRÔLE et les CSE LMX1A bien qu'il y ait une tendance de diminution du pourcentage moyen des cellules Tau-GFP⁺ pour les CSE LMX1A par rapport aux CSE CONTRÔLE (Test de Student non apparié, $p=0.0706$). Ceci démontrant ainsi que l'intégration de LMX1A ne semble pas influencer la différenciation des cellules neuronales à J10 *in vitro*.

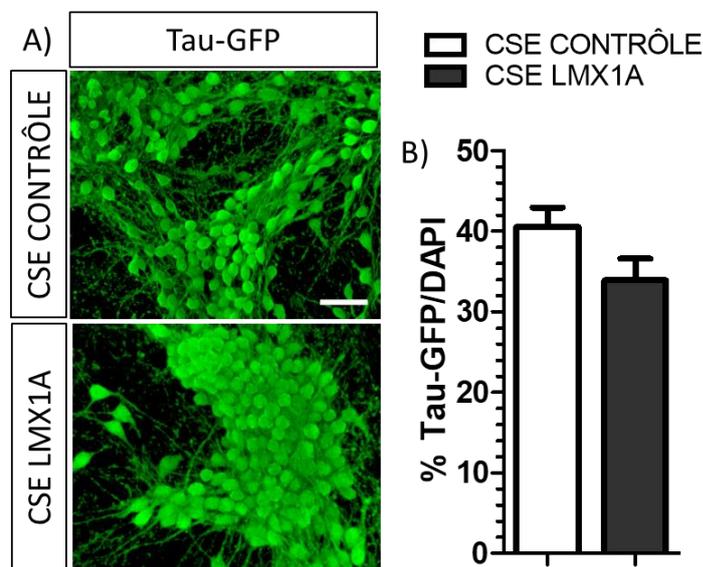


Figure 25: Proportion de cellules Tau-GFP⁺ identiques pour les CSE CONTRÔLE et CSE LMX1A après dix jours de différenciation *in vitro*.

(A) Photomicrographies à épifluorescence représentant les CSN des CSE CONTRÔLE (haut) et CSE LMX1A (bas) différenciés en neurones exprimant Tau-GFP après dix jours de différenciation *in vitro*. Echelle : 50 μ m. (B) Les données de l'histogramme indiquent le pourcentage moyen des cellules Tau-GFP⁺ par rapport au DAPI pour les cellules CSE CONTRÔLE (blanc) et CSE LMX1A (gris) (n=21 pour les deux conditions cellulaires). Les barres d'erreurs représentent \pm sem. B : Test de Student non-apparié, $p=0.0706$.

Le phénotype de ces neurones a ensuite été analysé et notamment le phénotype DA du type MV. Pour cela, des immunocytofluorescences ont été réalisées à l'aide des marqueurs dopaminergiques TH et DAT ainsi que ceux communément utilisés pour étudier les phénotypes DA de la SNpc et de l'ATV avec les marqueurs GIRK2 et Calbindine respectivement. Ainsi, parmi les cellules Tau-GFP, $13.2 \% \pm 1.9$ (n=14) et $30.1 \% \pm 4.4$ (n=14) des CSE CONTRÔLE et CSE LMX1A, respectivement, présentent un marquage TH⁺ au 10^{ème} de différenciation (Fig. 26) avec respectivement $8.7 \% \pm 2.7$ (n=6) et $28.0 \% \pm 7.9$ (n=6) de ces neurones TH⁺ co-exprimant GIRK2 (Fig. 27A,D). Ainsi grâce au protocole de différenciation des CE, il est possible d'obtenir des neurones à dopamine du sous-type nigral à dix jours après la différenciation et d'accroître 2.2 fois plus la proportion des cellules TH⁺ (Test de Mann-Whitney, $p < 0.01$) et d'augmenter notamment de 3.2 fois la proportion de cellules co-exprimant TH et GIRK2 (Test de Student non apparié ; $p < 0.05$) par l'intégration de la séquence codante du gène LMX1A au sein du génome des cellules.

Concernant la proportion de neurones DA du sous-type ATV, $46.1 \% \pm 5.7$ (n=5) des CSE CONTRÔLE et $43.7 \% \pm 5.3$ (n=5) des CSE LMX1A co-expriment TH et Calbindine (Fig. 27B,E). Aucune différence significative entre les deux types cellulaires n'a été révélée à J10 (Test de Student non apparié ; $p > 0.05$). Par conséquent, l'intégration de la séquence codante de LMX1A ne semble pas modifier la proportion de cellules TH co-exprimant la Calbindine, représentative du sous-type ATV qui reste cependant majoritaire parmi les cellules exprimant la TH.

Il en va de même pour les cellules co-exprimant TH et DAT, un marqueur des neurones DA matures, qui ne semble pas présenter de différence entre les deux types de cellules avec respectivement $20.1 \% \pm 6.0$ (n=3) pour les CSE CONTRÔLE et $18.7 \% \pm 6.1$ (n=3) pour les CSE LMX1A (Fig. 27C,F). Ainsi, le modeste pourcentage de neurones à dopamine matures présents *in vitro* après dix jours de différenciation ne semble pas être sous l'influence de la séquence codante du gène *LMX1A*.

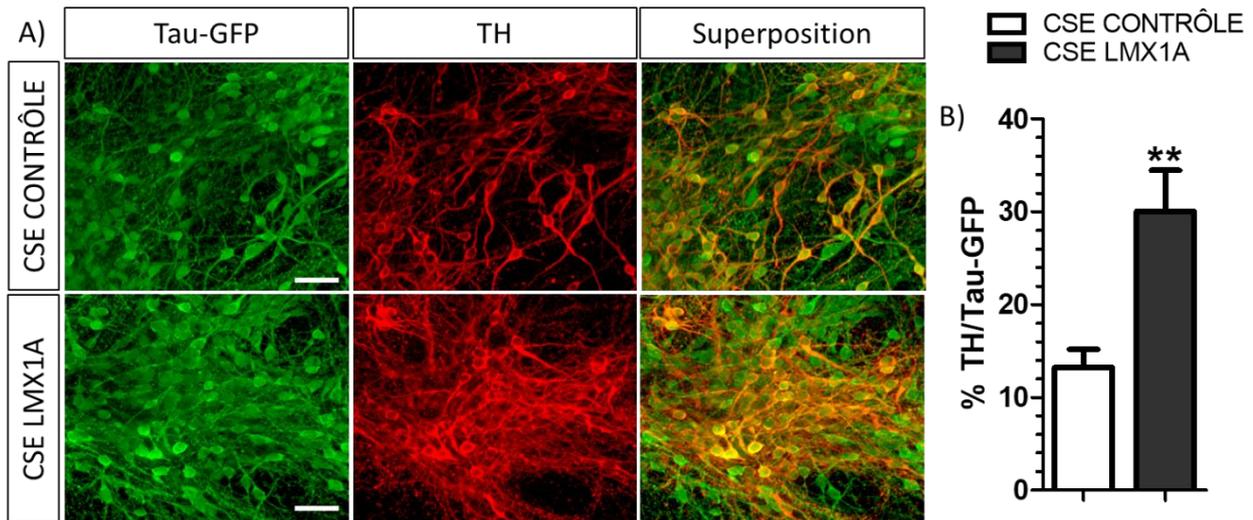


Figure 26: L'intégration de la séquence codante de LMX1A augmente la proportion de cellules TH⁺ dix jours après différenciation in vitro.

(A) Les photomicrographies à épifluorescence représentent des cellules coexprimant Tau-GFP (vert) et TH (rouge) après dix jours de différenciation in vitro pour les CSE CONTRÔLE à la ligne du haut et les CSE LMX1A pour la ligne du bas. La superposition des deux marquages est représentée dans la colonne de droite. Echelle : 50 μ m. (B) Les données de l'histogramme indiquent le pourcentage moyen des cellules TH⁺ par rapport au DAPI pour les cellules CSE CONTRÔLE (blanc) et CSE LMX1A (gris) (n=14 pour les deux conditions cellulaires). Les barres d'erreurs représentent \pm sem. B : Test de Mann-Whitney, ** correspondant à p<0.01.

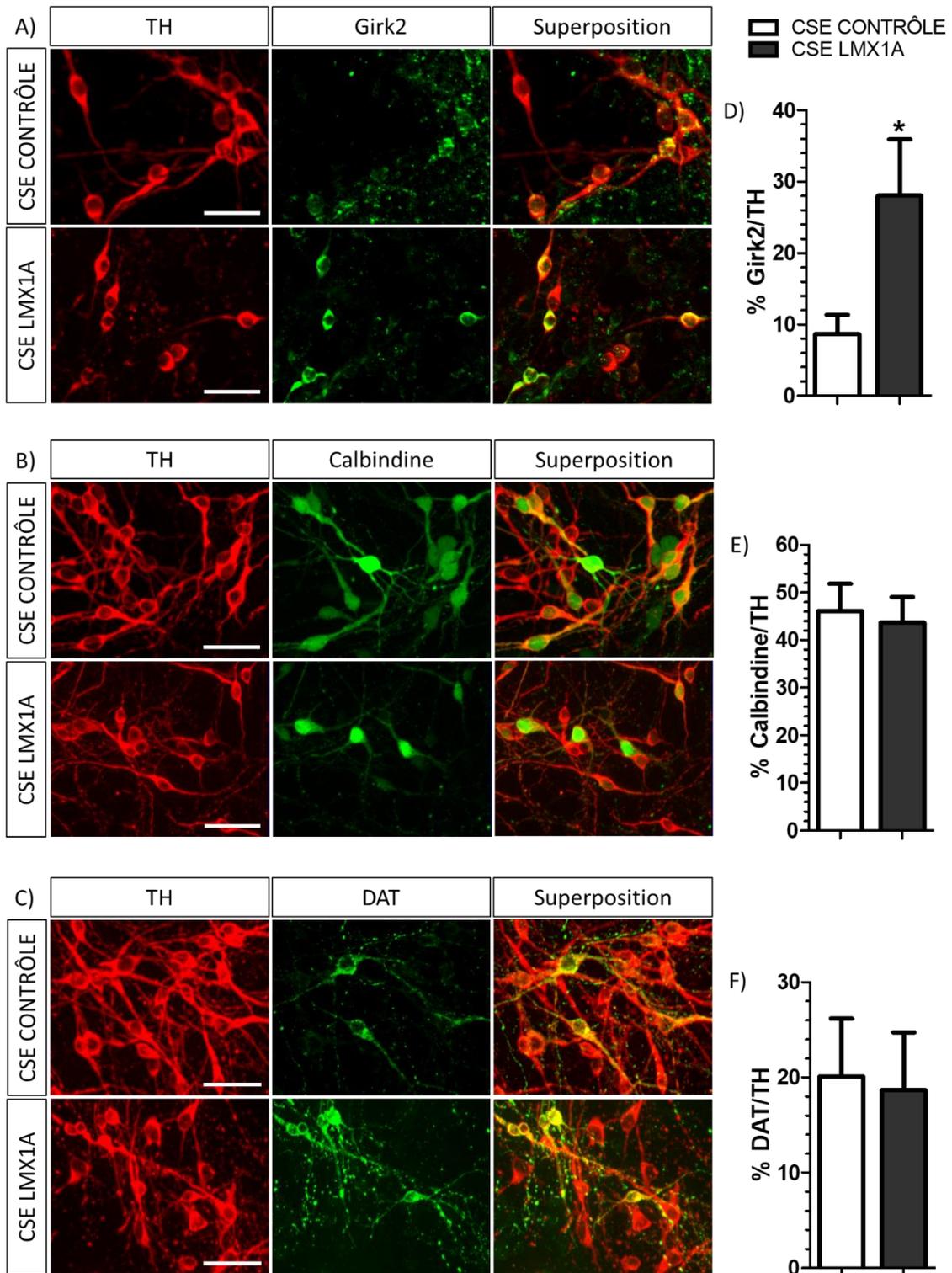


Figure 27: L'intégration de la séquence codante de LMX1A augmente la proportion de cellules GIRK2 et TH⁺ dix jours après différenciation in vitro.

Les photomicrographies à épifluorescence représentent des cellules coexprimant TH (rouge) avec GIRK2 (A, vert), Calbindine (B, vert) et DAT (C, vert) après dix jours de différenciation in vitro pour les CSE CONTRÔLE à la ligne du haut et les CSE LMX1A pour la ligne du bas. La superposition des deux marquages est représentée dans la colonne de droite (A, B, C). Echelle : 50 μ m. Les données des histogrammes indiquent le pourcentage moyen des cellules GIRK2 (D), Calbindine (E) et DAT (F) positives par rapport à la TH pour les cellules CSE CONTRÔLE (blanc) et CSE LMX1A (gris) (GIRK2 : n=6, Calbindine : n=5, DaAT : n=3 pour les deux conditions cellulaires). Les barres d'erreurs représentent \pm sem. B et C : Test de Student non apparié avec * correspondant à $p < 0.05$.

Ainsi, grâce au protocole de différenciation des corps embryonnaires et des morphogènes utilisés, il est possible de générer des neurones dopaminergiques du sous-type A9 matures *in vitro* à partir des cellules souches embryonnaires D3 Tau-GFP et d'augmenter cette proportion par l'intégration de la séquence codante de LMX1A au sein du génome des cellules.

En complément de l'analyse cytologique des neurones DA, le phénotype des neurones non-DA tels que les neurones GABAergiques, sérotoninergiques, cholinergiques et glutamatergiques, a également été analysé (Fig. 28). Des immunocytofluorescences réalisées à l'aide d'anticorps dirigés contre le marqueur GABA a permis d'identifier de neurones présentant un phénotype GABAergique dans les cultures *in vitro*, à dix jours de différenciation et, ce, à hauteur de $45.3 \% \pm 0.5$ (n=3) pour les CSE CONTRÔLE et $27.6 \% \pm 6.3$ (n=3) pour les CSE LMX1A (Fig. 28A,D). Des cellules exprimant la sérotonine sont également présentes à J10, *in vitro*, avec $2.0 \% \pm 0.5$ (n=3) de cellules sérotonine⁺ pour les CSE CONTRÔLE et $2.5 \% \pm 0.5$ (n=3) pour les CSE LMX1A (Fig. 28B,E). De plus, un phénotype glutamatergique a pu être mis en évidence avec notamment $12.6 \% \pm 1.9$ (n=3) de cellules VGLUT1⁺ pour les CSE CONTRÔLE et $2.0 \% \pm 0.8$ (n=3) pour les CSE LMX1A (Fig. 28C,F). En revanche, aucune cellule exprimant le marqueur cholinergique ChAT n'a pu être identifiée *in vitro* (résultats non présentés). Ainsi, les premiers résultats de l'analyse de la proportion de neurones non-DA *in vitro* semble indiquer que l'intégration de la séquence codante de LMX1A induirait une diminution de la proportion de cellules présentant un phénotype gabaergique et glutamatergique mais ne modifierait pas le phénotype sérotoninergique. Aucun marqueur cholinergique n'ayant pu être identifié *in vitro* démontre, en outre, que ni le protocole de différenciation de CE ni l'intégration de la séquence codante de LMX1A n'est en mesure d'induire une différenciation neuronale cholinergique.

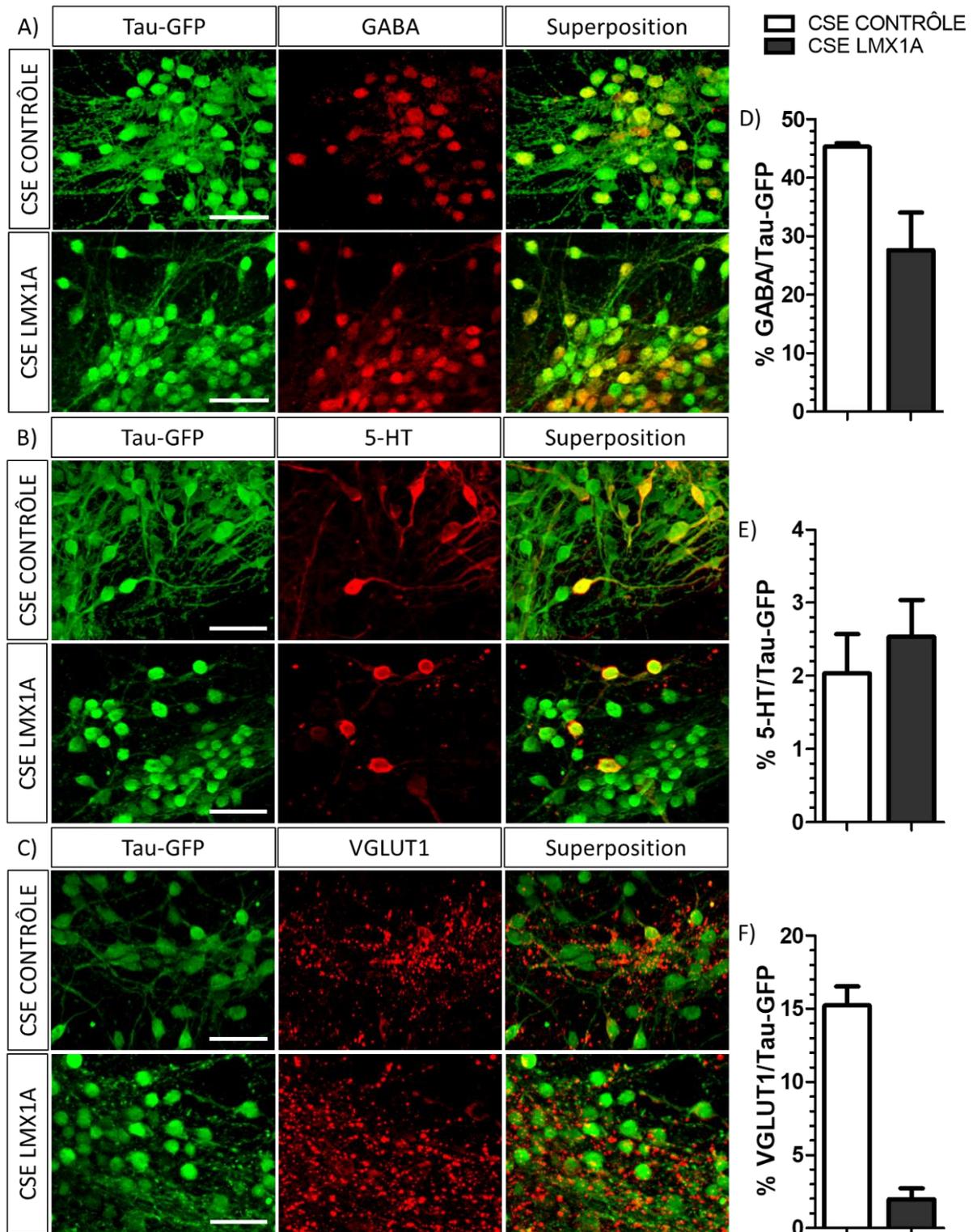


Figure 28: L'intégration de la séquence codante de LMX1A semble réduire la proportion de cellules GABA et 5-HT⁺, et non les cellules exprimant la sérotonine, dix jours après différenciation in vitro.

Les photomicrographies à épifluorescence représentent des cellules coexprimant Tau-GFP (vert) avec GABA (A, rouge), sérotonine (B, rouge) et VGLUT1 (C, rouge) après dix jours de différenciation in vitro pour les CSE CONTRÔLE à la ligne du haut et les CSE LMX1A pour la ligne du bas. La superposition des deux marquages est représentée dans la colonne de droite (A, B, C). Echelle : 50 μ m. Les données des histogrammes indiquent le pourcentage moyen des cellules GABA (D), sérotonine (E) et VGLUT1 (F) positives par rapport à Tau-GFP pour les cellules CSE CONTRÔLE (blanc) et CSE LMX1A (gris) ($n=3$ pour les deux conditions cellulaires et tous les marquages). Les barres d'erreurs représentent \pm sem.

Ainsi, grâce au protocole de différenciation des corps embryonnaires et des morphogènes utilisés, bien qu'il soit possible de générer des neurones DA du sous-type A9 matures après dix jours de différenciation, la population neuronale générée *in vitro* est majoritairement GABAergique. Cette proportion diminue et est égale à celles des neurones catécholaminergiques exprimant la TH après intégration de la séquence codante de LMX1A. Par ailleurs, le protocole de différenciation utilisé est également capable de générer des neurones 5-HT. Bien que différencié en faible quantité, leur présence n'est pas à négliger au vu des risques de développement de dyskinésies qu'ils peuvent engendrer après transplantation (Barker and Kuan, 2010; Carta et al., 2007; Winkler et al., 2005). Cependant, le nombre d'échantillon étant faible (N=3), il est nécessaire de compléter ces résultats préliminaires avant toute conclusion.

Pour finir, la proportion de cellules non neuronale, telle que les astrocytes, a été analysée *in vitro* après dix jours de différenciation. A l'aide d'un marqueur dirigé contre la GFAP, 36.1 % \pm 1.4 (n=3) et 23.4 % \pm 2.4 (n=3) de cellules GFAP⁺ sont respectivement différenciées pour les CSE CONTRÔLE et les CSE LMX1A (Fig. 29). Une diminution du nombre de cellules marquées par la GFAP semble être présente après différenciation des CSE LMX1A comparées aux CSE CONTRÔLE. L'intégration de la séquence codante de LMX1A pourrait avoir un effet sur la proportion d'astrocytes générée *in vitro* à J10. A l'instar de l'analyse des neurones non-DA, le nombre d'échantillon étant faible (N=3), ces résultats préliminaires doivent être complétés.

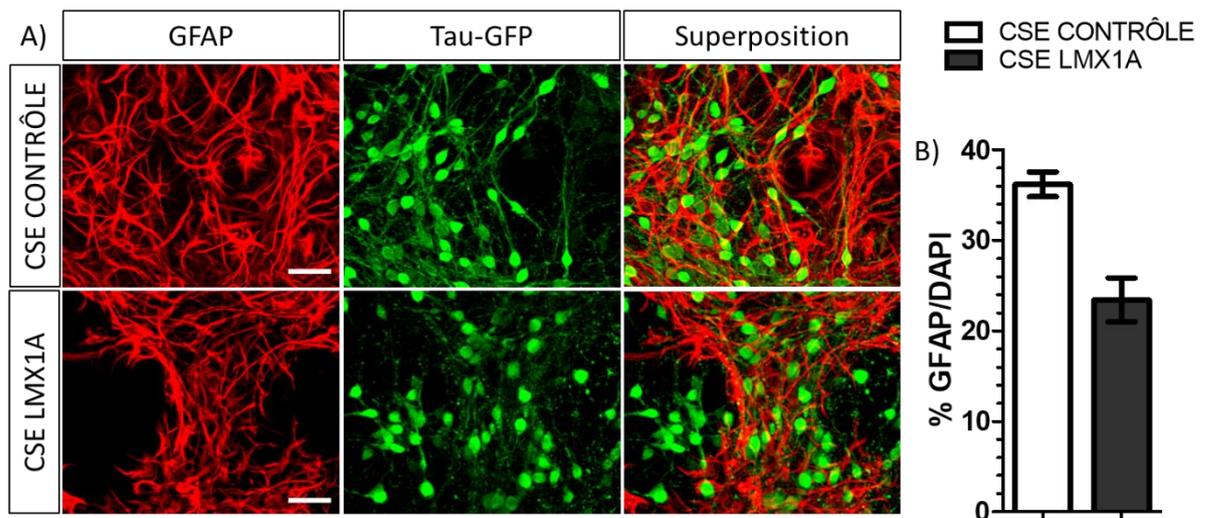


Figure 29 : L'intégration de la séquence codante de LMX1A semble réduire la proportion de cellules GFAP⁺ dix jours après différenciation in vitro.

(A) Les photomicrographies à épifluorescence représentent des cellules exprimant Tau-GFP (vert) et GFAP (rouge) après dix jours de différenciation in vitro pour les CSE CONTRÔLE à la ligne du haut et les CSE LMX1A pour la ligne du bas. La superposition des deux marquages est représentée dans la colonne de droite. Echelle : 50 μ m. (B) Les données de l'histogramme indiquent le pourcentage moyen des cellules GFAP⁺ par rapport au DAPI pour les cellules CSE CONTRÔLE (blanc) et CSE LMX1A (gris) (n=3 pour les deux conditions cellulaires). Les barres d'erreurs représentent \pm sem.

Suite à la caractérisation phénotypique des CSE CONTRÔLE et LMX1A ayant démontré l'obtention et l'augmentation de cellules présentant un phénotype DA nigral par l'intégration de la séquence codante de LMX1A, nous nous sommes, par la suite, intéressés à deux critères importants en vue de transplanter ces cellules dans le cerveau du modèle murin de la MP que nous utilisons. Le premier a été de vérifier le stade de différenciation auquel les CSE CONTRÔLE et les CSE LMX1A perdaient leur caractère de pluripotence afin d'éviter tout risque de formation de tératome post-transplantation. Le deuxième, quant à lui, a consisté à analyser un stade de développement présentant à la fois une proportion de précurseurs DA du MV maximale ainsi qu'un pourcentage des neurones DA matures minimal afin d'optimiser les conditions de survie et de différenciation des cellules transplantées.

4. Analyse de la perte de pluripotence des CSE lors de la différenciation

En vue de réduire au maximum tout risque de prolifération cellulaire après transplantation *in vivo*, le caractère pluripotent des cellules CSE CONTRÔLE et CSE LMX1A a été analysé tout au long du protocole de différenciation, à l'aide d'immunofluorescences utilisant des anticorps dirigés contre des marqueurs de pluripotence tels que Oct4 et SSEA1. Les cellules souches embryonnaires exprimant OCT4 et SSEA1 lors de la prolifération cellulaire (stade I) du protocole de différenciation (Fig. 30A), n'expriment plus ces marqueurs de pluripotence dès le quatrième jour de différenciation *in vitro* (J4, stade V) que ce soit pour les CSE CONTRÔLE (n=6 pour les deux marquages) ou les CSE LMX1A (n=6 pour les deux marquages) (Fig. 30B). Ceci démontre ainsi la possibilité de transplanter les cellules sans risque de formation de tératome dès le quatrième jour de différenciation.

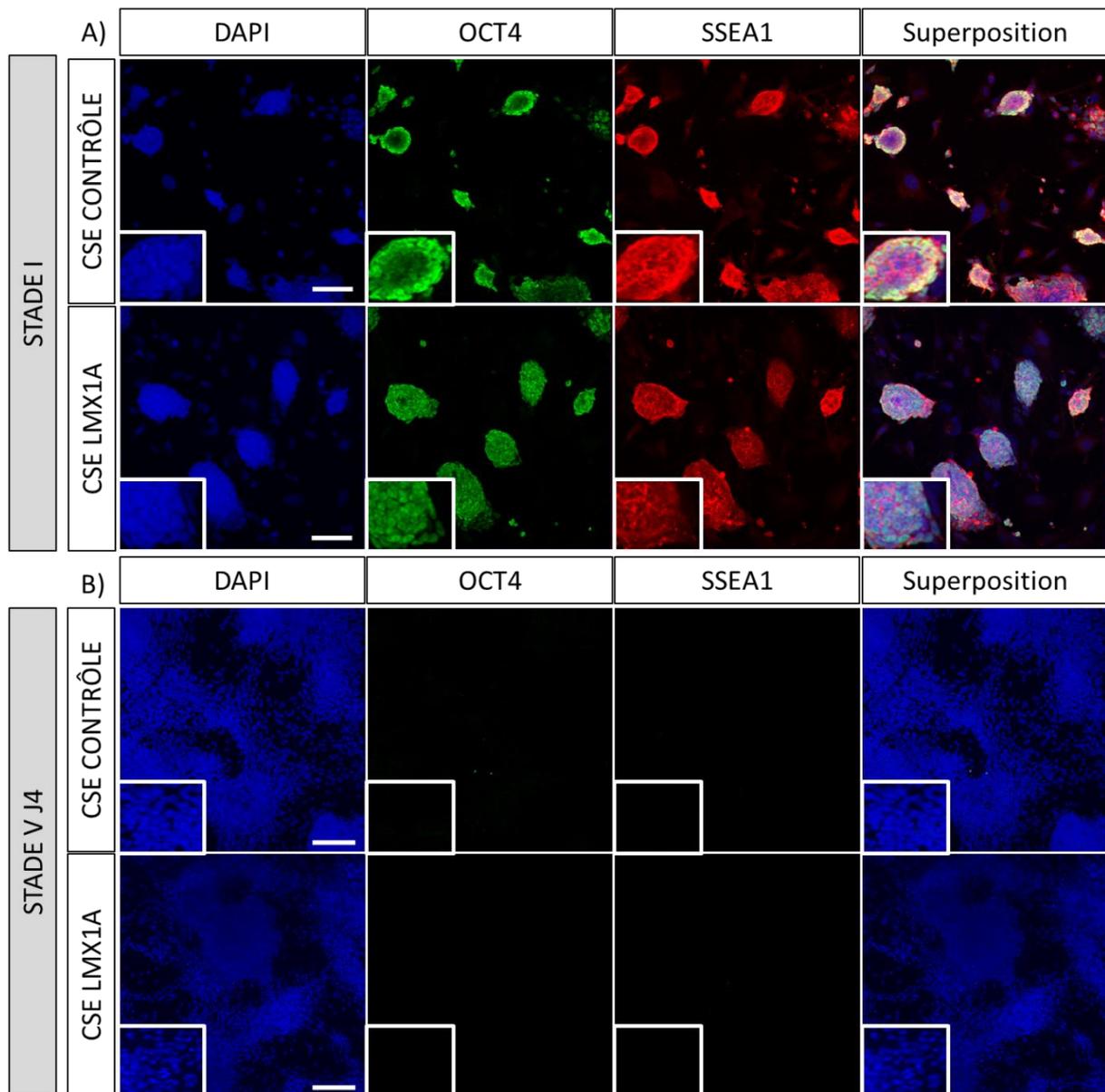


Figure 30: Perte de l'expression d'OCT4 et SSEA1 dès le quatrième jour de différenciation in vitro pour les CSE CONTRÔLE et les CSE LMX1A.

Les photomicrographies à épifluorescence représentent des cellules co-exprimant OCT4 (vert) et SSEA1 (rouge) à la fin du stade de prolifération du protocole de CE (Stade I) (A) et après quatre jours de différenciation in vitro (B) pour les CSE CONTRÔLE à la ligne du haut et les CSE LMX1A pour la ligne du bas. La superposition des deux marquages est représentée dans la colonne de droite alors que le marquage des noyaux est illustré dans la colonne de gauche (A, B). (n=6 pour les deux marquages et les deux conditions cellulaires). Un zoom de chaque photomicrographie est présenté dans le cadre blanc en bas à gauche. Echelle : 100 µm.

5. Analyse de la proportion des précurseurs DA du type MV lors de la différenciation

Comme décrit au paragraphe précédent, un des facteurs essentiels pour une thérapie cellulaire efficace est le nombre important de cellules suffisamment différenciées pour éviter la formation de tératome. Cependant, ces cellules doivent également être suffisamment immatures afin de réduire les risques de mort des neurones matures au moment de la greffe. La population cellulaire possédant ces caractéristiques semble être les précurseurs DA des neurones A9. Ainsi, afin de déterminer le jour le plus adéquat pour les transplantations de cellules dérivées de CSE CONTRÔLE et CSE LMX1A, nous nous sommes intéressés dans cette étude à l'expression de trois marqueurs de ces précurseurs DA du MV : FoxA2, LMX1A et Nurr1. Pour rappel, FoxA2 intervient dans l'induction et spécification des neurones DA du type MV et notamment dans l'expression de LMX1A qui participe également à la spécification des neurones DA du MV. A son tour, LMX1A régule positivement l'expression de Nurr1, impliqué dans la différenciation neuronale et la survie des neurones DA du MV qui induit l'expression de la TH. Étant donné que le quatrième jour de différenciation ne présente plus de marqueurs de pluripotence, nous avons décidé d'analyser FoxA2, LMX1A et Nurr1 dès J4. Pour conforter l'absence de cellules prolifératives en post-transplantation, un temps de différenciation plus avancé (sixième jour (J6)) a également été étudié et comparé à J4.

Afin d'étudier l'expression de ces trois marqueurs, des immunofluorescences ont été réalisées sur les cellules *in vitro* en associant chacune de ces protéines avec le marqueur neuronal Tau-GFP et le marqueur catécholaminergique TH. Il est à noter que lorsque FoxA2, LMX1A ou Nurr1 commencent à être exprimés au sein des précurseurs, leur expression perdure tout au long de la différenciation jusqu'aux cellules matures engendrant ainsi des cellules co-marquées avec les trois marqueurs *in vitro* (FoxA2⁺/Tau-GFP⁺/TH⁺ ; LMX1A⁺/Tau-GFP⁺/TH⁺ ; Nurr1⁺/Tau-GFP⁺/TH⁺). Cependant, la présence de Tau-GFP et de la TH au sein des cellules est un indicateur de l'avancée de la différenciation et maturation des neurones. Or, le but de la thérapie cellulaire est de transplanter des cellules le plus immatures possibles. Par conséquent, nous nous sommes intéressées non pas aux cellules exprimant ces trois marquages mais aux cellules exprimant FoxA2, LMX1A

ou Nurr1 seulement, sans Tau-GFP ni la TH (FoxA2⁺/Tau-GFP⁻/TH⁻ ; LMX1A⁺/Tau-GFP⁻/TH⁻ ; Nurr1⁺/Tau-GFP⁻/TH⁻).

Concernant FoxA2 (Fig. 31), 20.6 % ± 4.4 (n=5) et 2.9 % ± 0.2 (n=5) des cellules sont FoxA2⁺/Tau-GFP⁻/TH⁻ en moyenne pour les CSE CONTRÔLE différenciées *in vitro* à J4 et J6 respectivement ; ainsi que 25.5 % ± 7.7 (n=5) et 19.4 % ± 3.0 (n=5) pour les CSE LMX1A à J4 et J6 (Fig. 31C). L'analyse de la variance révèle une diminution significative de la proportion de cellules FoxA2⁺/Tau-GFP⁻/TH⁻ à J6 comparé à J4 (Two-way ANOVA, F(1,16)=6.53, p<0.05) ainsi que pour les CSE CONTRÔLE comparées aux CSE LMX1A (Two-way ANOVA, F(1,16)=5.28, p<0.05). En effet, la comparaison du post-hoc de Bonferroni indique une diminution significative, de 8.7 fois, du pourcentage de cellules FoxA2⁺/Tau-GFP⁻/TH⁻ pour les cellules CSE CONTRÔLE à J6 comparées au CSE LMX1A à J4 (p<0.05). Bien que non significatif, les CSE CONTRÔLE à J6 tendent à générer une proportion diminuée de cellules exprimant seulement FoxA2 comparées aux CSE CONTRÔLE à J4 (diminution de 7.1 fois ; p=0.0958) et comparées aux CSE LMX1A (diminution de 6.7 fois ; p=0.1388). Ceci montre alors que la proportion de cellules exprimant un marqueur précoce des précurseurs DA du MV, n'ayant pas initiés leur maturation, est plus importante au quatrième jour de différenciation qu'au sixième, pour les deux sources de cellules. De plus, l'intégration de la séquence codante de LMX1A induit ou tend à induire une forte augmentation de l'expression d'un gène participant à l'induction et la spécification des neurones DA du MV à J6.

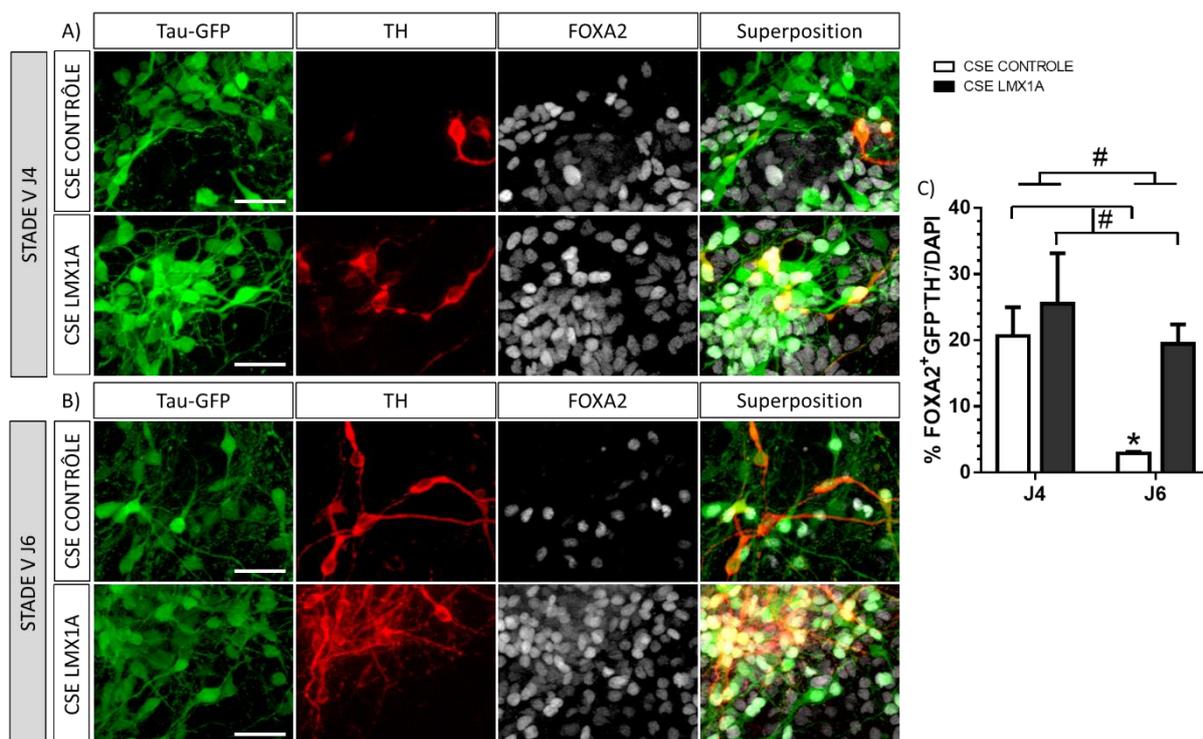


Figure 31: La proportion de cellules FoxA2⁺Tau-GFP⁺TH⁻ est augmentée au quatrième jour de différenciation in vitro comparée au sixième.

Les photomicrographies à épifluorescence représentent des cellules co-exprimant Tau-GFP (vert), TH (rouge) et FoxA2 (blanc) après quatre (A) ou six (B) jours de différenciation in vitro, pour les CSE CONTRÔLE à la ligne du haut et les CSE LMX1A pour la ligne du bas. La superposition des trois marquages est représentée dans la colonne de droite (A, B). Echelle : 50 μ m. Les données de l'histogramme indiquent le pourcentage moyen des cellules FoxA2⁺Tau-GFP⁺TH⁻ (D) par rapport au noyau des cellules révélé par un marquage DAPI ; que ce soit pour les cellules CSE CONTRÔLE (blanc) et CSE LMX1A (gris) (n=5 pour les deux conditions cellulaires et les deux temps d'analyses J4 et J6). Les barres d'erreurs représentent \pm sem. C : Two-way ANOVA avec # correspondant à p<0.05, post-hoc Bonferroni avec * correspondant à p<0.05 par rapport aux CSE LMX1A à J4.

Concernant LMX1A (Fig. 32), 0.7 % \pm 0.1 (n=5) des cellules sont LMX1A⁺/Tau-GFP⁻/TH⁻ en moyenne pour les CSE CONTRÔLE à J4 contre 0.8 % \pm 0.3 (n=5) à J6. Pour les CSE LMX1A, 6.5 % \pm 2.5 (n=5) expriment LMX1A seulement à J4 tandis que 3.1 % \pm 0.6 (n=5) d'entre elles sont LMX1A⁺/Tau-GFP⁻/TH⁻ à J6 (Fig. 32C). L'analyse de la variance révèle une diminution significative de la proportion de cellules LMX1A⁺/Tau-GFP⁻/TH⁻ pour les CSE CONTRÔLE comparés aux CSE LMX1A (Two-way ANOVA, F(1,16)=10.01, p<0.01). En effet, la comparaison du post-hoc indique une augmentation significative du pourcentage de cellules LMX1A⁺/Tau-GFP⁻/TH⁻ pour les cellules CSE LMX1A comparées au CSE CONTRÔLE à J4 (augmentation de 9.3 fois ; p<0.05) et J6 (augmentation de 3.8 fois ; p<0.05). Ainsi, la proportion de précurseurs du MV exprimant LMX1A seulement ne varie pas entre le quatrième et sixième jour de différenciation pour les deux sources de cellules. Cependant,

l'intégration de la séquence codante de LMX1A induit une forte augmentation de l'expression de sa protéine au sein des cellules que ce soit à J4 ou J6.

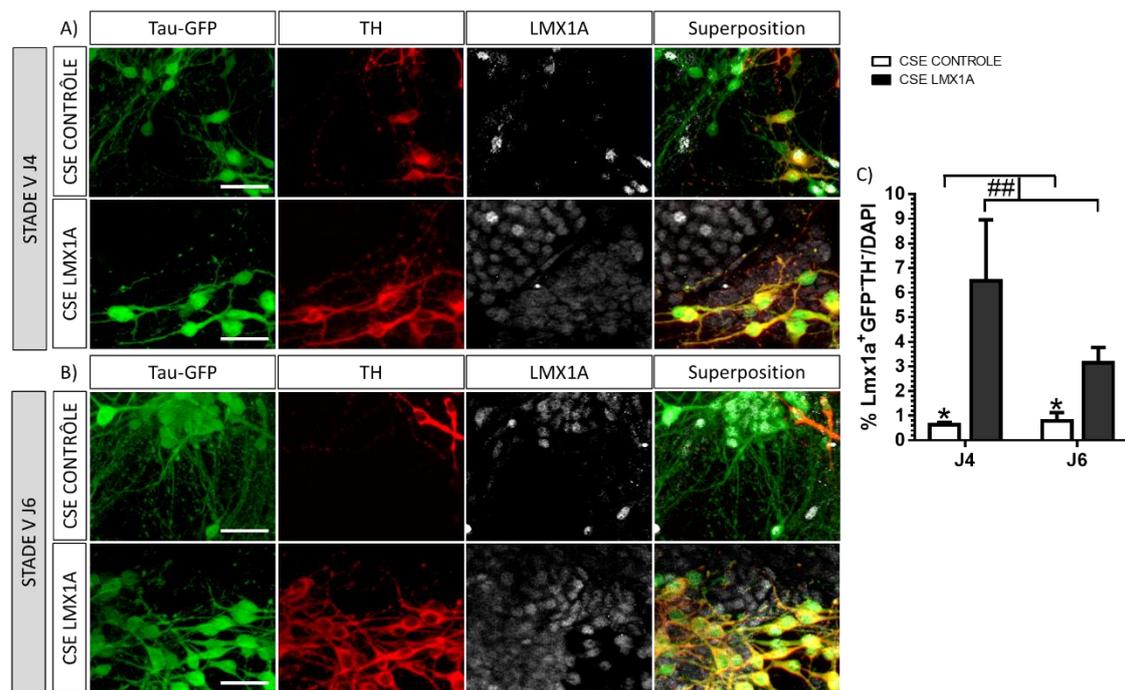


Figure 32: La proportion de cellules LMX1A⁺Tau-GFP⁺TH⁺ ne varie pas entre le quatrième et sixième jour de différenciation in vitro.

Les photomicrographies à épifluorescence représentent des cellules coexprimant Tau-GFP (vert), TH (rouge) et LMX1A (blanc) après quatre (A) ou six (B) jours de différenciation in vitro, pour les CSE CONTRÔLE à la ligne du haut et les CSE LMX1A pour la ligne du bas. La superposition des trois marquages est représentée dans la colonne de droite (A, B). Echelle : 50 μ m. Les données des histogrammes indiquent le pourcentage moyen des cellules LMX1A⁺Tau-GFP⁺TH⁺ (D) par rapport au noyau des cellules révélé par un marquage DAPI ; que ce soit pour les cellules CSE CONTRÔLE (blanc) et CSE LMX1A (gris) (n=5 pour les deux conditions cellulaires et les deux temps d'analyses J4 et J6). Les barres d'erreurs représentent \pm sem. C : Two-way ANOVA avec ## correspondant à $p < 0.01$, post-hoc Bonferroni avec * correspondant à $p < 0.05$ par rapport aux CSE LMX1A du jour correspondant.

Pour finir, des cellules sont Nurr1⁺/Tau-GFP⁻/TH⁻ à hauteur de 1.8 % \pm 1.1 (n=5), en moyenne, pour les CSE CONTRÔLE à J4 contre 0.4 % \pm 0.1 (n=5) à J6 ; alors que les CSE LMX1A présentent en moyenne 3.1 % \pm 2.5 (n=5) et 1.0 % \pm 0.4 (n=5) de cellules exprimant Nurr1 seulement, à J4 et J6 respectivement (Fig. 33C). L'analyse de la variance révèle une diminution significative de la proportion de cellules Nurr1⁺/Tau-GFP⁻/TH⁻ à J6 comparé à J4 pour les deux sources de cellules (Two-way ANOVA, F(1,16)=5.03, $p < 0.05$). Cependant, la comparaison du post-hoc ne révèle aucune différence significative du pourcentage de cellules Nurr1⁺/Tau-GFP⁻/TH⁻ pour les deux types de cellules et les deux temps d'analyse. Ainsi, la proportion de précurseurs tardifs du MV exprimant Nurr1 seulement et sur le point d'induire l'expression de la TH, est plus importante au quatrième jour de

différenciation qu'au sixième, pour les deux sources de cellules. De plus, l'intégration de la séquence codante de LMX1A n'influence pas l'expression de ce récepteur nucléaire au sein des cellules GFP⁻ et TH⁻ que ce soit à J4 ou J6. Pour rappel, ici, nous nous intéressons seulement à déterminer le meilleur jour de différenciation pour une transplantation et il est à noter que l'intégration de la séquence codante de LMX1A augmente l'expression de Nurr1 dans les CSE LMX1A comparées aux CSE CONTRÔLE lorsque l'on s'intéresse au nombre total de cellules Nurr1⁺ par rapport au DAPI (Résultats non présentés, Two-way ANOVA, F(1,16)=11.10, p<0.01, post-hoc de Bonferroni, p<0.05).

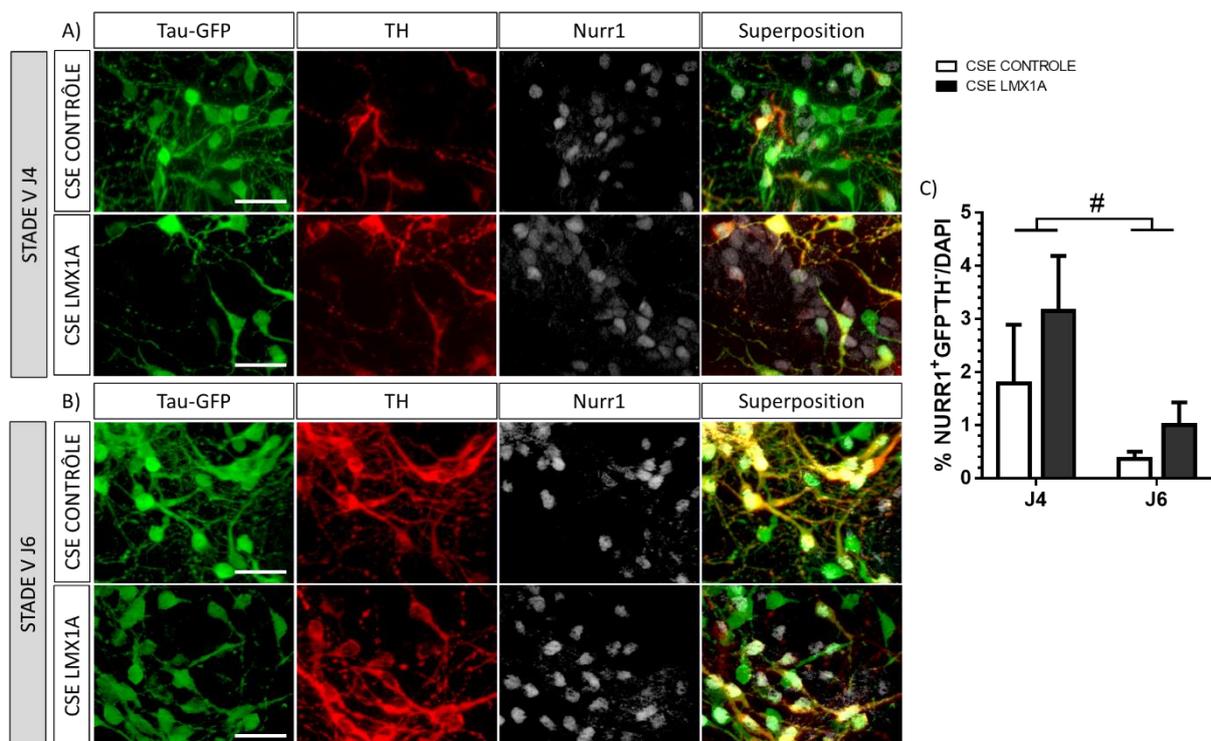


Figure 33: La proportion de cellules Nurr1⁺Tau-GFP⁺TH⁺ varie entre le quatrième et sixième jour de différenciation in vitro.

Les photomicrographies à épifluorescence représentent des cellules coexprimant Tau-GFP (vert), TH (rouge) et Nurr1 (blanc) après quatre (A) ou six (B) jours de différenciation in vitro, pour les CSE CONTRÔLE à la ligne du haut et les CSE LMX1A pour la ligne du bas. La superposition des trois marquages est représentée dans la colonne de droite (A, B). Echelle : 50 µm. Les données des histogrammes indiquent le pourcentage moyen des cellules Nurr1⁺Tau-GFP⁺TH⁺ (D) par rapport au noyau des cellules révélé par un marquage DAPI ; que ce soit pour les cellules CSE CONTRÔLE (blanc) et CSE LMX1A (gris) (n=5 pour les deux conditions cellulaires et les deux temps d'analyses J4 et J6). Les barres d'erreurs représentent ± sem. C : Two-way ANOVA avec # correspondant à p<0.05.

Ainsi, après avoir démontré qu'au quatrième jour de différenciation, les cellules dérivées des CSE CONTRÔLE et des CSE LMX1A n'expriment plus les facteurs de pluripotence OCT4 et SSEA1 et présentent une plus grande proportion de précurseurs DA du MV immatures par l'expression de FoxA2 et Nurr1 ainsi qu'une surexpression de LMX1A pour les CSE LMX1A. Le quatrième jour de différenciation a été choisi pour la transplantation cellulaire dans le but d'étudier la capacité des CSE différenciées à restaurer le taux de dopamine striatal et réduire les troubles moteurs induits dans un modèle murin de la MP. La suite de ce manuscrit s'attache à présenter le potentiel des cellules transplantées à réduire les déficits de la motricité induits par la lésion DA chez des souris lésées à la 6-OHDA.

PARTIE II : Évaluation du potentiel des greffes de précurseurs dopaminergiques dérivés de cellules souches embryonnaires murines à réduire les déficits de la motricité induits par la lésion dopaminergique dans un modèle murin de la maladie de Parkinson.

Pour évaluer le potentiel thérapeutique des précurseurs DA dérivées des CSE CONTRÔLE et des CSE LMX1A, nous avons utilisé le modèle murin (SN lésée à la 6-OHDA) communément employé au laboratoire et qui a été validé sur le plan neuroanatomique et fonctionnelle (Gaillard et al., 2009b). Trois semaines post-lésion, 150 000 cellules précurseurs dérivées des CSE CONTRÔLE ou des CSE LMX1a et engagées dans la voie de différenciation DA ont été transplantées au sein du striatum ou de la SN des souris, afin d'étudier la capacité de ces cellules à restaurer les déficits de la motricité induits par la 6-OHDA. Afin d'évaluer les déficits moteurs et la récupération fonctionnelle, deux tests comportementaux ont été effectués sur des groupes de souris contrôles, de souris lésées, de souris lésées puis transplantées avec les CSE CONTRÔLE dans le striatum ou la SN, de souris lésées puis transplantées avec les CSE LMX1a dans le striatum ou la SN. Seules les souris ayant révélé ultérieurement une survie de greffon, au sein du striatum ou de la SN neuf semaines post-transplantation, ont été incluses dans les résultats des tests de comportement présentés ci-après. Ces expériences ont été réalisées par une ancienne thésarde du laboratoire M. Droguerre.

A. Analyse du degré de la lésion : test de rotations induites par l'apomorphine

Afin de mesurer la récupération fonctionnelle induite par les cellules transplantées, la restauration du taux de dopamine striatal a été mesurée grâce au test de rotations induites par apomorphine. Suite à l'injection d'apomorphine, les groupes des souris contrôles et lésées ont respectivement présenté un nombre moyen de rotation de

7.4 ± 1.4 (n=8) et 222.9 ± 46.9 (n=8) respectivement, après avoir été mesuré pendant soixante minutes (Fig. 34). Les groupes de souris ayant été transplantés avec des CSE CONTRÔLE révèlent, quant à eux, un nombre moyen de rotations de 129.7 ± 125.2 (n=3) pour les transplantations striatales et 80.3 ± 35.3 (n=9) pour les transplantations nigrales (Fig. 34). Les souris ayant été greffées avec des CSE LMX1A présentent un nombre moyen de rotations de 42.3 ± 35.3 (n=4) et de 111.7 ± 64.3 (n=7) pour des greffes striatales et nigrales respectivement (Fig. 34). Le nombre restreint de souris présentant un greffon au sein du striatum neuf semaines post-transplantation empêche l'utilisation d'un test statistique pour valider les résultats du test de rotations induites par apomorphine. Cependant, le nombre de rotations entre les groupes de souris contrôles et souris lésées diffère grandement. En effet, une réduction de 30 fois du nombre de rotations pour le groupe de souris contrôles est observée par rapport au groupe de souris lésées. Ceci confirmerait l'efficacité de la lésion induite par la 6-OHDA. Concernant le potentiel de restauration des cellules transplantées, les groupes de souris ayant été injectées avec des CSE LMX1A transplantées au sein du striatum et des CSE CONTRÔLE en nigral semblent montrer une diminution du nombre moyen de rotations nettes comparés au groupe de souris lésées. La transplantation au sein du striatum avec des cellules ayant intégré la séquence codante de LMX1A semble être le groupe de souris réduisant le plus les troubles moteurs induits par la lésion nigrale des souris à la 6-OHDA.

**Test de rotations
induites par apomorphine**

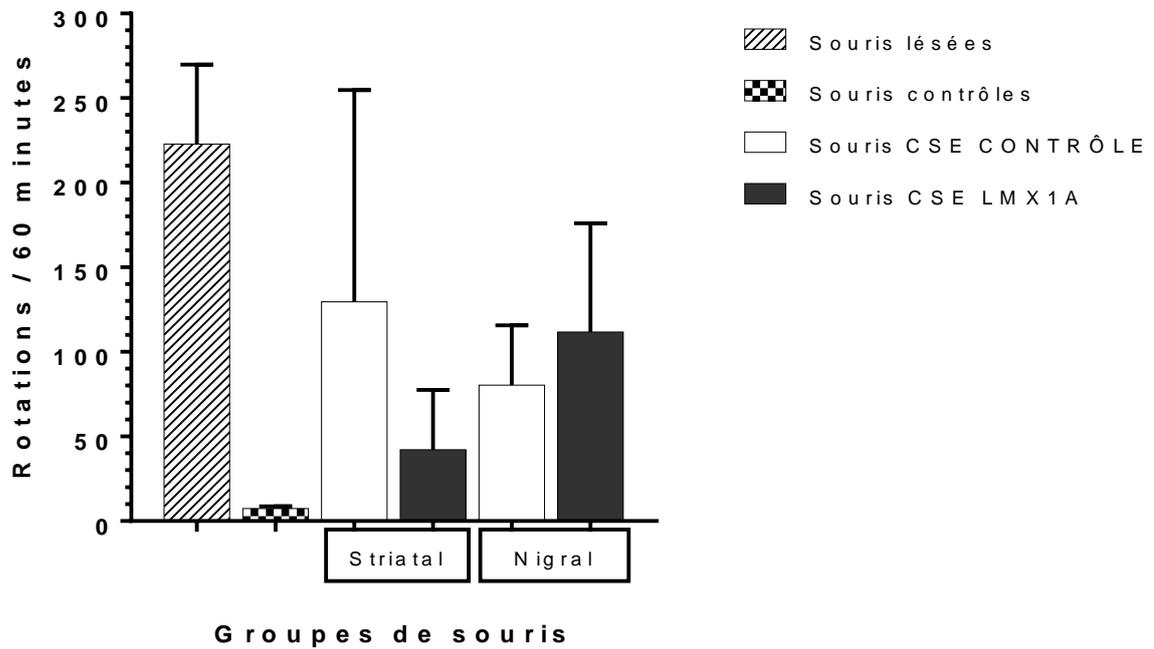


Figure 34: Analyse de l'effet du site de transplantation et de l'intégration de la séquence codante de LMX1A sur le nombre de rotations moyennes induites par l'injection d'apomorphine.

Les données de l'histogramme indiquent le nombre moyen de rotations réalisées du côté ipsilatéral à la souris pendant 60 minutes, après injection d'apomorphine, pour les groupes de souris lésées (barré, n=8), de souris contrôles (quadrillé, n=8), de souris CSE CONTRÔLE (blanc, striatal n=3, nigral n=9) et CSE LMX1A (gris, striatal n=4, nigral n=7). Les barres d'erreurs représentent \pm sem.

B. Analyse des capacités d'appréhension des membres antérieurs : test de l'escalier

Le deuxième test comportemental effectué suite à la transplantation des souris avait pour but d'étudier le potentiel des cellules greffées à restaurer les déficits de la motricité fine des pattes antérieures des souris. Pour répondre à cette question, un test mesurant la capacité d'appréhension des pattes antérieures des souris a été effectué 1 fois par semaine, 4 à 8 semaines post-transplantation, suite au rétablissement des souris après la chirurgie. Après avoir moyenné le pourcentage de pellets collectées par la patte antérieure controlatérale à lésion (droite) des souris par rapport à celle ipsilatérale (gauche) et exprimé par rapport au groupe de souris contrôles ($100.0\% \pm 0.0$, $n=8$), le groupe des souris lésées a présenté un pourcentage moyen de pellets recueillies de 45.6 ± 10.5 ($n=8$) (Fig. 35). Les groupes de souris ayant été transplantés avec des CSE CONTRÔLE révèlent, quant à eux, un pourcentage moyen de $61.9\% \pm 11.4$ ($n=5$) pour les transplantations striatales et $41.6\% \pm 10.0$ ($n=9$) pour les transplantations nigrales (Fig. 35). Les souris ayant été greffées avec des CSE LMX1A présentent un pourcentage moyen de $84\% \pm 21.7$ ($n=5$) et de $40.9\% \pm 9.7$ ($n=7$) pour des greffes striatales et nigrales respectivement (Fig. 35). Comme décrit précédemment, le faible nombre de souris présentant un greffon au sein du striatum neuf semaines post-transplantation restreint l'utilisation d'un test statistique pour valider les résultats du test d'appréhension des membres antérieurs. Cependant, le pourcentage de pellets collectées pour le groupe de souris lésées étant proche de 50% semble confirmer la présence d'un déficit d'appréhension de pellets du côté controlatéral à la lésion induite par la 6-OHDA. Concernant les groupes de souris transplantées, seule le groupe de souris ayant été injectées avec des CSE LMX1A en striatal semble révéler une augmentation du pourcentage moyen de pellets recueillies comparé au groupe de souris lésées. Par conséquent, seule la transplantation au sein du striatum des cellules ayant intégré la séquence codante de LMX1A semble présenter une amélioration des compétences motrices fines induites par la lésion nigrale des souris à la 6-OHDA.

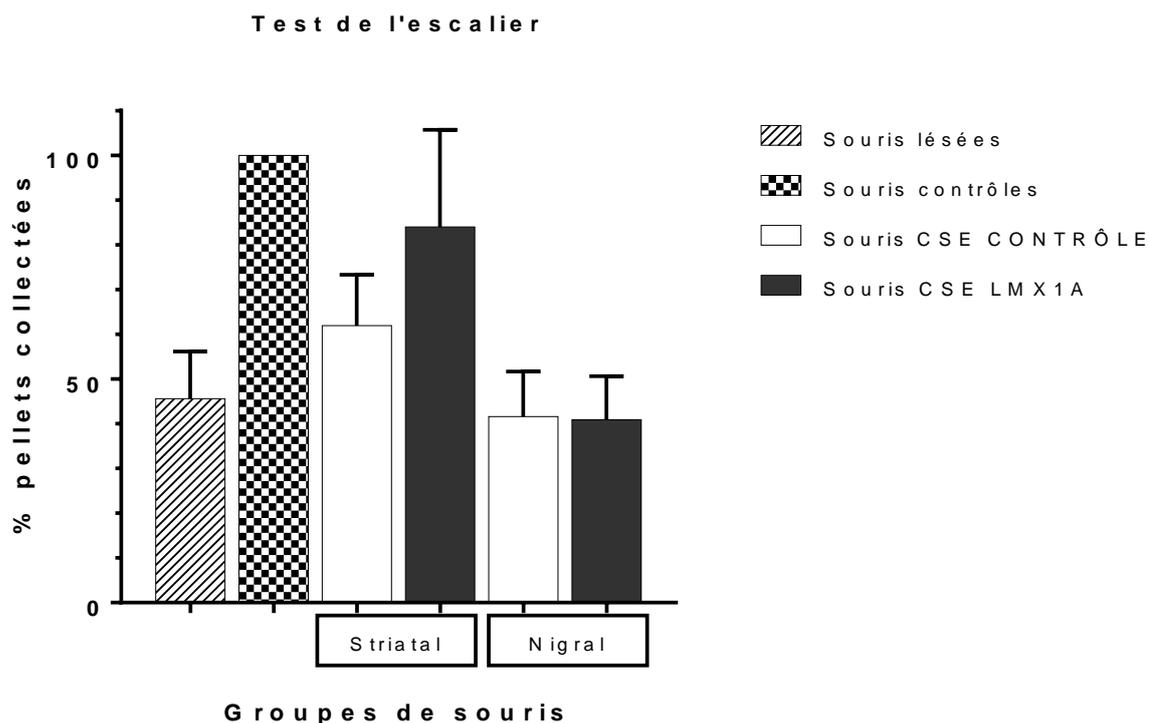


Figure 35: Analyse de l'effet du site de transplantation et de l'intégration de la séquence codante de LMX1A sur le pourcentage de pellets collectées lors du test d'appréhension des membres antérieurs.

Les données de l'histogramme indiquent le pourcentage de pellets collectées quatre à huit semaines post-transplantation par la patte antérieure controlatérale à la lésion (droite) des souris par rapport à celle du côté ipsilatéral (gauche) et rationalisé par rapport aux résultats du groupe de souris contrôles. Groupe de souris lésées (barré, n=8), groupe de souris contrôles (quadrillé, n=8), groupe de souris CSE CONTRÔLE (blanc, striatal n=3, nigral n=9) et CSE LMX1A (gris, striatal n=4, nigral n=7). Les barres d'erreurs représentent \pm sem.

Après avoir effectué les tests de comportements, les cerveaux des six groupes de souris ont été récupérés neuf semaines après la transplantation et des analyses histologiques ont été réalisées.

PARTIE III : Évaluation du potentiel des précurseurs dopaminergiques dérivés de cellules souches embryonnaires murines à restaurer le réseau dopaminergique dégénéré.

Suite à la transplantation de précurseurs DA mésencéphaliques au sein du striatum ou de la SN de souris lésées à la 6-OHDA et l'évaluation de leur capacité à restaurer les compétences motrices réduites chez ces animaux, la lésion de la SN, la survie et le volume du greffon a été étudié ainsi que le phénotype des cellules différenciées *in vivo* et leur site et quantité de projection.

A. Analyse de la lésion

La majorité des souris a survécu à la lésion de la SN à la 6-OHDA (76.7%). Tous les groupes de souris lésées ont présenté une lésion importante avec une perte massive des cellules TH⁺ de la SN du côté de la lésion ainsi qu'une forte réduction des projections axonales DA striatales (résultats non présentés). Après trois semaines, les souris ont pu être greffées dans la SN (n=10 pour les deux conditions cellulaires) ou le striatum (n=9 pour les deux conditions cellulaires) avec des cellules dérivées des CSE CONTRÔLE ou des CSE LMX1A.

B. Survie, volume, forme et localisation des greffons striataux et nigraux

Neuf semaines après la transplantation, la survie, le volume, la forme ainsi que la localisation des cellules greffées et différenciées en neurones ont été analysés grâce à des immunohistochimies effectuées à l'aide d'un anticorps primaire dirigé contre Tau-GFP. Ceci a permis de démontrer que sur les neuf souris greffées, soit avec les cellules dérivées des CSE CONTRÔLE ou des CSE LMX1A au niveau du striatum, cinq d'entre elles, soit 55%, ont présenté un greffon (Tableau 4). Pour les greffons au niveau de la SN,

neuf souris sur dix, soit 90%, des souris CSE CONTRÔLE et sept souris sur dix, soit 70%, pour des souris CSE LMX1A ont des cellules exprimant Tau-GFP (Tableau 4). Ainsi le site de transplantation semble avoir un effet sur la survie du transplant, mais pas le type de cellules utilisé.

	STRIATUM		SUBSTANCE NOIRE	
	CSE CONTRÔLE	CSE LMX1A	CSE CONTRÔLE	CSE LMX1A
souris transplantées	9	9	10	10
souris présentant un transplant	5	5	9	7

Tableau 4: Tableau récapitulatif du nombre de souris ayant reçu un transplant de CSE CONTRÔLE ou LMX1A en striatal ou nigral et le nombre de souris présentant des cellules Tau-GFP au sein de leur cerveau neuf semaines post-transplantation.

Deux autres animaux ont par la suite été retirés du groupe des souris CSE CONTRÔLE transplantées dans le striatum à cause d'une localisation non striatal (n=3). Une souris a, elle, été extraite du groupe des souris CSE LMX1A greffées en striatal (n=4) pour une raison similaire.

Concernant la survie cellulaire au sein même des greffons, celle-ci s'est révélée impossible. En effet, étant donné que seules les cellules exprimant Tau-GFP sont analysées, les cellules neuronales seulement peuvent être étudiées et il est impossible de dissocier les cellules non-neuronales des cellules endogènes, tels que les astrocytes. De plus, au vu de la forte densité cellulaire des transplants, cela a rendu la discrimination difficile des cellules Tau-GFP⁺ les unes des autres, rendant ainsi le comptage des neurones ayant survécu au sein du transplant irréalisable.

Concernant le volume moyen du transplant, celui-ci correspond à $0.197 \text{ mm}^3 \pm 0.073$ (n=3) et $0.276 \text{ mm}^3 \pm 0.074$ (n=9) pour les CSE CONTRÔLE transplantées en striatal et nigral respectivement ainsi que $0.109 \text{ mm}^3 \pm 0.025$ (n=4) et $0.196 \text{ mm}^3 \pm 0.058$ (n=7) pour les CSE LMX1A transplantées en striatal et nigral respectivement (Fig. 36). Le volume des greffons ayant survécu 9 semaines post-transplantation sont de petites tailles $> 0.3 \text{ mm}^3$. Bien qu'aucun test statistique ne soit réalisable, il semblerait que le volume des transplants soit inférieur pour les cellules transplantées et dérivées des CSE LMX1A.

Cependant, il ne semble pas y avoir de différence de volume entre les deux sites de transplantation.

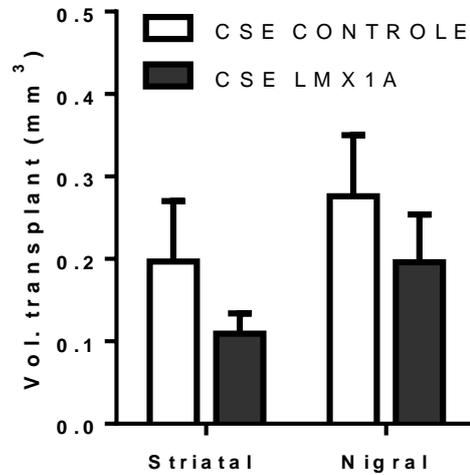


Figure 36 : Analyse du volume des greffons des cellules exprimant Tau-GFP et dérivées des CSE CONTRÔLE ou des CSE LMX1A après transplantation au sein du striatum ou de la substance noire.

Les données de l'histogramme indiquent le volume moyen des greffons, en mm³, identifié in vivo par la délimitation de cellules exprimant Tau-GFP pour les groupes de souris CSE CONTRÔLE (blanc, striatal n=3, nigral n=9) et CSE LMX1A (gris, striatal n=4, nigral n=7). Les barres d'erreurs représentent ± sem.

Les transplants striataux sont globalement de forme ronde, voire ovale, dans le sens dorso-ventral et sont localisés au niveau du striatum dorsal et en périventriculaire. Les transplants nigraux sont, quant à eux, de forme filiformes et rectangulaires dans le sens dorso-ventral et sont localisés au niveau de la SN et dorsalement (Fig. 37).

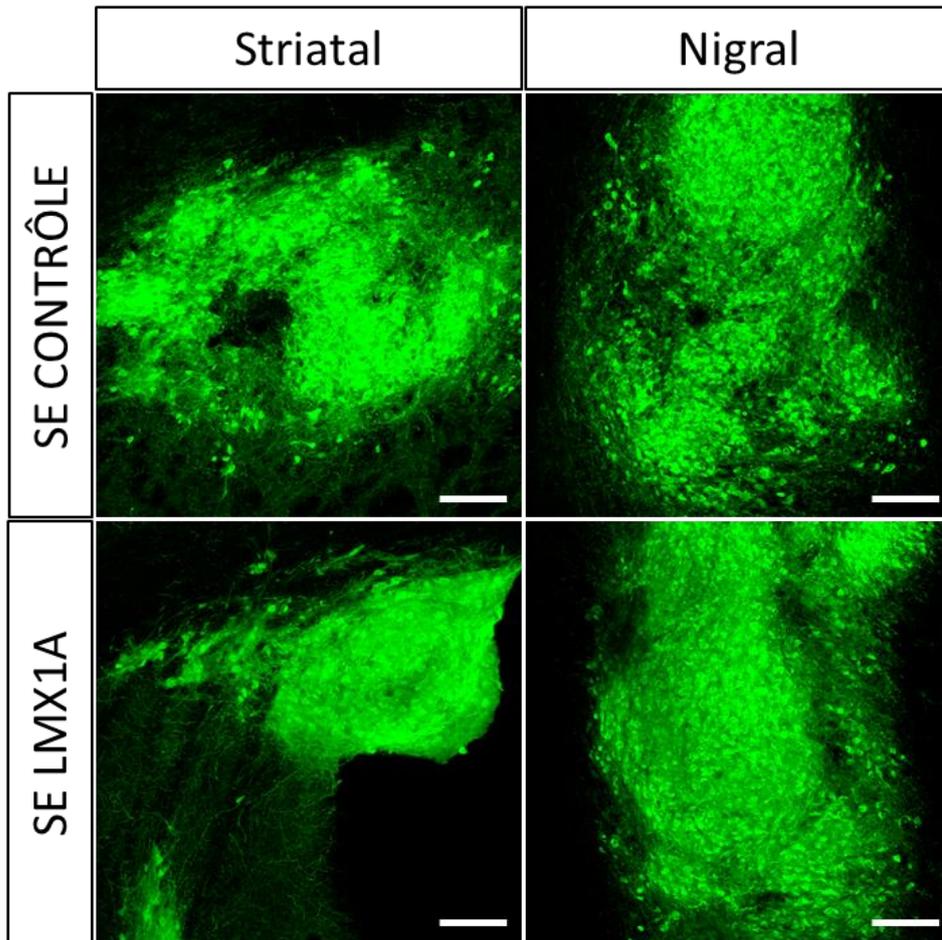


Figure 37: Photomicrographies du marquage de Tau-GFP sur des sections coronales des cerveaux de souris transplantées en nigral ou en striatal avec des cellules dérivées de CSE CONTRÔLE ou CSE LMX1A.

Les photomicrographies d'un microscope confocale représentent le marquage de Tau-GFP (vert), neuf semaines après les transplantations, au niveau du striatum pour la colonne de gauche et au niveau de la SN pour la colonne de droite avec les CSE CONTRÔLE pour la ligne du haut et les CSE LMX1A pour la ligne du bas. Echelle : 100 μ m.

C. Caractérisation du phénotype des cellules différenciées dérivées de cellules souches embryonnaires murines *in vivo*

La plupart des marqueurs cellulaires utilisés *in vitro* ont également été utilisés en immunohistochimie afin de caractériser le phénotype des cellules précurseurs différenciées *in vivo* neuf semaines post-transplantation. Ainsi le caractère pluripotent des cellules transplantées et dérivées des CSE a été analysé ainsi que le phénotype neuronal DA et non DA et le phénotype des cellules précurseurs DA du MV.

1. Analyse du caractère pluripotent des cellules transplantées

Dans un premier temps, le caractère pluripotent des cellules transplantées a été analysé en utilisant Oct4 afin de confirmer l'absence de risque de tératome après transplantation, bien qu'aucune cellule positive pour ce facteur de transcription n'ait été observée *in vitro* à J4. En effet, neuf semaines après la transplantation, les résultats ne montrent pas de cellules positives pour Oct4 que ce soit pour les transplants striataux ou nigraux de cellules dérivées de CSE CONTRÔLE ou de CSE LMX1A (résultats non présentés). Ces résultats confirment l'hypothèse que les CSP greffées ne forment pas de tératomes si les cellules sont suffisamment avancées dans leur voie de différenciation.

2. Analyse du phénotype neuronal des cellules transplantées

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la proportion de neurones présente dans le transplant après analyse par immunofluorescence du marqueur Tau-GFP. De nombreuses cellules Tau-GFP⁺ ont été observées au sein du transplant en position striatale ou nigrale. Ceci démontre que les cellules précurseurs dérivées des CSE continuent leur différenciation et maturation après la transplantation. Cependant, comme décrit précédemment, au vu de la forte compacité cellulaire des transplants, cela a rendu la discrimination des cellules Tau-GFP⁺ les unes des autres difficile, rendant ainsi impossible le comptage des neurones ayant survécu au sein du transplant. Cependant, l'identité neuronale a, elle, pu être étudiée par la co-expression du marqueur Tau-GFP avec des marqueurs DA dont la TH.

Il a ainsi pu être démontré que les CSE transplantées se sont différenciées en neurones catécholaminergiques (Fig. 38A,C), en exprimant la TH à hauteur de 596.9 ± 185.8 cellules/transplant (n=3) et 555.9 ± 78.0 cellules/transplant (n=9) pour les CSE CONTRÔLE transplantées en striatal et nigral respectivement et 393.3 ± 177.0 cellules/transplant (n=4) pour les CSE LMX1A transplantées en striatal et 392.0 ± 81.8 cellules/transplant (n=7) en nigral. Le type de cellules transplantées ne semble avoir aucun effet sur le nombre de cellules TH⁺ par transplant, ni le site de transplantation n'induirait pas de variabilité du nombre de cellules TH⁺ par transplant. Ainsi, l'intégration de la séquence codante de LMX1A n'induirait aucune modification sur la capacité des cellules précurseurs dérivées des CSE à se différencier en neurones catécholaminergiques *in vivo*.

Des neurones DA du sous-type nigral ont pu être mis en évidence au sein des transplants (Fig. 38A,D,E), grâce à la co-expression de TH et GIRK2. En effet, parmi les cellules TH⁺, 33.3 ± 19.6 cellules/transplant (n=3), soit $5.7\% \pm 2.2$ des cellules TH⁺, pour les CSE CONTRÔLE transplantées en striatal et 8.0 ± 3.7 cellules/transplant (n=9), soit $1.7\% \pm 1.1$ des cellules TH⁺, lorsque celles-ci ont été greffées dans la substance noire. Pour les CSE LMX1A transplantées en striatal en moyenne 32.0 ± 14.5 cellules/transplant (n=4) co-expriment TH et GirK2 représentant ainsi $7.6\% \pm 3.5$ des cellules TH⁺ et 2.3 ± 1.2 cellules/transplant (n=7), soit $0.9\% \pm 0.5$ des cellules TH⁺, localisées dans la substance noire. Aucune différence de proportion des cellules GirK2⁺TH⁺/transplant ni de pourcentage des cellules GIRK2⁺ par rapport aux cellules TH⁺ ne semble apparaître entre les deux types de cellules utilisées. Cependant, le site de transplantation induirait un impact. En effet, le nombre de cellules GIRK2⁺ TH⁺/transplant et en pourcentage par rapport aux cellules TH⁺, pour les CSE CONTRÔLE et les CSE LMX1A, est réduit lorsque les cellules ont été transplantées dans la SN comparée à aux transplantations dans le striatum. Les transplantations au niveau du striatum augmenteraient la présence en neurones GIRK2⁺TH⁺ des cellules précurseurs dérivées des CSE dans les transplants ayant survécu comparées aux transplantations nigrales, que ce soit pour les cellules dérivées des CSE CONTRÔLE ou des CSE LMX1A.

Des neurones du sous-type ATV sont également présents au sein du transplant (Fig. 38B,F,G). En effet, en moyenne 601.3 ± 151.0 (n=3) cellules par transplant issues des CSE CONTRÔLE transplantées en striatal co-expriment TH et Calbindine, représentant ainsi $82.8\% \pm 3.0$ des cellules TH⁺. Quand ces cellules sont transplantées en nigral, en moyenne 368.4 ± 77.7 (n=5) d'entre elles au sein d'un transplant, co-expriment TH et Calbindine, soit $60.5\% \pm 6.2$ des cellules TH⁺. Pour les cellules dérivées de CSE LMX1A transplantées au niveau du striatum 271.0 ± 105.4 cellules par transplant (n=4) co-expriment, en moyenne, TH et Calbindine représentant ainsi $65.3\% \pm 10.7$ des cellules TH⁺ et 332.0 ± 74.0 cellules par transplant (n=7) en nigral, soit $77.0\% \pm 2.7$ des cellules TH⁺. Les transplantations au sein de la SN ne semblent pas induire de variations du nombre de cellules TH⁺ et Calbindine⁺ entre les deux types de cellules. Cependant, les transplantations striatales semblent induire une augmentation du nombre de cellules TH⁺ et Calbindine⁺ entre les cellules issues des CSE CONTRÔLE par rapport aux cellules dérivés

des CSE LMX1A ainsi qu'un accroissement du pourcentage de cellules Calbindine⁺ par rapport à la TH pour les cellules issues des CSE CONTRÔLE transplantées au sein du striatum comparé à une transplantation nigrale. Ceci pourrait alors démontrer qu'une transplantation au sein du striatum favoriserait une différenciation DA du sous-type ATV en absence d'intégration de la séquence codante de LMX1A dans le génome des CSE. De plus, que ce soit pour les CSE CONTRÔLE ou les CSE LMX1A transplantées en nigral ou striatal, le sous-type DA obtenu *in vivo* est majoritairement du sous-type ATV et non nigral.

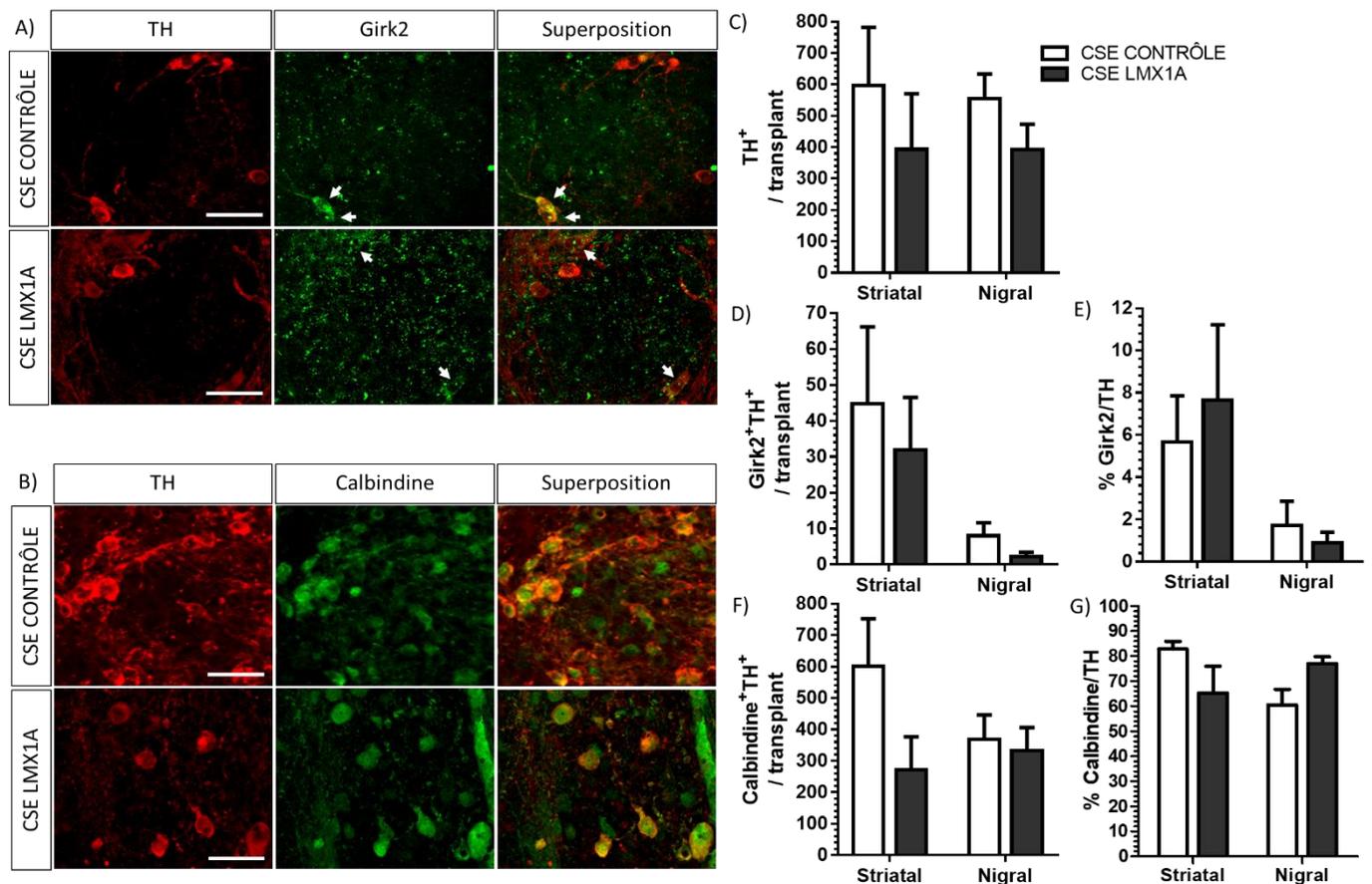


Figure 38: Analyse du phénotype DA du type MV des cellules dérivées des CSE CONTRÔLE et des CSE LMX1A après transplantations au sein du striatum ou de la SN.

Les photomicrographies à épifluorescence représentent des cellules coexprimant TH (rouge) avec GIRK2 (A, vert,) Calbindine (B, vert) après neuf semaines de transplantation pour les CSE CONTRÔLE aux lignes du haut (A,B) et les CSE LMX1A pour les lignes du bas (A,B). La superposition des deux marquages est représentée dans la colonne de droite (A, B). Les flèches blanches indiquent des cellules co-exprimées Echelle : 50 μ m. Les données des histogrammes indiquent le nombre moyen des cellules TH (C), GIRK2 (D), Calbindine (F) positives au sein des transplants ainsi que le pourcentage moyen des cellules GIRK2 (E), Calbindine (G) positives par rapport au nombre de cellules exprimant la TH pour les transplantations striatales et nigrales avec les CSE CONTRÔLE (blanc, n=3 et n=9 respectivement) et les CSE LMX1A (gris, n=4 et n=7 respectivement). Les barres d'erreurs représentent \pm sem.

Le nombre de neurones matures co-exprimant TH et DAT ne varierait pas en fonction du type de cellules greffées ou du site de transplantation que ce soit pour les cellules CSE CONTRÔLE ou les CSE LMX1A greffées en striatal (66.7 ± 27.0 (n=3) et 51.0 ± 20.0 (n=4) respectivement) ou en nigral (55.6 ± 12.7 (n=9) et 66.9 ± 27.6 (n=7)) respectivement (Fig. 39 A,B,C). Cependant le pourcentage de DAT par rapport aux cellules TH⁺ (Fig. 39D) semble être augmenté pour les cellules dérivées des CSE LMX1A par rapport aux cellules dérivées des CSE CONTRÔLES (CSE CONTRÔLE striatales 12.8 ± 2.4 (n=3) et nigrales 11.4 ± 2.5 (n=9) ; CSE LMX1A striatales 21.8 ± 4.1 (n=4) et nigrales 15.7 ± 3.2 (n=7)). Ceci pourrait indiquer que l'intégration de la séquence codante de LMX1A a un effet positif sur la maturation du nombre de neurones DA différenciés *in vivo* après la greffe de précurseurs obtenus *in vitro*.

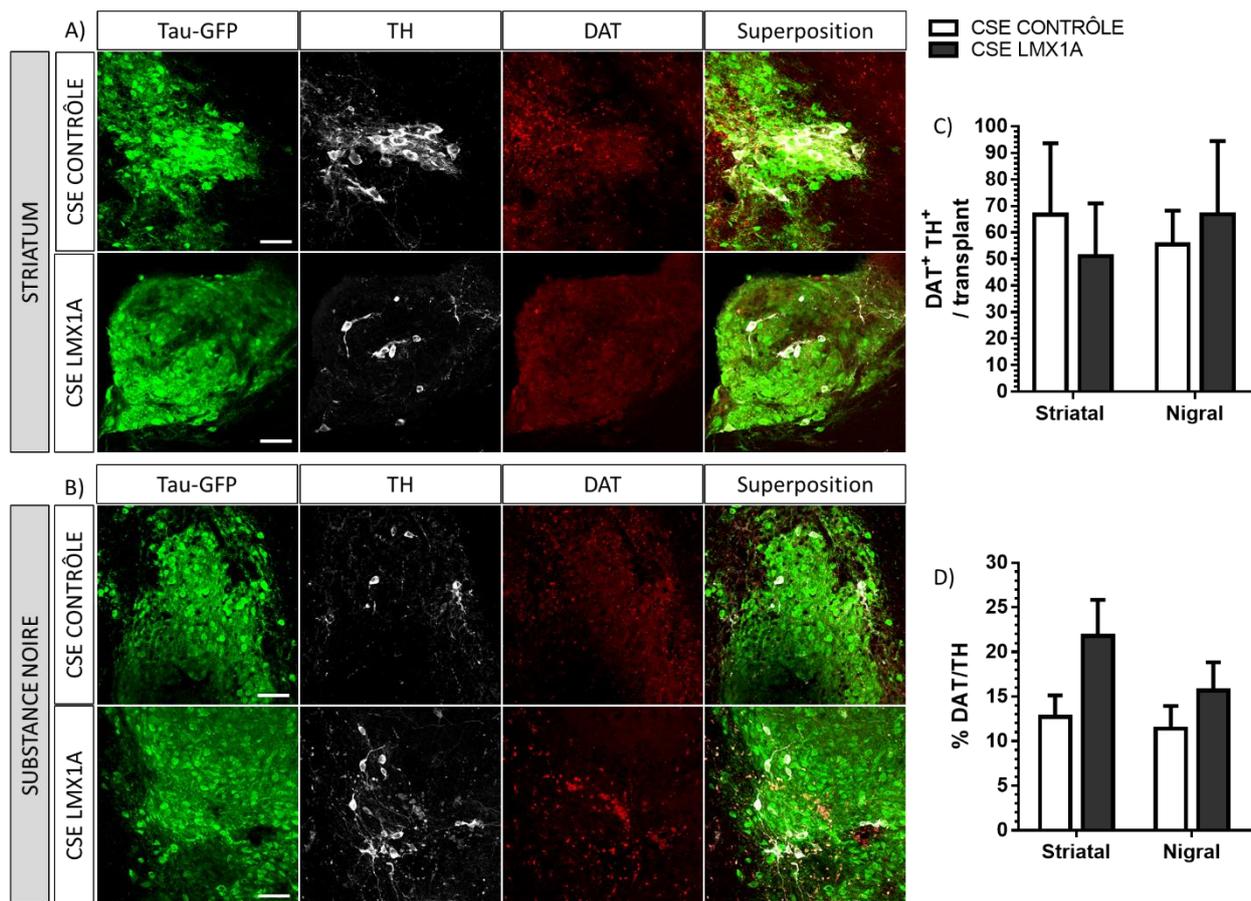


Figure 39: Analyse de la maturation des neurones DA dérivées des CSE CONTRÔLE et des CSE LMX1A après transplantations au sein du striatum ou de la SN.

Les photomicrographies d'un microscope confocale représentent des cellules co-exprimant Tau-GFP (vert), la TH (blanc) et DAT (rouge) après neuf semaines de transplantation au sein du striatum (A) ou de la substance noire (B) pour les CSE CONTRÔLE aux lignes du haut (A,B) et les CSE LMX1A pour les lignes du bas (A,B). La superposition des deux marquages est représentée dans la colonne de droite (A, B). Echelle : 50 μ m. Les données des histogrammes indiquent le nombre moyen des cellules DAT⁺ et TH⁺ (C) au sein des transplants ainsi que le pourcentage moyen des cellules DAT⁺ (D) par rapport au nombre de cellules exprimant la TH pour les transplantations striatales et nigrales avec les CSE CONTRÔLE (blanc, n=3 et n=9 respectivement) et les CSE LMX1A (gris, n=4 et n=7 respectivement). Les barres d'erreurs représentent \pm sem.

Après avoir observé une faible proportion des cellules DA présentant un phénotype mature, une analyse des précurseurs précoces des neurones DA du MV a été réalisée grâce à l'expression du facteur de transcription FoxA2 au sein du transplant (Fig. 40A,B). Les résultats obtenus ne semblent montrer aucune différence de proportion moyenne pour les cellules FoxA2⁺ dans un transplant qu'il soit greffé en intra-striatal ou en intra-nigral avec des cellules dérivées des CSE CONTRÔLE ou des CSE LMX1A (Cellules FoxA2⁺ : CSE CONTRÔLE striatales 429.3 \pm 309.2 (n=3) et nigrales 679.4 \pm 438.6 (n=9) ; CSE LMX1A striatales 806.0 \pm 396.2 (n=4) et nigrales 610.2 \pm 266.5 (n=7)). Ceci démontrerait

que le site de transplantation et la séquence codante de LMX1A intégrée dans le génome des cellules n'induisent aucun effet sur la proportion des cellules exprimant FoxA2 dérivées des CSE au sein du transplant.

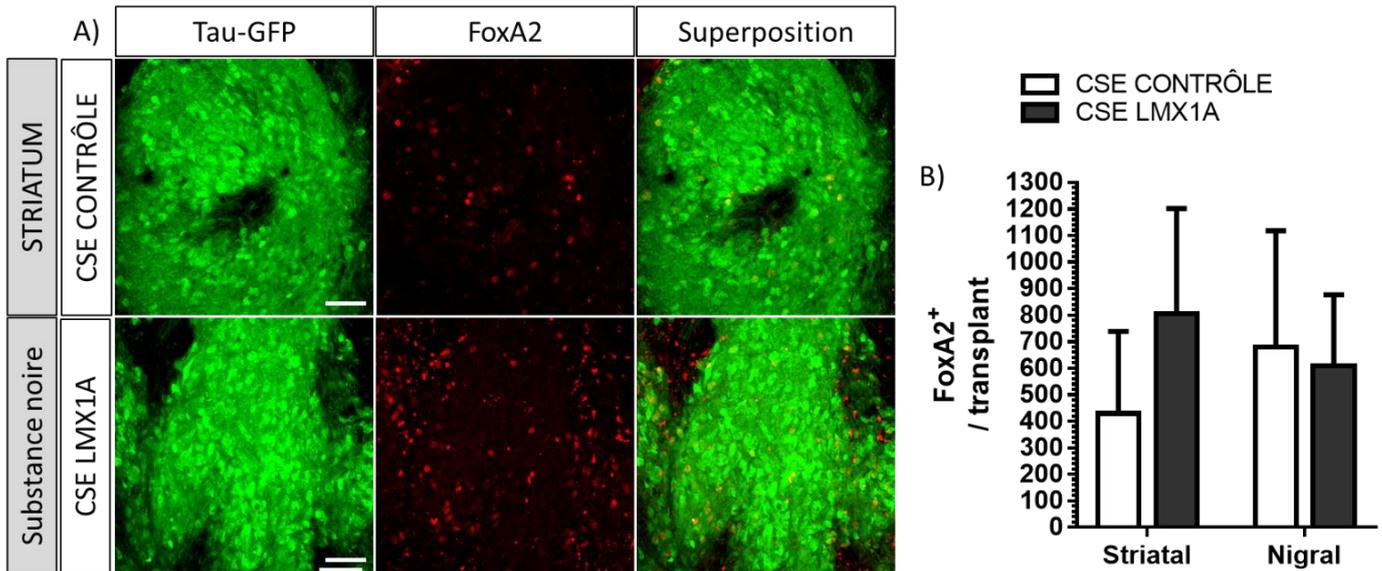


Figure 40: Analyse des cellules précurseurs des neurones DA du type MV au sein du transplant par l'expression de FoxA2.

Les photomicrographies à épifluorescence représentent des cellules coexprimant Tau-GFP (vert) et FoxA2 (rouge) pour les CSE CONTRÔLE à la ligne du haut et les CSE LMX1A pour la ligne du bas. La superposition des deux marquages est représentée dans la colonne de droite (A). Echelle : 50 μ m. Les données de l'histogramme indiquent le nombre moyen de cellules FoxA2⁺ par transplant pour les greffes striatales et nigrales avec des cellules issues des CSE CONTRÔLE (blanc, n=3 et n=9 respectivement) et des CSE LMX1A (gris, n=4 et n=7 respectivement). Les barres d'erreurs représentent \pm sem.

Outre les cellules DA et leurs précurseurs, l'intérêt a été porté sur les neurones sérotoninergiques en raison de leur capacité à induire des dyskinésies en présence de précurseurs de la dopamine chez les patients parkinsoniens (Barker and Kuan, 2010; Carta et al., 2007; Winkler et al., 2005). Les résultats semblent indiquer que le nombre de cellules exprimant la sérotonine est réduit pour les CSE LMX1A comparées entre les cellules dérivées des CSE CONTRÔLE ou des CSE LMX1A mais pas entre les différents sites de transplantation (Fig.41A,B). Ceci démontrerait que l'intégration de la séquence codante du gène LMX1A diminue la proportion des neurones sérotoninergiques différenciés *in vivo* à partir des précurseurs obtenus *in vitro* (CSE CONTRÔLE striatales 140.0 ± 28.1 (n=3) et nigrales 142.7 ± 29.4 (n=9) ; CSE LMX1A striatales 43.0 ± 12.7 (n=4) et nigrales 62.3 ± 15.6 (n=7)).

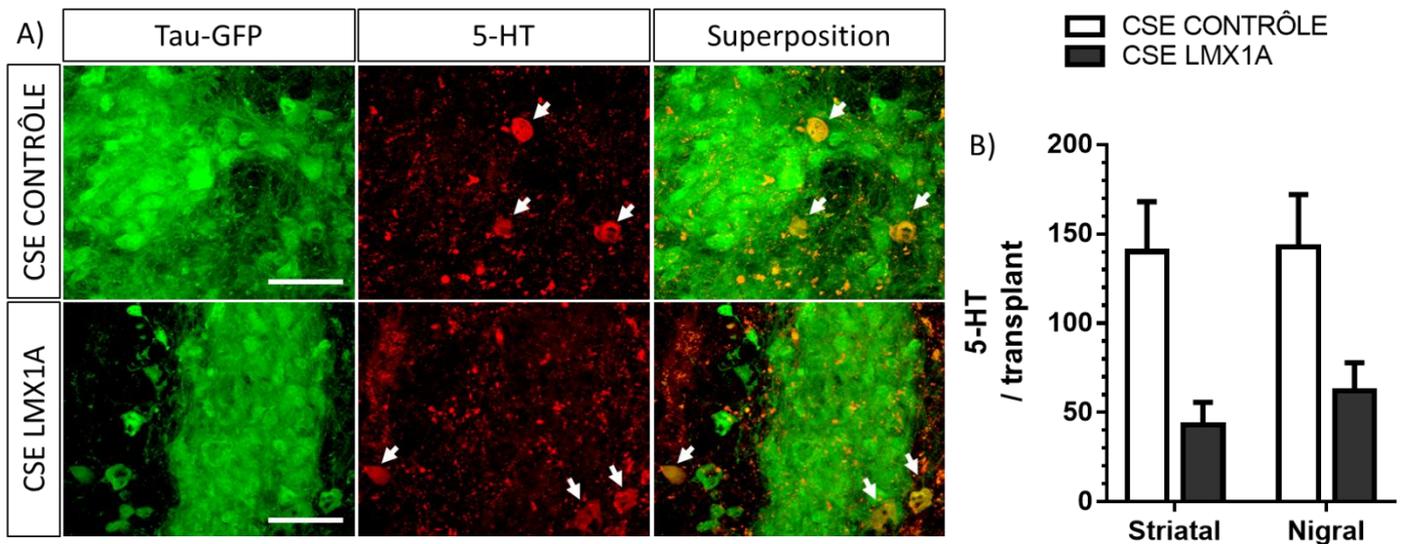


Figure 41: Analyses de la proportion de cellules différenciées à partir de CSE exprimant 5-HT au sein du transplant.

A) Les photomicrographies à épifluorescence représentent des cellules coexprimant Tau-GFP (vert) et 5-HT (rouge) pour les CSE CONTRÔLE à la ligne du haut et les CSE LMX1A pour la ligne du bas. La superposition des deux marquages est représentée dans la colonne de droite. Les flèches blanches indiquent des cellules co-exprimées. Echelle : 50 μ m. B) Les données de l'histogramme indiquent le nombre moyen de cellules 5-HT⁺ par rapport au volume du transplant pour les transplantations striatales et nigrales avec les CSE CONTRÔLE (blanc, n=3 et n=9 respectivement) et les CSE LMX1A (gris, n=4 et n=7 respectivement).

D. Analyses des fibres issues du transplant

Les fibres neuronales issues des transplants ont été étudiées à l'aide du marqueur neuronal Tau-GFP (Fig. 42). L'ensemble des souris transplantées ont présenté un greffon avec des fibres exprimant la Tau-GFP que ce soit pour les cellules dérivées des CSE CONTRÔLE ou des CSE LMX1A et qu'elles soient transplantées dans le striatum (Fig. 42A) ou la SN (Fig. 42B). Bien que des fibres des transplants intra-nigraux empruntent la voie nigrostriée et projettent jusqu'au striatum, ce sont les greffes intra-striatales qui présentent une grande quantité de fibres neuronales au niveau du striatum et notamment du striatum dorsal et plus particulièrement les souris transplantées avec des cellules issues des CSE LMX1A (Fig. 42A). Ainsi le striatum ayant conservé un transplant et l'intégration de la séquence codante de LMX1A serait les meilleures conditions expérimentales pour réinnervier le striatum dorsal désinnervé en fibres neuronales suite à l'injection de 6-OHDA au sein de la SN.

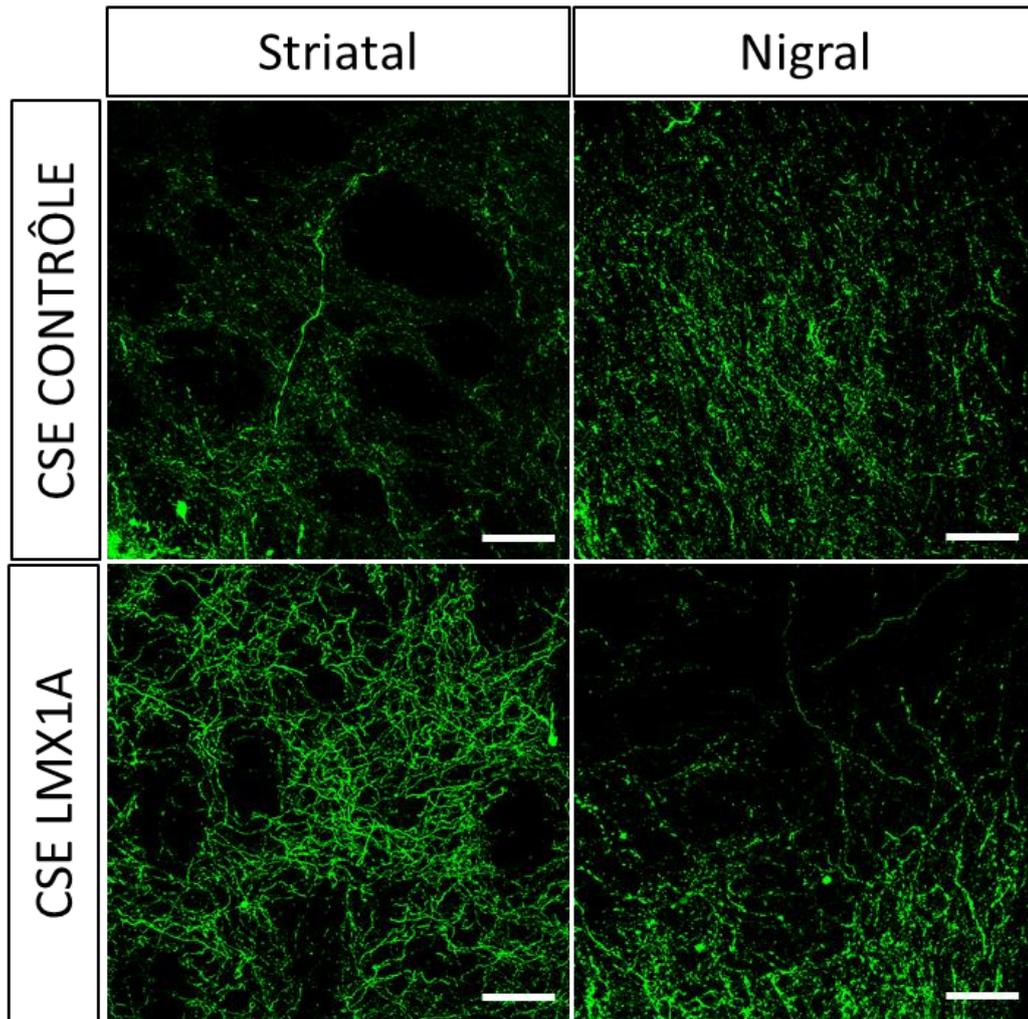


Figure 42: Projections neuronales issues des cellules transplantées au sein du striatum ou de la SN dérivées des CSE CONTRÔLE ou des CSE LMX1A.

Les photomicrographies d'un microscope confocale représentent le marquage de Tau-GFP (vert) au niveau de fibres issues de transplant intra-striataux (colonne de gauche) et intra-nigraux (colonne de droite), neuf semaines après les transplantations des cellules dérivées des CSE CONTRÔLE pour la ligne du haut et les CSE LMX1A pour la ligne du bas. Echelle : 50 μ m.

DISCUSSION

L'amélioration des techniques de thérapie de remplacement cellulaire pour la MP est l'une des thématiques de notre équipe. Cette stratégie thérapeutique a pour but de réduire les déficits moteurs développés par les patients parkinsoniens grâce à la transplantation de nouveaux neurones à dopamine du sous-type SNpc. Il a été démontré au sein du laboratoire que les troubles moteurs dont les déficits des compétences motrices fines, dans un modèle murin de la MP, peuvent être réduits par la transplantation de cellules fœtales murines du MV au sein de la SN. Au vu des problèmes éthiques et logistiques soulevés par l'utilisation de cellules fœtales pour une thérapie de remplacement cellulaire chez l'Homme, nous nous sommes intéressés aux cellules souches pluripotentes comme source alternative. Ainsi, dans cette étude, l'objectif a été d'obtenir des neurones à DA du type nigral à partir de CSE et d'évaluer leur potentiel thérapeutique en les transplantant au sein de la SN ou du striatum dans un modèle murin de la MP.

De nombreuses études ont d'ores et déjà démontré la possibilité de générer des précurseurs DA du MV à partir de CSE murines ainsi que leurs capacités à réduire des déficits moteurs après transplantation au sein du striatum d'un modèle animal de la MP (Barberi et al., 2003; Ganat et al., 2012; Martinat et al., 2006). Cependant, aucune de ces études n'a étudié l'impact de la transplantation intra-nigrale de cette source de cellules sur le développement des cellules greffées et leurs capacités à réduire les déficits des compétences motrices fines. Afin de répondre à cette problématique, le premier objectif de cette étude a été de produire, *in vitro*, une grande quantité de précurseurs DA nigraux. Pour cela, la lignée de cellules souches embryonnaires murines D3 Tau-GFP a été différenciée à l'aide d'un protocole utilisant la formation de corps embryonnaires, pour générer des cellules souches neurales. Après différenciation des cellules souches neurales, le phénotype DA de type nigral a par la suite été analysé grâce à la co-expression du marqueur catécholaminergique TH et GIRK2, un marqueur de neurones DA de type SNpc communément utilisé.

Nos résultats préliminaires ont mis en évidence une faible proportion de cellules TH coexprimant GIRK2 et une majorité de neurones DA co-exprimant la TH et la Calbindine, un marqueur de neurones DA de type ATV. Au vu de ces résultats, nous nous sommes concentrés sur l'augmentation de la proportion des neurones DA de type SNpc

générés *in vitro*. Pour cela, l'intégration forcée du gène *LMX1A*, un facteur de transcription essentiel à la spécification et à la survie des neurones DA nigraux, a été utilisé. En s'inspirant des travaux de Friling et collaborateurs (Friling et al., 2009), la séquence codante de *LMX1A* a été transfectée au sein des cellules D3 Tau-GFP sous le contrôle de l'amplificateur de la nestine, un marqueur des cellules souches neurales. L'intégration de la séquence codante de *LMX1A* au sein du génome des cellules a été évaluée en mesurant la proportion de cellules exprimant *LMX1A* lors du développement ainsi que le nombre de neurones DA nigraux différenciés *in vitro*. Les résultats des CSE *LMX1A* ont été comparés à ceux obtenus avec des cellules différenciées à l'identique mais non-transfectées, les CSE dites CONTRÔLE.

Dans un premier temps, l'intégration de la séquence codante de *LMX1A* au sein du génome des CSE D3 Tau-GFP a été confirmée par PCR. Puis, lors du protocole de différenciation, un nombre jusqu'à trois fois plus important de cellules co-exprimant *LMX1A* et la TH a été mis en évidence pour les cellules dérivées des CSE *LMX1A* comparées aux cellules dérivées des CSE CONTRÔLE. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Friling et collègues qui présentent également une augmentation trois fois plus importante de cellules co-exprimant *LMX1A* et la TH après transfection de la séquence codante de *LMX1A* au sein de la lignée cellulaire de CSE murine E14.1 (Friling et al., 2009). Ceci valide ainsi l'efficacité de l'intégration de ce gène au sein des CSE. Suite à cela, le nombre des cellules DA de type A9 *in vitro* dérivées des CSE *LMX1A* a été étudié et comparé aux CSE CONTRÔLE.

Tout d'abord, les résultats des CSE CONTRÔLES différenciées en neurones DA de type SNpc sont présentés dans ce paragraphe. Les résultats observés dans notre étude mettent en évidence la présence de $8.7 \pm 2.7\%$ de cellules TH co-exprimant GIRK2 après 10 jours de différenciation *in vitro*. Bien que Hayashi et al. en 2008 et Friling et al. en 2009 ont ultérieurement indiqué la co-expression de TH et GIRK2 *in vitro* (Friling et al., 2009; Hayashi et al., 2008), aucune étude quantitative n'a été effectuée sur le pourcentage de la co-expression de ces deux marqueurs. Nous sommes ainsi les premiers à estimer le nombre de neurones TH co-exprimant GIRK2 après différenciation des CSE murines. Cependant, ce pourcentage est très inférieur à celui obtenu à partir de cellules fœtales murines ou humaines *in vivo*. En effet, Mendez et collaborateurs ainsi que Thompson et

collègues indiquent une proportion comprise entre 40 et 60% de cellules TH co-exprimant GIRK2 au sein de transplants intra-striataux de neurones DA du type MV (Mendez et al., 2005; Thompson et al., 2005b). Le faible nombre de neurones TH co-exprimant GIRK2 généré *in vitro* ne permet donc pas l'utilisation de cette source de cellule pour la transplantation. En effet, il a été démontré qu'après la transplantation, seuls les neurones DA du type nigral ont la capacité de réinnover le striatum dorsal (Grealish et al., 2010; Mendez et al., 2005; Thompson et al., 2005b). La différence de proportion de neurones TH co-exprimant GIRK2 entre les neurones DA obtenus à partir de CSE et ceux obtenus à partir du MV fœtal pourrait s'expliquer par le protocole de différenciation *in vitro* ne reproduisant pas suffisamment les conditions extra- et intra-cellulaires établies lors du développement embryonnaire des neurones A9. En effet, l'absence de facteurs et/ou de signaux spécifiques *in vitro* pourraient limiter l'induction de la différenciation en neurones à dopamine du type MV, mais aussi la survie et la maturation des neurones DA du sous-type nigral. Cette théorie est notamment confortée par la diminution de cellules exprimant des marqueurs des précurseurs DA mésencéphaliques, tels que FoxA2, LMX1A ou encore Nurr1, que nous avons mis en évidence entre le 4^{ème} et 6^{ème} jour de différenciation. Nos résultats semblent indiquer un manque de facteurs et/ou des signaux *in vitro* pour maintenir une génération stable dans le temps des précurseurs DA de type MV. Ceci suggère ainsi que des facteurs et/ou des signaux additionnels seraient nécessaires pour produire un nombre plus important et plus stable de précurseurs DA de type MV dans le but de générer une grande quantité des neurones DA de la SNpc matures. En 2011, Chung et collègues soulignent l'importance des facteurs environnementaux présents *in vitro* pour la survie cellulaire, en particulier des futurs neurones DA du MV. En effet, après avoir purifié par cytométrie de flux des précurseurs précoces des neurones à dopamine du MV, c'est-à-dire les cellules de la plaque du plancher co-exprimant les marqueurs Otx2 et CORIN, une mort cellulaire massive a été décrite lors de la différenciation et la maturation des cellules Otx2/CORIN. En revanche, en présence du milieu de culture dans lequel ces cellules avaient été incubées avant le tri cellulaire, les cellules ont survécu lors de leur différenciation (Chung et al., 2011). Ceci démontre ainsi l'importance des facteurs et signaux présents dans l'environnement et leur impact lors de la survie et la différenciation des neurones DA A9. Une autre possibilité pouvant expliquer la différence de proportion de neurones TH exprimant GIRK2 entre les CSE différenciées

in vitro et les neurones DA issues du MV fœtal pourrait être l'intervalle de temps choisi pour étudier la maturation cellulaire des CSE : J10. Il est possible que ce jour de différenciation ne soit pas celui présentant le plus de neurones matures. Cependant, dès le 15^{ème} jour de différenciation la proportion de neurones dans nos boîtes de culture semblait être réduite par rapport à J10. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés au 10^{ème} jour de différenciation en premier lieu qui présentait d'ores et déjà des marqueurs des cellules DA de type MV matures (TH co-exprimant GIRK2 ou la Calbindine). Un stade plus tardif pourrait être plus approprié car de nombreuses cellules expriment encore à ce jour la Nestine (résultats non-présentés). Bien que cette dernière soit un marqueur des CSN, elle est également caractéristique de la glie radiaire présente majoritairement à J10. Un autre résultat en faveur d'une maturation relativement restreinte au 10^{ème} jour de différenciation est le pourcentage important des cellules exprimant la TH qui ne co-expriment pas GIRK2 ou Calbindine. En effet, un pourcentage de cellules variant entre 60 à 90% ne co-exprime pas ces deux marqueurs. D'une part, ces résultats pourraient s'expliquer par l'expression très précoce de la TH par les neurones DA de type MV. D'autre part, ces cellules exprimant la TH et non la Calbindine ou GIRK2 pourraient être un type de cellules catécholaminergiques différent de celui des neurones DA mésencéphaliques. Par exemple, les cellules exprimant la TH pourraient être des neurones noradrénergiques ou adrénérgiques caractérisés par la co-expression de la TH avec la Dopamine β -Hydroxylase (DBH) ou encore des neurones DA olfactifs co-exprimant la TH et le GABA. Cependant, aucune étude différenciant des CSE de souris, à l'aide de protocoles de différenciation par ajout de facteurs de croissance et de morphogènes ou bien de co-cultures, ne révèle la présence de DBH ou de colocalisation TH/DBH au sein des cellules différenciées (Chung et al., 2002; Kim et al., 2006a; Lee et al., 2000b; Shintani et al., 2008). De plus, Lee et al. en 2000 ne démontrent aucune colocalisation entre la TH et le GABA après différenciation cellulaire (Lee et al., 2000a). Seuls les travaux de Chung et collègues (2002) indiquent la présence d'une colocalisation cellulaire pour la TH et le GABA sans pour autant révéler de pourcentage précis (Chung et al., 2002). Nos résultats préliminaires de co-marquages TH et GABA réalisés lors de deux expériences différentes (maximum n=2), n'ont révélé aucune cellule exprimant la TH avec le GABA. Ainsi, l'ensemble de ces informations semble indiquer que le 10^{ème} jour de différenciation des CSE murines *in vitro* n'est pas le jour de différenciation le plus approprié pour étudier la maturation des

neurones DA de type SNpc. Les résultats préliminaires concernant le pourcentage de cellules co-exprimant TH et DAT, un marqueur de maturation DA, viennent également appuyer la théorie de faible maturation cellulaire à J10. En effet, nos résultats préliminaires démontent que seulement $20.1\% \pm 6.0$ des CSE CONTRÔLE présentent une colocalisation de ces deux marqueurs. Les travaux de Rodriguez-Gomez et collègues (2007) ainsi que ceux de Chung et collaborateurs (2011) semblent également s'orienter vers cette hypothèse. En effet, une faible quantité de cellules co-exprimant la TH et le DAT a été rapporté au 20^{ème} et 7^{ème} jour de différenciation respectivement, sans toutefois révéler un pourcentage précis de cette proportion de cellules DA matures (Chung et al., 2011; Rodríguez-Gómez et al., 2007). Dans notre étude, il serait nécessaire d'augmenter le nombre d'expérience avec le marqueur DAT pour valider ces premiers résultats. Ainsi, pour conclure, les CSE CONTRÔLE sont capables de se différencier en neurones DA de types MV matures, mais en faible proportion. Le rôle de l'expression forcée de LMX1A au sein des CSE lors de la maturation cellulaire a alors étudié.

Le paragraphe suivant présente les résultats obtenus pour la différenciation en neurones DA de type SNpc à partir des CSE LMX1A. Après 10 jours de différenciation *in vitro*, nos observations mettent en évidence une hausse de près de 20% du nombre de cellules TH co-exprimant GIRK2 pour les cellules dérivées des CSE LMX1A comparées à celles dérivées des CSE CONTRÔLE, ce qui correspond à une proportion de cellules 3.2 fois plus importante. De plus, et à l'inverse des CSE CONTRÔLE, une augmentation des précurseurs mésencéphaliques ventraux, FoxA2 et Nurr1, est observée au 6^{ème} jour de différenciation par rapport au 4^{ème}. Ces résultats encourageraient ainsi, l'utilisation de la séquence codante de LMX1A pour enrichir une population neuronale en neurones à dopamine du MV. Ces observations sont en accords avec les résultats obtenus par Friling et al. avec des CSE de souris (Friling et al., 2009) et également avec d'autres études utilisant des espèces ou des types cellulaires différents (Cai et al., 2009; Wang et al., 2015b; Wu et al., 2015; Yan et al., 2013; Zhou et al., 2013). Néanmoins, la proportion de cellules TH co-exprimant GIRK2 issues des CSE LMX1A reste inférieure à celle obtenue *in vivo* avec des cellules fœtales du MV, à l'instar des CSE CONTRÔLE. Des raisons identiques à celles expliquées au paragraphe précédent pour la différence obtenue entre les CSE CONTRÔLE et les cellules fœtales du MV pourraient également expliquer le contraste

observé entre les CSE LMX1A et les cellules fœtales du MV. De manière surprenante, les résultats préliminaires de la maturation cellulaire DA ne semblent pas montrer d'augmentation de la proportion de cellules exprimant la TH et le DAT pour les cellules ayant intégré la séquence codante de LMX1A. Ce dernier ne semble donc pas avoir d'effet sur la maturation DA des cellules après différenciation *in vitro*. Ces résultats s'opposent à ceux obtenus par Friling et al. qui présentent un pourcentage jusqu'à 60% des cellules co-exprimant la TH et le DAT dérivées de CSE ayant intégré la séquence codante de LMX1A comparé à 10% pour les cellules contrôles (Friling et al., 2009). Des analyses complémentaires sont donc nécessaires pour confirmer l'action de LMX1A.

L'analyse de la co-expression des marqueurs TH et Calbindine révèle la présence de 40 à 50% de neurones à dopamine présentant un phénotype ATV pour les CSE CONTRÔLE au 10^{ème} jour de différenciation. Une proportion de neurones DA A10 légèrement plus importante a été obtenue *in vitro* par Chung et collègues, en 2011, en différenciant des précurseurs DA MV issues de CSE murines préalablement purifiés par cytométrie de flux grâce aux marqueurs de la plaque du plancher Otx2 et CORIN (56.3 ± 9.5% de cellules TH co-exprimant la Calbindine après 7 jours de différenciation) (Chung et al., 2011). De manière intéressante, cette proportion est proche de celles des neurones DA mésencéphaliques différenciés *in vivo* à partir de cellules fœtales du MV (40 à 60%) (Chung and Isaacson ; Mendez et al., 2005). Nos résultats montrent une proportion de cellules TH co-exprimant la Calbindine, dérivées des CSE LMX1A, identiques à celles des neurones DA mésencéphaliques différenciés *in vivo* à partir de cellules fœtales du MV. Sachant que LMX1A est spécifique des neurones DA du MV, il était attendu que la proportion de cellules TH co-exprimant la Calbindine augmente suite à l'intégration de la séquence codante de LMX1A dans le génome des cellules. Dans la littérature, il a été décrit qu'un pourcentage de cellules co-expriment les marqueurs TH, Calbindine et GIRK2. Cette proportion est de 20% dans le MV de souris contre 12% chez l'Homme (Reyes et al., 2012). Étant donné que notre proportion de cellules TH co-exprimant GIRK2 est augmentée de 20% après différenciation des CSE LMX1A, il serait intéressant de faire un triple marquage TH, GIRK2 et Calbindine afin d'identifier une population de neurones DA de type SNpc co-exprimant TH et GIRK2 seulement.

En plus des neurones DA, une analyse préliminaire des neurones non-DA, tels que les neurones GABAergiques, glutamatergiques, cholinergiques et sérotoninergiques, a été effectuée à J10 à l'aide des marqueurs GABA, VGLUT1, ChAT et sérotonine respectivement. Bien que des analyses complémentaires soient nécessaires, il semblerait que l'intégration de la séquence codante de LMX1A favorise la différenciation de neurones présentant un phénotype DA au détriment des phénotypes GABAergiques et glutamatergiques. Une diminution similaire à la proportion de neurones GABAergiques a été obtenue par Friling et collègues après l'intégration de la séquence codante de LMX1A dans la lignée cellulaire E14.1 (Friling et al., 2009). De plus, ils ont observé une diminution de leur nombre de neurones 5-HT dérivés de cellules LMX1A comparées à leurs cellules contrôles réduisant ainsi leur proportion de 18-25% à 0.1-1%. Nos résultats préliminaires, quant à eux, ne semblent pas indiquer de modifications du nombre de cellules exprimant la sérotonine pour les neurones issus des CSE LMX1A comparées aux CSE CONTRÔLE. Toutefois, il est à noter que la proportion de neurones 5-HT générés dans notre étude à partir des CSE CONTRÔLE et des CSE LMX1A est fortement réduite par rapport aux résultats obtenus par Friling et al., ($2.0 \% \pm 0.5$ et $2.0 \% \pm 0.8$ respectivement) (Friling et al., 2009). Concernant les neurones ACh, aucun neurone exprimant le ChAT n'a été observé *in vitro* après 10 jours de différenciation, dans les deux conditions cellulaires expérimentales. Bien que préliminaires, ces résultats sont en adéquation avec ceux publiés par Lee et ses collègues en 2000 (Lee et al., 2000a).

En résumé, l'intégration de la séquence codante de LMX1A est capable d'augmenter la proportion des précurseurs DA du MV lors de la différenciation *in vitro*. Ceci aboutit alors à une production de neurones DA exprimant GIRK2 plus importante par rapport aux cellules dérivées des CSE CONTRÔLE et, ce, au détriment d'autres sous-types neuronaux comme les neurones GABAergiques et glutamatergiques. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour valider l'augmentation de neurones DA du sous-type nigral par l'expression de LMX1A ainsi que son rôle dans cette différenciation. Il serait, par exemple, intéressant de reproduire ces résultats avec une autre colonie de cellules ayant été transfectées avec la séquence codante de LMX1A. De plus, quelques améliorations techniques pourraient être effectuées pour augmenter ces proportions de cellules TH co-exprimant GIRK2 *in vitro*. Dans un premier temps, il serait possible

d'augmenter la proportion de neurones (Tau-GFP) et notamment les neurones DA (Tau-GFP/TH) en apportant quelques modifications au protocole de différenciation. En effet, bien qu'une proportion identique de neurones ait été générée *in vitro* pour les CSE CONTRÔLE et les CSE LMX1A, ces proportions sont légèrement inférieures à celles retrouvées dans la littérature. Au dixième jour de différenciation, nos résultats indiquent la présence de neurones exprimant Tau-GFP à hauteur de 30 à 40%, s'élevant jusqu'à 60% à J6 (résultats non présentés). Cependant, Lee et ses collègues présentent $71.9 \pm 6.9\%$ de cellules Tuj1+/DAPI avec un protocole de différenciation identique (Lee et al., 2000a). En revanche, cette différence pourrait s'expliquer par le fait que l'étude ne mentionne pas le jour de maturation étudié. Nishimura et ses collègues (2003) présentent, quant à eux, un pourcentage proche de 80% de cellules MAP2/DAPI différenciées *in vitro* (Nishimura et al., 2003), tandis que Okabe et collaborateurs démontrent une proportion de cellules MAP2/DAPI supérieur à 60% après 11 jours de différenciation (Okabe et al., 1996). Cette différence pourrait provenir de l'utilisation de lignées cellulaires différentes, d'une analyse protéique hétérogène (Tau-GFP versus MAP2 et Tuj1) mais également de la difficulté à compter manuellement le nombre exact de cellules Tau-GFP⁺ *in vitro*. En effet, la présence de clusters de cellules rend difficile la pénétration des anticorps. En revanche, nos résultats sont en accords avec ceux obtenus par Kawasaki présentant $52 \pm 6.9\%$ de cellules Tuj1/DAPI après 12 jours d'induction en coculture avec les cellules PA6 (Kawasaki et al., 2000). Nos résultats ainsi que ceux obtenus par Martinat et al après la surexpression de deux autres acteurs moléculaires du développement embryonnaire des neurones DA du MV : Nurr1 et Pitx3 (Martinat et al., 2006), ne montrent pas de différence du nombre de neurones générés *in vitro* malgré l'intégration de séquence codante de ces acteurs clés. Ceci semblerait donc indiquer que des acteurs essentiels du développement des neurones DA mésencéphaliques n'influencent pas la différenciation neuronale et qu'il serait nécessaire d'utiliser d'autres techniques, facteurs ou signaux, pour augmenter la proportion de neurones *in vitro* et notamment de neurones synthétisant la TH. En effet, nos résultats mettent en évidence la présence de $13.2\% \pm 1.9$ cellules exprimant la TH parmi les cellules Tau-GFP issues des CSE CONTRÔLE. Nos résultats sont légèrement supérieurs à ceux obtenus, en 2002, par Chung et collaborateurs utilisant la même lignée cellulaire et un protocole identique après 15 jours de différenciation ($3.6 \pm 1.3\%$ et $4.2 \pm 1.4\%$ TH⁺/β-Tubuline⁺) (Chung et al., 2002) mais identiques à ceux obtenus par Rodríguez-

Gómez et al., et Xu et al., utilisant des lignées cellulaires différentes de celle utilisée (Rodríguez-Gómez et al., 2007; Xu et al., 2005). Cependant, la proportion de neurones TH générée dans nos cultures est inférieure à celle obtenue par Lee et collaborateurs en 2000 dont le protocole utilisé dans cette étude a été inspirée: $33.9 \pm 5.5\%$ TH⁺/Tuj1⁺ (Lee et al., 2000a). Seuls les travaux de Nishimura et collaborateurs, en 2003, présentent un pourcentage de cellules catécholaminergiques aussi important que celui obtenu par Lee et ses collègues (Nishimura et al., 2003). La différence du nombre de neurones exprimant TH pourrait être attribuée à l'utilisation de lignées cellulaires et de techniques de comptage différentes. En effet, des amas de cellules neuronales contenant les cellules synthétisant la TH apparaissent progressivement lors de la différenciation. Au vu de la difficulté à discriminer les cellules les unes des autres au sein de ces amas, les champs analysés lors de cette thèse ne comprenaient pas ces agglomérats cellulaires. Nous pensons que notre estimation des cellules catécholaminergiques est inférieure à la réalité. De manière intéressante, les protocoles utilisant des cellules nourricières telles que PA6 atteignent, eux aussi, un pourcentage de neurones exprimant la TH proche de 30% avec la lignée D3 ou une autre lignée cellulaire (Baier et al., 2004; Cho et al., 2006b; Kawasaki et al., 2000; Shintani et al., 2008). Ceci semble donc démontrer qu'avec des CSE de souris non-modifiées génétiquement le pourcentage maximal de neurones catécholaminergiques est proche de 30% *in vitro*.

Les cellules dérivées des CSE LMX1A expriment, quant à elles, $30.1\% \pm 4.4$ de cellules co-marquées par la TH et Tau-GFP. Ces résultats sont inférieurs à ceux de Friling et collaborateurs qui utilisent également la séquence codante de LMX1A. Avec un protocole de CE en cinq étapes la proportion de cellules TH⁺/Tuj1⁺ est comprise entre 45 et 75% atteignant jusqu'à 75 à 95% avec un protocole de différenciation utilisant des cellules nourricières (Friling et al., 2009). Cette différence pourrait être attribuée à l'utilisation d'une lignée cellulaire différente, à une technique de comptage différente mais aussi à une intégration de la séquence codante de LMX1A en plus grand nombre et à un site différent au sein du génome. L'expression d'autres acteurs clés tels que Nurr1 et Pitx3 ont également été forcée pour tester leur potentiel à générer des neurones DA de type MV. Environ 90% de neurones TH⁺ ont été obtenus après intégration de la séquence codante de Nurr1 seul (Cho et al., 2006b; Kim et al., 2006a, 2002b) ou avec celle de Pitx3

(Ganat et al., 2012; Martinat et al., 2006) dans des CSE murines. Ceci démontre ainsi qu'il est possible de générer un pourcentage conséquent (90%) de cellules catécholaminergiques parmi les neurones issus de CSE murines *in vitro*. Ces acteurs clés pourraient également être utilisés afin d'augmenter la proportion de neurones DA au sein de nos cultures. Il a également été démontré la possibilité d'intégrer deux facteurs dans le génome des CSE murines comme, par exemple, FoxA2 et Nurr1 (Lee et al., 2009) ou encore Nurr1 et Pitx3 (Ganat et al., 2012; Martinat et al., 2006) qui augmenterait la proportion de neurones DA matures de type MV. Il serait également envisageable de modifier certains paramètres du protocole de différenciation pour augmenter le nombre de neurones DA mésencéphalique *in vitro*. Par exemple, dans le protocole de différenciation utilisé dans notre équipe, le morphogène SHH est incorporé à l'étape de prolifération des CSN issues des CE. Or, Chung et collègues ont démontré que l'introduction de SHH lors de l'étape de sélection des CSN augmente la proportion de précurseurs DA du MV (Chung et al., 2014). Des facteurs extrinsèques participant à la différenciation des neurones DA du MV, autres que SHH et FGF-8, peuvent également être ajoutés au milieu de culture pour favoriser la différenciation DA mésencéphalique. Par exemple, il a été montré que Wnt, un acteur essentiel du développement embryonnaire, lorsqu'il est ajouté dans le milieu de culture, est capable d'augmenter le nombre de neurones DA du MV généré *in vitro* (Joyner, 1996; Kwon et al., 2014; Parish et al., 2008; Zhang et al., 2015). Comme décrit au paragraphe précédent, des cellules nourricières en co-culture, telles que les cellules MS5 ou PA6, peuvent être utilisées lors de la différenciation. Bien que Lee ainsi que Nishimura et leur collaborateurs démontrent qu'un pourcentage de neurones exprimant TH identique obtenu par l'utilisation d'un protocole CE ou de co-culture pour les CSE murines (Lee et al., 2000a; Nishimura et al., 2003), l'utilisation de cellules nourricières est techniquement plus simple et engendre une différenciation plus courte dans le temps comparée aux protocoles de CE. Cependant, les mécanismes responsables de la différenciation neuronale sont inconnus et compliquent l'optimisation et la standardisation de ce protocole, ce qui n'est pas le cas pour les méthodes utilisant des morphogènes dont les concentrations et les jours d'expositions sont contrôlés. De plus, une majorité des cellules utilisées en co-culture proviennent d'une espèce biologique différente des humains. Leur utilisation risque alors d'engendrer des xénotransmissions pathologiques limitant ainsi l'utilisation de ce protocole en clinique

(Hayashi et al., 2008). Pour contrecarrer ce problème, des protocoles exempts de xéno-contaminants ont également été développés (Mallon et al., 2006; Sidhu et al., 2008) (Amit and Itskovitz-Eldor, 2006; Amit et al., 2004; Mallon et al., 2006; Richards et al., 2002; Sidhu et al., 2006, 2008). Il a également été démontré que l'utilisation du milieu de cultures des cellules nourricières contenant des facteurs de sécrétions est suffisante pour augmenter la différenciation DA mésencéphalique. Ceci pourrait être une stratégie potentiellement utilisable pour augmenter la proportion des neurones DA A9, après avoir analysé la globalité des molécules présentes dans ces milieux (Chung et al., 2011). Une purification cellulaire est également possible pour augmenter les cellules d'intérêt *in vitro*. Hedlund et collègues ont également démontré que la purification des cellules exprimant Pitx3 génère une population de cellules exprimant la TH et Tuj1 enrichies jusqu'à 90% *in vitro* (Hedlund et al., 2008). Dans leur publication de 2011, Chung et ses collaborateurs soulignent également l'importance de la densité cellulaire pour augmenter la proportion des neurones DA MV *in vitro* (Chung et al., 2011). Ce que nous avons réalisé dans notre protocole avec la formation de gouttes de 70µl de milieu contenant 100 000 cellules sur les lamelles de cultures, lors de l'étape de prolifération des cellules souches neurales. Ces résultats mettent ainsi en relief l'importance du contact cellulaire lors de la différenciation neuronale. Bernreuther et ses collègues ont, par ailleurs, démontré l'importance de ce contact sur la différenciation en intégrant dans le génome de cellules une protéine impliquée dans l'adhésion des cellules neurales: L1 (Bernreuther et al., 2006). Ils ont ainsi démontré que cette adhérence cellulaire accentuée augmente de deux fois la proportion de neurones GABAergiques et catécholaminergiques *in vitro* et réduit la prolifération cellulaire. Ces deux paramètres, densité et contacts, confirment l'importance d'une croissance en amas cellulaire. Le protocole en cinq étapes de CE, mis en place par Lee et ses collègues en 2000 utilise ces cultures sphériques en suspension seulement à l'étape d'induction des CSP en CSN (étape II). Cependant, avec des CSE humaines, Cho et al., en 2008, ont utilisé cette technique de suspension cellulaire pour l'étape de prolifération neuronale (étape IV) en plus de l'étape II. Ils ont ainsi obtenu la plus grande proportion de neurones exprimant la TH (88%) sans modifications génomiques (Cho et al., 2008a). Il existe également de nouveaux protocoles de différenciation en 3D permettant la création de structures cellulaires dites « organoïdes cérébraux » qui reproduiraient les différentes étapes du développement embryonnaires et augmenteraient le nombre et la qualité des

neurones différenciés *in vitro* (Lancaster et al., 2013 ; pour pré-revue voir Chambers et al., 2013). Il existe également des supports de biomatériaux permettant une conformation cellulaire en 3D qui aiderait à l'obtention de neurones DA mésencéphaliques ventraux (Adil et al., 2017).

Au vu de l'augmentation de la proportion de cellules exprimant LMX1A et du nombre de cellules TH co-exprimant GIRK2 observée *in vitro*, le potentiel thérapeutique des cellules dérivées des CSE LMX1A a été examiné après transplantation au sein du striatum ou de la SN de souris ayant subi une lésion nigrale à la 6-OHDA. Ces résultats ont été comparés aux transplantations de cellules dérivées des CSE CONTRÔLE. Cependant, il était nécessaire de déterminer l'âge des cellules utilisées pour la transplantation. Pour cela, deux paramètres ont été étudiés *in vitro* : la perte de pluripotence des CSE ainsi qu'un nombre de précurseurs des neurones DA du MV.

Concernant la pluripotence, les facteurs OCT4 et SSEA1 ont été analysés lors de l'étape de différenciation du protocole. Nos résultats montrent que, dès le 4ème jour de différenciation, les cellules dérivées des CSE CONTRÔLE ou des CSE LMX1A n'expriment plus ni OCT4 ni SSEA1. Après transplantation de ces cellules au sein de la SN ou du striatum des souris ayant subi une lésion de la SN à la 6-OHDA, aucune des souris analysées n'a développé de tératomes jusqu'à neuf semaines post-transplantation. Bien que plusieurs études aient obtenus des résultats identiques en ayant utilisé des CSE de souris (Friling et al., 2009; Kim et al., 2002b; Shintani et al., 2008; Xu et al., 2005), d'autres publications indiquent la formation de tératome après transplantation (Bjorklund et al., 2002; Cho et al., 2006b; Fico et al., 2014; Ganat et al., 2012). Pour plus de sécurité pour une application clinique, un tri cellulaire ou encore une approche pharmacologie utilisant notamment des anti-tumeurs comme la mitomycine c peuvent être mis en place afin de réduire les risques de formations tumorales. Des inhibiteurs de voies de signalisation bloquant la différenciation neural (Parish et al., 2005; Sonntag et al., 2007) tel que des inhibiteurs de la voie de signalisation de cripto (Parish et al., 2005), peuvent également être administrés.

Concernant la proportion de précurseurs DA de type MV, Björklund et collaborateurs ont mis en évidence un âge optimal des cellules issues du MV embryonnaires à transplanter équivalant au stade embryonnaire de 14-15 jours (E14-E15)

pour les rats, (soit E12.5 chez la souris) c'est-à-dire avant leur dernière division cellulaire et leur développement axonal (Björklund et al., 1980; Voorn et al., 1988). D'autres études dont celles de Torres et al., en 2007, affinent ce résultat en démontrant que l'utilisation de cellules de rat à un stade encore plus précoce, E12.5, augmente davantage les chances de survie du greffon et du nombre de neurones DA du sous-type A9 et diminue la proportion de neurones 5-HT greffés chez le rat (Bye et al., 2012; Fjodorova et al., 2017; Torres et al., 2007, 2008a). Toutefois, les greffons âgés de E12 sont équivalents à ceux de E14 en terme de capacité à restaurer les déficits moteurs (Torres et al., 2008b). Dans cette thèse, les marqueurs de précurseurs DA du MV tels que Nurr1, FoxA2 et LMX1A ont été utilisés dans le but de transplanter des précurseurs le plus immatures possibles. Pour cela, nous nous sommes intéressés non pas aux cellules co-exprimant les marqueurs FoxA2, LMX1A ou Nurr1 avec Tau-GFP et la TH indiquant d'ores et déjà une maturation cellulaire. En revanche, les cellules présentant Foxa2, LMX1A ou Nurr1 seulement (FoxA2⁺/Tau-GFP⁻/TH⁻ ; LMX1A⁺/Tau-GFP⁻/TH⁻ ; Nurr1⁺/Tau-GFP⁻/TH⁻) ont été analysées au 4^{ème} et 6^{ème} jour de différenciation. À J4, les CSE CONTRÔLE et les CSE LMX1A présentent une plus grande proportion de précurseurs DA du MV immatures par l'expression de FoxA2 et Nurr1 seulement comparé au 6^{ème} jour de différenciation. De plus, une surexpression de LMX1A pour les CSE LMX1A comparées aux CSE CONTRÔLE a été mise en évidence au 4^{ème} et 6^{ème} jour de différenciation. Au vu de ces résultats les CSE CONTRÔLE et les CSE LMX1A ont été transplantées après quatre jours de différenciation au sein de la SN ou le striatum de souris ayant la SN lésée à la 6-OHDA.

Pour analyser l'impact des cellules greffées sur la fonctionnalité des cellules dérivées des CSE, deux tests comportementaux ont été réalisés. Le test de rotations induites par l'apomorphine a été utilisé afin de mesurer la restauration DA striatale alors que le test d'appréhension des membres antérieurs (test de l'escalier) a été effectué dans le but d'évaluer les compétences motrices fines des souris transplantées.

Notre hypothèse de départ était que seules les transplantations des cellules dérivées de CSE LMX1A engendreraient une réduction du nombre de rotations et ainsi une restauration des niveaux DA striataux déficitaires par la transplantation en striatal et qui serait plus efficace en nigral. En effet, Cho et el., n'ont démontré aucune restauration des niveaux de dopamine striataux suite à la transplantation au niveau du striatum des

cellules dérivées des CSE de la lignée cellulaire D3 non-modifiée génétiquement (Cho et al., 2006b). Alors que l'intégration de la séquence codante du gène *Nurr1* dans ces cellules réduit le nombre de rotations induites. De plus, des résultats antérieurs du laboratoire avec les cellules fœtales du MV ont démontré une réduction plus importante des rotations par les transplantations effectuées au sein de la SN comparées aux greffes intra-striatales dues à une restauration de la voie nigrostriée (Poster Droguerre et al., 2015, 2016, article en préparation). Après transplantations des souris, nos résultats semblent montrer une diminution du nombre moyen de rotations nettes pour le groupe de souris CSE LMX1A transplantées au sein du striatum et pour le groupe de souris CSE CONTRÔLE transplantées en intra-nigral. Ces résultats semblent être contradictoires avec ceux obtenus par Inden et ses collaborateurs, en 2005, qui ont démontré que la transplantation nigrale de cellules dérivées CSE murines ne restaurait pas le nombre de tours effectué par les animaux lors du test de rotations à l'amphétamine. Cependant, certains paramètres sont à prendre en compte avant de déduire quoique ce soit de nos résultats.

Tout d'abord, les analyses comportementales ont été compliquées par le faible nombre de souris présentant un greffon au sein du striatum neuf semaines post-transplantation. De plus, la mort de plusieurs souris suite à la lésion nigrale à la 6-OHDA nous a obligé à utiliser notre groupe de souris lésées pour la transplantation afin d'avoir un nombre de souris lésées à transplanter suffisamment important et utiliser également les résultats comportementaux d'une session de lésion précédente. L'analyse des résultats du test de rotations à l'apomorphine a également été compliquée par l'absence de mesures post-lésionnelles. Généralement, les résultats des tests de rotations après transplantation sont comparés à ceux obtenus après la lésion chez le même animal afin de mesurer le degré de la lésion DA dans un premier temps, puis analyser une éventuelle restauration fonctionnelle après transplantation. En outre, bien qu'aucun problème technique ne soit survenu lors de la réalisation du test d'appréhension des membres antérieurs et que celui-ci semble révéler une diminution du déficit moteur pour le groupe de souris transplantées en striatal avec les précurseurs dérivés des CSE LMX1A, ces résultats sont en contradiction avec des résultats ultérieurs obtenus par notre équipe. En effet, une amélioration fonctionnelle plus importante a été démontrée quand les neurones du MV embryonnaires sont greffés dans la SN que dans le striatum (Droguerre

et al.,). Des expériences complémentaires sont nécessaires pour déterminer l'influence du site de transplantation et de l'intégration de la séquence codante de LMX1A sur la restauration fonctionnelle observées après la transplantation de précurseurs DA dérivés de CSE LMX1A dans le striatum.

En effet, après avoir réalisé des immunohistochimies dirigées contre le marqueur neuronal Tau-GFP pour révéler la présence de neurones issus des cellules transplantées, nos résultats n'ont montré la moitié (55%) des animaux greffés au niveau du striatum que seulement présentait un greffon peu importe le type cellulaire utilisé. En revanche, une majorité de souris a présenté un greffon après transplantation au niveau de la SN (90% pour les souris CSE CONTRÔLE et 70% pour les souris CSE LMX1A). Ainsi, il semblerait que les transplantations intra-nigrales favoriseraient la survie des transplants comparées aux transplantations intra-striatales. Des résultats similaires ont été obtenus par Friling et al. après la transplantation de cellules dérivées de CSE murines transfectées avec la séquence codante de LMX1A au sein du striatum de rats lésés à la 6-OHDA (50% des rats transplantés ont présentés un transplant) (Friling et al., 2009). En revanche, Deacon et al. et Shintani et al. présentent une survie de 100% après transplantation dans le striatum de rats (Deacon et al., 1998; Shintani et al., 2008). Cette différence de survie cellulaire s'expliquerait par un stade de différenciation cellulaire non-similaire entre notre étude et celle de Friling, Deacon et Shintani. En effet, les cellules utilisées pour la transplantation dans les travaux de Deacon et ses collaborateurs ont été récoltées au 4ème jour de prolifération du stade de prolifération des CSN, alors que nos cellules sont issues du 4ème jour du stade de différenciation, soit près de 6 jours plus tard (Deacon et al., 1998). Par conséquent, la proportion de CSN est plus importante dans l'étude de Deacon. Dans les travaux de Shintani et collaborateurs, les cellules différenciées et transplantées étaient, quant à elles, accompagnées de cellules stromales de la moelle osseuse qui aident à la survie des cellules. Concernant le faible volume des transplants des souris observé dans cette étude, Kwon et ses collaborateurs présentent des résultats similaires (Kwon et al., 2014). En effet, leurs travaux comparant des transplantations de cellules dérivées de CSE murines avec les transplantations de cellules dérivées d'iPS murines indiquent que les transplants issus des CSE murines sont de petites tailles contrairement aux transplants issus des iPS qui sont larges dû à une dispersion des cellules au sein du striatum. De plus,

nos résultats semblent montrer une réduction du volume des transplants avec des cellules dérivées des CSE LMX1A. L'intégration de la séquence codante pourrait, ainsi, avoir un effet sur la survie et/ou la prolifération cellulaire. Des résultats similaires ont été obtenus par la Fico et collaborateurs (Fico et al., 2014). Des cellules exprimant de plus hauts niveaux de DOPA décarboxylase et DAT suite à la réduction du glypican-4, un marqueur des CSE, présentent des volumes de transplants plus petits comparés aux contrôles. Il serait intéressant d'étudier davantage le taux de survie et le volume des transplants des cellules dérivées des cellules souches pluripotentes pour une application thérapeutique de la MP.

Au sein de ces petits greffons, la proportion de cellules exprimant la TH ne semble pas être modifiée par le type de cellules utilisées ou le site de transplantation, avec un nombre compris entre 250 et 750 cellules par transplant. Cette proportion de cellules catécholaminergiques par transplant, supérieure à celle obtenue par Kim et collaborateurs (Kim et al., 2006a), correspond à la fourchette inférieure obtenue par les travaux de Hedlund et ses collègues en 2008 (entre 350 et 7000 cellules exprimant la TH par transplant) (Hedlund et al., 2008). Cependant, le nombre de cellules TH-positives dans notre étude est globalement inférieure à celui observé dans la littérature en utilisant ou non une lignée cellulaire et un protocole de différenciation identiques (Bjorklund et al., 2002; Ganat et al., 2012; Kawasaki et al., 2000; Thinyane et al., 2005). Cette différence pourrait dépendre de la lignée cellulaire utilisée (CSE D3). En effet, l'étude présentant le moins de neurones exprimant la TH par transplant est celle de Kim et ses collaborateurs ayant transplanté des cellules dérivées de CSE D3 transplantées au sein du striatum d'un modèle murin de la MP identique à celui que nous avons utilisé (entre 28 et 312 neurones TH+ par mm³) (Kim et al., 2006a). Des nombres de cellules catécholaminergiques supérieurs ont été indiqués après transplantation au sein du striatum de rats Sprague-Dawley lésés à la 6-OHDA de cellules dérivées de CSE D3 dans les études de Björklund et al., avec 2059 ± 62 cellules co-exprimant la TH et NeuN par greffon et celle de Cho et al. indiquant un nombre de cellules exprimant la TH de 52 ± 5 par coupe (comparé à nos résultats de maximum de 26.6 ± 13.4 cellules TH-positives par coupe) qui restent très éloignés des $22,830 \pm 8451$ cellules synthétisant la TH observé après transplantation de

cellules dérivées de CSE de la lignée B5 au sein du striatum d'un modèle murin de la MP (souris 129SvJ lésées à la 6-OHDA).

De manière surprenante, à l'inverse de la différenciation DA *in vitro*, les cellules dérivées des CSE LMX1A et greffées ne présentent pas d'augmentation du nombre de neurones exprimant la TH par rapport aux CSE CONTRÔLE. L'étude de Friling et collaborateurs utilisant également LMX1A sous le contrôle de l'amplificateur de la nestine, n'indiquent pas d'analyses du nombre de cellules TH-positives au sein du transplant que ce soit pour leurs cellules contrôles ou pour celles ayant intégré la séquence codante de LMX1A (Friling et al., 2009). Il en va de même pour une étude utilisant l'expression forcée de LMX1A au sein des CSE humaines (Cai et al., 2009). Ceci empêche ainsi la comparaison de nos résultats démontrant une perte d'augmentation de neurones DA après différenciation *in vivo*.

Concernant la proportion de cellules TH co-exprimant GIRK2 après différenciation *in vivo*: il ne semble pas y avoir de différence entre les deux types de cellules utilisées dans cette thèse. Bien que plusieurs études indiquent la présence de GIRK2 au sein de leurs transplants aucune quantification n'a été révélée (Bjorklund et al., 2002; Friling et al., 2009; Ganat et al., 2012; Rodríguez-Gómez et al., 2007). Par conséquent, nous ne pouvons pas comparer nos résultats avec d'autres études. Cependant, nos résultats semblent mettre en valeur un impact du site de transplantation sur le nombre de cellules TH co-exprimant GIRK2 au sein des transplants. En effet, environ 30 cellules GIRK2/TH sont présentes au sein des transplants intra-striataux alors qu'elles ne sont qu'à un nombre inférieur à 10 cellules pour les greffes intra-nigrales. Des analyses complémentaires sont donc nécessaires pour valider ces résultats au vu du faible volume et du nombre limité de souris présentant un transplant.

Des cellules exprimant la TH et la Calbindine ont également été démontrées au sein des transplants. La présence de neurones exprimant ces marqueurs DA de type ATV ont, en outre, été retrouvés dans la littérature (Bjorklund et al., 2002; Fico et al., 2014; Ganat et al., 2012; Rodríguez-Gómez et al., 2007). À l'instar de l'*in vitro*, aucune différence du nombre de cellules TH co-exprimant la Calbindine n'a été observée parmi les cellules greffées à partir des CSE CONTRÔLE ou des CSE LMX1A, que ce soit au niveau du striatum

ou de la SN. De plus, le pourcentage de ces cellules est similaire à celui observé dans les travaux de Fico et ses collaborateurs en 2014 (entre 40 et 80% des cellules TH-positives expriment la Calbindine) (Fico et al., 2014).

Des cellules exprimant DAT, sont également présentes au sein des greffes comme c'est le cas dans plusieurs autres études (Barberi et al., 2003; Bjorklund et al., 2002; Fico et al., 2014; Kim et al., 2002b; Rodríguez-Gómez et al., 2007). Toutefois, le nombre et le pourcentage des cellules exprimant le DAT et la TH restent faibles *in vitro* ou *in vivo*, et ce, peu importe le site de transplantation. En revanche, le pourcentage de cellules exprimant DAT parmi les cellules catécholaminergiques semble être supérieur pour les CSE LMX1A. Cette proportion reste par ailleurs inférieure à celles obtenues par Fico et al. en 2014 (environ 50%) (Fico et al., 2014) et par Barberi et al. (>70%) (Barberi et al., 2003). Cette quantité réduite de neurones dopaminergiques exprimant DAT semble mettre en relief un problème de maturation des cellules malgré l'intégration de LMX1A. L'analyse du marqueur des neurones DA du MV précoces et matures FoxA2 semblent confirmer cette théorie. Présent au sein des transplants, le nombre total des cellules exprimant FoxA2 est supérieur au nombre de cellules exprimant la TH. Ainsi, des cellules précurseurs des neurones DA de type MV, encore indifférenciées neuf semaines après la transplantation, pourraient être présentes dans les greffons. Il serait intéressant d'analyser le phénotype, l'intégration et la fonctionnalité du transplant à un temps de post-transplantation supérieur à neuf semaines.

En résumé, les souris transplantées avec des cellules dérivées des CSE LMX1A semblent présenter un pourcentage plus important de cellules matures co-exprimant la TH et DAT par rapport aux souris transplantées avec des cellules issues des CSE CONTRÔLE. De plus, les groupes de souris transplantées en intra-striatal semblent avoir différencié un plus grand nombre de cellules co-exprimant la TH et GIRK2 au sein des greffons comparés aux transplantations intra-nigrales. La combinaison de ces deux paramètres pourrait être responsable de la réduction du nombre de rotations induites par l'apomorphine et de l'augmentation du pourcentage de pellets collectées du côté controlatéral par rapport au côté ipsilatéral pour le groupe de souris CSE LMX1A transplanté au sein du striatum seulement. Le nombre de fibres Tau-GFP DA au sein du striatum et plus particulièrement au sein du striatum dorsal étant majoritaire pour le

groupe de souris CSE LMX1A transplanté en striatal semble confirmer cette hypothèse. Ainsi une transplantation intra-striatale, avec de CSE LMX1A, serait capable de rétablir les niveaux de dopamine striataux et de restaurer des compétences motrices fines comme l'appréhension des membres antérieurs. Cependant, il est nécessaire de compléter ces résultats et d'augmenter le nombre d'animaux greffés afin de valider ces observations. En effet, il a été estimé que le nombre de neurones DA dans un transplant est corrélé à la restauration motrice et qu'un nombre minimal de 100 à 1000 cellules DA par transplant chez le rongeur est requis pour obtenir un bénéfice thérapeutique (Björklund and Isacson, 2002; Brundin et al., 1985). Dans cette étude, bien que le nombre de cellules exprimant la TH soit supérieur à 100 pour tous les groupes de souris transplantés, le nombre de neurones co-exprimant la TH et GIRK2 est inférieur à 100. Ces résultats sont en adéquation avec nos travaux antérieurs montrant qu'il ne suffit pas de greffer des neurones DA pour obtenir un bénéfice thérapeutique il faut que les neurones greffés soient du sous-type MV.

En plus d'une analyse des neurones DA de type MV, nous nous sommes intéressés dans cette étude, à la proportion de neurones 5-HT présents au sein des greffons au vu de leurs risques à induire des dyskinésies après transplantation comme ça a été déjà démontré chez les patients parkinsoniens (Barker and Kuan, 2010; Carta et al., 2007; Winkler et al., 2005). Comme plusieurs études le démontrent (Barberi et al., 2003; Fico et al., 2014; Friling et al., 2009; Hedlund et al., 2008), nos résultats indiquent que peu de neurones 5-HT sont présents au sein des transplants. Comparés aux nombres de neurones 5-HT et DA totaux, Fico et ses collaborateurs ont démontré la présence d'environ 11% des neurones 5-HT. Nos résultats montrent la même proportion de neurones 5-HT peu importe le site de transplantation. En revanche, les cellules dérivées des CSE LMX1A semblent, quant à elles, induisent une diminution du nombre de cellules sérotoninergiques après transplantation. Ces résultats sont en adéquations avec ceux obtenus par Friling et al. (Friling et al., 2009). Il serait intéressant de compléter ces premiers résultats par l'analyse d'autres types neuronaux, par exemple le type GABAergiques majoritaire après différenciation *in vitro* ou la présence des neurones glutamatergiques présents *in vitro* afin d'étudier leur impact suite à leur transplantation. Une quantification des astrocytes serait également importante au vu de leur présence en

grande quantité *in vitro* et de leur rôle dans la survie des neurones DA greffés. Des analyses approfondies des marqueurs de pluripotence au sein du transplant devraient être réalisées en utilisant d'autres marqueurs de pluripotence, comme SSEA1, Lin28 ou Nanog, afin de valider l'absence de CSP au sein des transplants. Une étude du potentiel prolifératif des cellules utilisant par exemple le marqueur Ki67, ou le BrdU, permettrait d'étudier le risque de croissance du volume du transplant délétère pour une thérapie de remplacement cellulaire. De plus, dans cette étude, 5 souris transplantées avec LMX1A sur les 12 souris avec un transplant ont présenté des cellules éloignées du site de transplantation en comparaison avec des CES CONTRÔLE. Étant donné que LMX1A joue un rôle dans la spécification cellulaire des neurones DA du MV mais également dans la localisation de ces cellules par migration ventrale au niveau de la plaque du plancher du mésencéphale (Kuwamura et al., 2005), il serait intéressant d'étudier l'impact de cette surexpression sur la migration des cellules greffées.

Concernant l'analyse des fibres, des travaux complémentaires concernant l'analyse de l'intégration des fibres DA issues des transplants dans le circuit cérébral de l'hôte pourrait être mis en place. Par exemple, un variant du virus de la rage portant un gène reporter fluorescent possédant la capacité d'un transport trans-synaptique rétrograde couplé à la technique de transparisation des tissus et une observation avec microscopie à feuille de lumière afin de visualiser les neurones transplantés et les neurones connectés de l'hôte (Doerr et al., 2017).

CONCLUSION

Le but de ce projet était donc d'obtenir de neurones DA du type nigral à partir de cellules souches embryonnaires murines et d'évaluer le potentiel thérapeutique de ces neurones dans un modèle animal de la MP. Nous avons montré, *in vitro*, que l'intégration de la séquence codante de LMX1A au sein du génome des CSE induit une augmentation de précurseurs et des neurones DA du type nigral et ce, au détriment de neurones non-DA tels que les neurones GABAergiques et glutamatergiques. Après transplantation dans la SN ou le striatum, les cellules survivent, expriment des marqueurs de neurones DA du type nigral et projettent vers le striatum, sans induire la formation de tératome. L'expression forcée de LMX1A semble augmenter la proportion de neurones DA matures après transplantation dans le striatum qui serait responsable d'une réduction des déficits moteurs induits par la 6-OHDA. Cependant, le taux de survie des cellules greffées en position striatale est plus faible en comparaison des cellules greffées en position nigrale.

PERSPECTIVES

Les cellules souches pluripotentes, dont les cellules souches embryonnaires murines mais également humaines, ont démontré leur capacité à se différencier en neurones à dopamine de la SNpc, *in vitro* ou après transplantations cérébrales. Ceci démontre ainsi le potentiel des CSP dans le cadre de la thérapie de remplacement cellulaire pour la MP. De nombreuses recherches se concentrent actuellement sur la mise au point de neurones à dopamine mésencéphaliques dérivés de CSE humaines, afin d'initier les premiers essais cliniques chez l'Homme (pour revues: Carpenter, 2017; Clinch et al., 2017; Kirkeby et al., 2017; Natalwala and Kunath, 2017; Studer, 2017; Takahashi, 2017). Bien que les CSE soient une source de cellules attrayante, de par leurs propriétés de pluripotence et de renouvellement, leur origine embryonnaire peut être un obstacle à une utilisation de routine en clinique. Pour parer à cela, d'autres sources de cellules sont actuellement étudiées. Par exemple, les cellules somatiques humaines reprogrammées en CSP (iPS) ou directement en neurones DA de type MV (Ni) peuvent être utilisées. En

plus de la réduction de rejet immunitaire qu'apporte l'utilisation de cellules autologues reprogrammées, les cellules iPS semblent présenter un plus grand taux de survie et une meilleure différenciation cellulaire comparée aux CSE, après transplantation au sein d'un modèle animal de la MP (Kwon et al., 2014). Bien que le choix de la source cellulaire soit primordial, de nombreuses améliorations techniques sont également nécessaires pour perfectionner la thérapie de remplacement cellulaire chez les patients parkinsoniens. En plus de l'optimisation des protocoles de différenciation, les techniques d'analyses de la survie et de l'intégration anatomiques du transplant doivent également être améliorées afin d'étudier au mieux le potentiel thérapeutique des cellules transplantées (pour revue: Van Camp et al., 2017). En plus de l'analyse de la restauration des déficits moteurs de la MP, les transplantations cellulaires devraient également examiner la réduction des symptômes non-moteurs afin de compléter les compétences thérapeutiques de la thérapie de remplacement cellulaire. Pour finir, cette stratégie thérapeutique devrait être testée en présence d'autres traitements afin de mettre en place une multi-thérapie efficace et complète de la MP, dans le but d'améliorer significativement le bien-être des patients parkinsoniens.

BIBLIOGRAPHIE

- Aarsland, D., Creese, B., Politis, M., Chaudhuri, K.R., ffytche, D.H., Weintraub, D., and Ballard, C. (2017). Cognitive decline in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.* *13*, 217–231.
- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilić, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., et al. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* *26*, 1276–1284.
- Abbott, R.D., Petrovitch, H., White, L.R., Masaki, K.H., Tanner, C.M., Curb, J.D., Grandinetti, A., Blanchette, P.L., Popper, J.S., and Ross, G.W. (2001). Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease. *Neurology* *57*, 456–462.
- Abercrombie, M. (1946). Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat. Rec.* *94*, 239–247.
- Addis, R.C., Hsu, F.-C., Wright, R.L., Dichter, M.A., Coulter, D.A., and Gearhart, J.D. (2011). Efficient conversion of astrocytes to functional midbrain dopaminergic neurons using a single polycistronic vector. *PLoS One* *6*, e28719.
- Adil, M.M., Rodrigues, G.M.C., Kulkarni, R.U., Rao, A.T., Chernavsky, N.E., Miller, E.W., and Schaffer, D.V. (2017). Efficient generation of hPSC-derived midbrain dopaminergic neurons in a fully defined, scalable, 3D biomaterial platform. *Sci. Rep.* *7*, 40573.
- Ahlskog, J.E., and Muentner, M.D. (2001). Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov. Disord.* *16*, 448–458.
- Allen, G.S., Burns, R.S., Tulipan, N.B., and Parker, R.A. (1989). Adrenal medullary transplantation to the caudate nucleus in Parkinson's disease. Initial clinical results in 18 patients. *Arch. Neurol.* *46*, 487–491.
- Altman, J., and Das, G.D. (1965). Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature* *207*, 953–956.
- Ambasudhan, R., Talantova, M., Coleman, R., Yuan, X., Zhu, S., Lipton, S.A., and Ding, S. (2011). Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions. *Cell Stem Cell* *9*, 113–118.
- Amit, M., Shariki, C., Margulets, V., and Itskovitz-Eldor, J. (2004). Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* *70*, 837–845.
- Andén, N.-E., Dahlström, A., Fuxe, K., and Larsson, K. (1965). Further evidence for the presence of nigro-neostriatal dopamine neurons in the rat. *Am. J. Anat.* *116*, 329–333.
- Anderegg, A., Poulin, J.-F., and Awatramani, R. (2015). Molecular heterogeneity of midbrain dopaminergic neurons--Moving toward single cell resolution. *FEBS Lett.* *589*, 3714–3726.
- Andersson, E., Tryggvason, U., Deng, Q., Friling, S., Alekseenko, Z., Robert, B., Perlmann, T., and Ericson, J. (2006a). Identification of Intrinsic Determinants of Midbrain Dopamine Neurons. *Cell* *124*, 393–405.
- Andersson, E., Jensen, J.B., Parmar, M., Guillemot, F., and Björklund, A. (2006b). Development of the mesencephalic dopaminergic neuron system is compromised in the absence of neurogenin 2. *Dev. Camb. Engl.* *133*, 507–516.

- Appel-Cresswell, S., Vilarino-Guell, C., Encarnacion, M., Sherman, H., Yu, I., Shah, B., Weir, D., Thompson, C., Szu-Tu, C., Trinh, J., et al. (2013). Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 28, 811–813.
- Aravantinou-Fatorou, K., Ortega, F., Chroni-Tzartou, D., Antoniou, N., Pouloupoulou, C., Politis, P.K., Berninger, B., Matsas, R., and Thomaidou, D. (2015). CEND1 and NEUROGENIN2 Reprogram Mouse Astrocytes and Embryonic Fibroblasts to Induced Neural Precursors and Differentiated Neurons. *Stem Cell Rep.* 5, 405–418.
- Arenas, E. (2002). Stem cells in the treatment of Parkinson's disease. *Brain Res. Bull.* 57, 795–808.
- Arenas, E., Denham, M., and Villaescusa, J.C. (2015). How to make a midbrain dopaminergic neuron. *Development* 142, 1918–1936.
- Athauda, D., and Foltynie, T. (2015). The ongoing pursuit of neuroprotective therapies in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.* 11, 25–40.
- Azzouz, M., Martin-Rendon, E., Barber, R.D., Mitrophanous, K.A., Carter, E.E., Rohll, J.B., Kingsman, S.M., Kingsman, A.J., and Mazarakis, N.D. (2002). Multicistronic lentiviral vector-mediated striatal gene transfer of aromatic L-amino acid decarboxylase, tyrosine hydroxylase, and GTP cyclohydrolase I induces sustained transgene expression, dopamine production, and functional improvement in a rat model of Parkinson's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 10302–10312.
- Baba, M., Nakajo, S., Tu, P.H., Tomita, T., Nakaya, K., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., and Iwatsubo, T. (1998). Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am. J. Pathol.* 152, 879–884.
- Backlund, E.O., Granberg, P.O., Hamberger, B., Knutsson, E., Mårtensson, A., Sedvall, G., Seiger, A., and Olson, L. (1985). Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism. First clinical trials. *J. Neurosurg.* 62, 169–173.
- Baier, P.C., Schindehütte, J., Thinyane, K., Flügge, G., Fuchs, E., Mansouri, A., Paulus, W., Gruss, P., and Trenkwalder, C. (2004). Behavioral changes in unilaterally 6-hydroxy-dopamine lesioned rats after transplantation of differentiated mouse embryonic stem cells without morphological integration. *Stem Cells Dayt. Ohio* 22, 396–404.
- Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J.E., and Gottlieb, D.I. (1995). Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev. Biol.* 168, 342–357.
- Baird, A.L., Meldrum, A., and Dunnett, S.B. (2001). The staircase test of skilled reaching in mice. *Brain Res. Bull.* 54, 243–250.
- Bally-Cuif, L., and Wassef, M. (1995). Determination events in the nervous system of the vertebrate embryo. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 450–458.
- Barberi, T., Klivenyi, P., Calingasan, N.Y., Lee, H., Kawamata, H., Loonam, K., Perrier, A.L., Bruses, J., Rubio, M.E., Topf, N., et al. (2003). Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nat. Biotechnol.* 21, 1200–1207.
- Barker, R.A., and Dunnett, S.B. (1999). Functional integration of neural grafts in Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 2, 1047–1048.

- Barker, R.A., and Kuan, W.-L. (2010). Graft-induced dyskinesias in Parkinson's disease: what is it all about? *Cell Stem Cell* 7, 148–149.
- Barker, R.A., Barrett, J., Mason, S.L., and Björklund, A. (2013). Fetal dopaminergic transplantation trials and the future of neural grafting in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 12, 84–91.
- Barker, R.A., Drouin-Ouellet, J., and Parmar, M. (2015). Cell-based therapies for Parkinson disease—past insights and future potential. *Nat. Rev. Neurol.* 11, 492–503.
- Beach, T.G., Adler, C.H., Sue, L.I., Vedders, L., Lue, L., White III, C.L., Akiyama, H., Caviness, J.N., Shill, H.A., Sabbagh, M.N., et al. (2010). Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 119, 689–702.
- Benabid, A.L., Pollak, P., Louveau, A., Henry, S., and de Rougemont, J. (1987). Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. *Appl. Neurophysiol.* 50, 344–346.
- Bennett, D.A., Beckett, L.A., Murray, A.M., Shannon, K.M., Goetz, C.G., Pilgrim, D.M., and Evans, D.A. (1996). Prevalence of parkinsonian signs and associated mortality in a community population of older people. *N. Engl. J. Med.* 334, 71–76.
- Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K., and Seitelberger, F. (1973). Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J. Neurol. Sci.* 20, 415–455.
- Bernreuther, C., Dihné, M., Johann, V., Schiefer, J., Cui, Y., Hargus, G., Schmid, J.S., Xu, J., Kosinski, C.M., and Schachner, M. (2006). Neural cell adhesion molecule L1-transfected embryonic stem cells promote functional recovery after excitotoxic lesion of the mouse striatum. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 11532–11539.
- Betarbet, R., Turner, R., Chockkan, V., DeLong, M.R., Allers, K.A., Walters, J., Levey, A.I., and Greenamyre, J.T. (1997). Dopaminergic neurons intrinsic to the primate striatum. *J. Neurosci.* 17, 6761–6768.
- Biglan, K.M., Oakes, D., Lang, A.E., Hauser, R.A., Hodgeman, K., Greco, B., Lowell, J., Rockhill, R., Shoulson, I., Venuto, C., et al. (2017). A novel design of a Phase III trial of isradipine in early Parkinson disease (STEADY-PD III). *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 4, 360–368.
- Björklund, A., and Dunnett, S.B. (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.* 30, 194–202.
- Björklund, A., and Stenevi, U. (1979). Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Res.* 177, 555–560.
- Björklund, L.M., and Isacson, O. (2002). Regulation of dopamine cell type and transmitter function in fetal and stem cell transplantation for Parkinson's disease. *Prog. Brain Res.* 138, 411–420.
- Björklund, A., Schmidt, R.H., and Stenevi, U. (1980). Functional reinnervation of the neostriatum in the adult rat by use of intraparenchymal grafting of dissociated cell suspensions from the substantia nigra. *Cell Tissue Res.* 212, 39–45.

- Björklund, A., Stenevi, U., Schmidt, R.H., Dunnett, S.B., and Gage, F.H. (1983). Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. II. Survival and growth of nigral cell suspensions implanted in different brain sites. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 522, 9–18.
- Bjorklund, L.M., Sánchez-Pernaute, R., Chung, S., Andersson, T., Chen, I.Y.C., McNaught, K.S.P., Brownell, A.-L., Jenkins, B.G., Wahlestedt, C., Kim, K.-S., et al. (2002). Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2344–2349.
- Blaess, S., and Ang, S.-L. (2015). Genetic control of midbrain dopaminergic neuron development: Dopaminergic neuron development. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 4, 113–134.
- Blesa, J., and Przedborski, S. (2014). Parkinson’s disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Front. Neuroanat.* 8.
- Blocq, P., Marinesco, G. (1893) Sur un cas de tremblement parkinsonien hémiparétique symptomatique d’une tumeur du pédoncule cérébral. *C R Soc Biol.*; 5 : 105-11
- Bové, J., Prou, D., Perier, C., and Przedborski, S. (2005). Toxin-induced models of Parkinson’s disease. *NeuroRx* 2, 484–494.
- Braak, H., Sandmann-Keil, D., Gai, W., and Braak, E. (1999). Extensive axonal Lewy neurites in Parkinson’s disease: a novel pathological feature revealed by alpha-synuclein immunocytochemistry. *Neurosci. Lett.* 265, 67–69.
- Braak, H., Rüb, U., Gai, W.P., and Del Tredici, K. (2003). Idiopathic Parkinson’s disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J. Neural Transm.* 110, 517–536.
- Brederlau, A., Correia, A.S., Anisimov, S.V., Elmi, M., Paul, G., Roybon, L., Morizane, A., Bergquist, F., Riebe, I., Nannmark, U., et al. (2006). Transplantation of human embryonic stem cell-derived cells to a rat model of Parkinson’s disease: effect of in vitro differentiation on graft survival and teratoma formation. *Stem Cells Dayt. Ohio* 24, 1433–1440.
- Briggs, R., and King, T.J. (1952). Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs’ Eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 38, 455–463.
- Brissaud E. (1893-1894). Nature et pathogénie de la maladie de Parkinson. In Meige H, editor. *Leçon sur les maladies nerveuses (Salpêtrière)*. Vol. 1, leçon 23. Paris : Masson ; 1895. P. 488-501.
- Brookmeyer, R., Gray, S., and Kawas, C. (1998). Projections of Alzheimer’s disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *Am. J. Public Health* 88, 1337–1342.
- Brooks, S.P., and Dunnett, S.B. (2009). Tests to assess motor phenotype in mice: a user’s guide. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 519–529.
- Brooks, D.J., Ibanez, V., Sawle, G.V., Quinn, N., Lees, A.J., Mathias, C.J., Bannister, R., Marsden, C.D., and Frackowiak, R.S. (1990). Differing patterns of striatal 18F-dopa uptake in Parkinson’s disease, multiple system atrophy, and progressive supranuclear palsy. *Ann. Neurol.* 28, 547–555.

- Brundin, P., and Björklund, A. (1987). Survival, growth and function of dopaminergic neurons grafted to the brain. *Prog. Brain Res.* *71*, 293–308.
- Brundin, P., Isacson, O., and Björklund, A. (1985). Monitoring of cell viability in suspensions of embryonic CNS tissue and its use as a criterion for intracerebral graft survival. *Brain Res.* *331*, 251–259.
- Brundin, P., Strecker, R.E., Widner, H., Clarke, D.J., Nilsson, O.G., Astedt, B., Lindvall, O., and Björklund, A. (1988). Human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease: immunological aspects, spontaneous and drug-induced behaviour, and dopamine release. *Exp. Brain Res.* *70*, 192–208.
- Brundin, P., Pogarell, O., Hagell, P., Piccini, P., Widner, H., Schrag, A., Kupsch, A., Crabb, L., Odin, P., Gustavii, B., et al. (2000). Bilateral caudate and putamen grafts of embryonic mesencephalic tissue treated with lazarets in Parkinson's disease. *Brain J. Neurol.* *123 (Pt 7)*, 1380–1390.
- Buytaert-Hoefen, K.A., Alvarez, E., and Freed, C.R. (2004). Generation of tyrosine hydroxylase positive neurons from human embryonic stem cells after coculture with cellular substrates and exposure to GDNF. *Stem Cells Dayt. Ohio* *22*, 669–674.
- Bye, C.R., Thompson, L.H., and Parish, C.L. (2012). Birth dating of midbrain dopamine neurons identifies A9 enriched tissue for transplantation into parkinsonian mice. *Exp. Neurol.* *236*, 58–68.
- Cai, J., Donaldson, A., Yang, M., German, M.S., Enikolopov, G., and Iacovitti, L. (2009). The role of Lmx1a in the differentiation of human embryonic stem cells into midbrain dopamine neurons in culture and after transplantation into a Parkinson's disease model. *Stem Cells Dayt. Ohio* *27*, 220–229.
- Caiazzo, M., Dell'Anno, M.T., Dvoretzkova, E., Lazarevic, D., Taverna, S., Leo, D., Sotnikova, T.D., Menegon, A., Roncaglia, P., Colciago, G., et al. (2011). Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature* *476*, 224–227.
- Caldwell, M.A. (2001). Recent advances in neural stem cell technologies. *Trends Neurosci.* *24*, 72–74.
- Carlsson, A. (1959). The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol. Rev.* *11*, 490–493.
- Carpenter, M.K. (2017). Regulatory considerations for pluripotent stem cell therapies. *Prog. Brain Res.* *230*, 151–163.
- Carta, M., Carlsson, T., Kirik, D., and Björklund, A. (2007). Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. *Brain* *130*, 1819–1833.
- Carvey, P.M., Ling, Z.D., Sortwell, C.E., Pitzer, M.R., McGuire, S.O., Storch, A., and Collier, T.J. (2001). A clonal line of mesencephalic progenitor cells converted to dopamine neurons by hematopoietic cytokines: a source of cells for transplantation in Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* *171*, 98–108.
- Cave, J.W., Wang, M., and Baker, H. (2014). Adult subventricular zone neural stem cells as a potential source of dopaminergic replacement neurons. *Front. Neurosci.* *8*, 16.

- Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat. Biotechnol.* *27*, 275–280.
- Chambers, S.M., Tchieu, J., and Studer, L. (2013). Build-a-brain. *Cell Stem Cell* *13*, 377–378.
- Chan-Palay, V., and Asan, E. (1989). Alterations in catecholamine neurons of the locus coeruleus in senile dementia of the Alzheimer type and in Parkinson's disease with and without dementia and depression. *J. Comp. Neurol.* *287*, 373–392.
- Charcot, J.M. (Jean M. (1872). *Leçons sur les maladies du système nerveux, faites a la Salpêtrière* (Paris, Delahaye).
- Chartier-Harlin, M.-C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., Levecque, C., Larvor, L., Andrieux, J., Hulihan, M., et al. (2004). Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet Lond. Engl.* *364*, 1167–1169.
- Chen, D., Fu, W., Zhuang, W., Lv, C., Li, F., and Wang, X. (2017). Therapeutic effects of intranigral transplantation of mesenchymal stem cells in rat models of Parkinson's disease. *J. Neurosci. Res.* *95*, 907–917.
- Chen, K., Hughes, S.M., and Connor, B. (2007). Neural progenitor cells derived from the adult rat subventricular zone: characterization and transplantation. *Cell Transplant.* *16*, 799–810.
- Chiba, S., Lee, Y.M., Zhou, W., and Freed, C.R. (2008). Noggin enhances dopamine neuron production from human embryonic stem cells and improves behavioral outcome after transplantation into Parkinsonian rats. *Stem Cells Dayt. Ohio* *26*, 2810–2820.
- Chin, M.H., Mason, M.J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiwu, O., Richter, L., Zhang, J., et al. (2009). Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* *5*, 111–123.
- Chin-Chan, M., Navarro-Yepes, J., and Quintanilla-Vega, B. (2015). Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Front. Cell. Neurosci.* *9*.
- Cho, M.-S., Hwang, D.-Y., and Kim, D.-W. (2008a). Efficient derivation of functional dopaminergic neurons from human embryonic stem cells on a large scale. *Nat. Protoc.* *3*, 1888–1894.
- Cho, M.S., Lee, Y.-E., Kim, J.Y., Chung, S., Cho, Y.H., Kim, D.-S., Kang, S.-M., Lee, H., Kim, M.-H., Kim, J.-H., et al. (2008b). Highly efficient and large-scale generation of functional dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 3392–3397.
- Cho, Y.H., Kim, D.-S., Kim, P.G., Hwang, Y.S., Cho, M.S., Moon, S.Y., Kim, D.-W., and Chang, J.W. (2006a). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells efficiently induce behavioral recovery in a Parkinsonian rat model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *341*, 6–12.
- Cho, Y.H., Kim, D.-S., Kim, P.G., Hwang, Y.S., Cho, M.S., Moon, S.Y., Kim, D.-W., and Chang, J.W. (2006b). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells efficiently

- induce behavioral recovery in a Parkinsonian rat model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *341*, 6–12.
- Christine, C.W., Starr, P.A., Larson, P.S., Eberling, J.L., Jagust, W.J., Hawkins, R.A., VanBrocklin, H.F., Wright, J.F., Bankiewicz, K.S., and Aminoff, M.J. (2009). Safety and tolerability of putaminal AADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology* *73*, 1662–1669.
- Chung, S., Sonntag, K.-C., Andersson, T., Bjorklund, L.M., Park, J.-J., Kim, D.-W., Kang, U.J., Isacson, O., and Kim, K.-S. (2002). Genetic engineering of mouse embryonic stem cells by *Nurr1* enhances differentiation and maturation into dopaminergic neurons. *Eur. J. Neurosci.* *16*, 1829–1838.
- Chung, S., Hedlund, E., Hwang, M., Kim, D.W., Shin, B.-S., Hwang, D.-Y., Kang, U.J., Isacson, O., and Kim, K.-S. (2005). The homeodomain transcription factor *Pitx3* facilitates differentiation of mouse embryonic stem cells into *AHD2*-expressing dopaminergic neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* *28*, 241–252.
- Chung, S., Leung, A., Han, B.-S., Chang, M.-Y., Moon, J.-I., Kim, C.-H., Hong, S., Pruzak, J., Isacson, O., and Kim, K.-S. (2009). *Wnt1-lmx1a* forms a novel autoregulatory loop and controls midbrain dopaminergic differentiation synergistically with the *SHH-FoxA2* pathway. *Cell Stem Cell* *5*, 646–658.
- Chung, S., Moon, J.-I., Leung, A., Aldrich, D., Lukianov, S., Kitayama, Y., Park, S., Li, Y., Bolshakov, V.Y., Lamonerie, T., et al. (2011). ES cell-derived renewable and functional midbrain dopaminergic progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 9703–9708.
- Chung, S., Moon, J., and Kim, K.-S. (2014). Improvement of neurological dysfunctions in aphakia mice, a model of Parkinson's disease, after transplantation of ES cell-derived dopaminergic neuronal precursors. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1213*, 285–291.
- Cif, L., and Hariz, M. (2017). Seventy years with the globus pallidus: Pallidal surgery for movement disorders between 1947 and 2017. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.*
- Cisbani, G., Maxan, A., Kordower, J.H., Planel, E., Freeman, T.B., and Cicchetti, F. (2017). Presence of tau pathology within foetal neural allografts in patients with Huntington's and Parkinson's disease. *Brain J. Neurol.* *140*, 2982–2992.
- Clarke, D.J., Brundin, P., Strecker, R.E., Nilsson, O.G., Björklund, A., and Lindvall, O. (1988). Human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease: ultrastructural evidence for synapse formation using tyrosine hydroxylase immunocytochemistry. *Exp. Brain Res.* *73*, 115–126.
- Clinch, S., Busse, M., Döbrössy, M.D., and Dunnett, S.B. (2017). Rehabilitation training in neural restitution. *Prog. Brain Res.* *230*, 305–329.
- Conley, B.J., Young, J.C., Trounson, A.O., and Mollard, R. (2004). Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *36*, 555–567.
- Cookson, M.R. (2010). The role of leucine-rich repeat kinase 2 (*LRRK2*) in Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *11*, 791–797.
- Cooper, O., Hargus, G., Deleidi, M., Blak, A., Osborn, T., Marlow, E., Lee, K., Levy, A., Perez-Torres, E., Yow, A., et al. (2010). Differentiation of human ES and Parkinson's disease

- iPS cells into ventral midbrain dopaminergic neurons requires a high activity form of SHH, FGF8a and specific regionalization by retinoic acid. *Mol. Cell. Neurosci.* *45*, 258–266.
- Cordeiro, K.K., Jiang, W., Papazoglou, A., Tenório, S.B., Döbrössy, M., and Nikkhah, G. (2010). Graft-mediated functional recovery on a skilled forelimb use paradigm in a rodent model of Parkinson's disease is dependent on reward contingency. *Behav. Brain Res.* *212*, 187–195.
- Cotzias, G.C., Van Woert, M.H., and Schiffer, L.M. (1967). Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N. Engl. J. Med.* *276*, 374–379.
- Cotzias, G.C., Papavasiliou, P.S., and Gellene, R. (1969). Modification of Parkinsonism--chronic treatment with L-dopa. *N. Engl. J. Med.* *280*, 337–345.
- Daadi, M.M., Grueter, B.A., Malenka, R.C., Redmond, D.E., and Steinberg, G.K. (2012). Dopaminergic neurons from midbrain-specified human embryonic stem cell-derived neural stem cells engrafted in a monkey model of Parkinson's disease. *PLoS One* *7*, e41120.
- Dahlström, A., and Fuxe, K. (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* *20*, 398–399.
- Das, B., Rajagopalan, S., Joshi, G.S., Xu, L., Luo, D., Andersen, J.K., Todi, S.V., and Dutta, A.K. (2017). A novel iron (II) preferring dopamine agonist chelator D-607 significantly suppresses α -syn- and MPTP-induced toxicities in vivo. *Neuropharmacology* *123*, 88–99.
- Date, I. (1996). Parkinson's disease, trophic factors, and adrenal medullary chromaffin cell grafting: basic and clinical studies. *Brain Res. Bull.* *40*, 1–19.
- De Lau, L.M., and Breteler, M.M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* *5*, 525–535.
- Deacon, T., Dinsmore, J., Costantini, L.C., Ratliff, J., and Isacson, O. (1998). Blastula-stage stem cells can differentiate into dopaminergic and serotonergic neurons after transplantation. *Exp. Neurol.* *149*, 28–41.
- Deep-Brain Stimulation for Parkinson's Disease Study Group, Obeso, J.A., Olanow, C.W., Rodriguez-Oroz, M.C., Krack, P., Kumar, R., and Lang, A.E. (2001). Deep-brain stimulation of the subthalamic nucleus or the pars interna of the globus pallidus in Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* *345*, 956–963.
- Defazio, G., Gigante, A., Mancino, P., and Tinazzi, M. (2013). The epidemiology of pain in Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996* *120*, 583–586.
- Defebvre, L., and Moreau, C. (2017). [Medical and surgical treatment of Parkinson's disease]. *Presse Medicale Paris Fr.* *1983* *46*, 218–224.
- Dehay, B., Bourdenx, M., Gorry, P., Przedborski, S., Vila, M., Hunot, S., Singleton, A., Olanow, C.W., Merchant, K.M., Bezard, E., et al. (2015). Targeting α -synuclein for treatment of Parkinson's disease: mechanistic and therapeutic considerations. *Lancet Neurol.* *14*, 855–866.
- DeKosky, S.T., and Marek, K. (2003). Looking backward to move forward: early detection of neurodegenerative disorders. *Science* *302*, 830–834.

- Del Tredici, K., and Braak, H. (2016). Review: Sporadic Parkinson's disease: development and distribution of α -synuclein pathology. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *42*, 33–50.
- Delaville, C., Deurwaerdère, P.D., and Benazzouz, A. (2011). Noradrenaline and Parkinson's Disease. *Front. Syst. Neurosci.* *5*.
- Deng, J., Shoemaker, R., Xie, B., Gore, A., LeProust, E.M., Antosiewicz-Bourget, J., Egli, D., Maherali, N., Park, I.-H., Yu, J., et al. (2009). Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. *Nat. Biotechnol.* *27*, 353–360.
- Deng, Q., Andersson, E., Hedlund, E., Alekseenko, Z., Coppola, E., Panman, L., Millonig, J.H., Brunet, J.-F., Ericson, J., and Perlmann, T. (2011). Specific and integrated roles of *Lmx1a*, *Lmx1b* and *Phox2a* in ventral midbrain development. *Development* *138*, 3399–3408.
- Dezawa, M., Kanno, H., Hoshino, M., Cho, H., Matsumoto, N., Itokazu, Y., Tajima, N., Yamada, H., Sawada, H., Ishikawa, H., et al. (2004). Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J. Clin. Invest.* *113*, 1701–1710.
- Ding, D., Xu, L., Xu, H., Li, X., Liang, Q., Zhao, Y., and Wang, Y. (2014). Mash1 efficiently reprograms rat astrocytes into neurons. *Neural Regen. Res.* *9*, 25–32.
- Dingemans, J., Jorga, K., Zürcher, G., Schmitt, M., Sedek, G., Da Prada, M., and Van Brummelen, P. (1995). Pharmacokinetic-pharmacodynamic interaction between the COMT inhibitor tolcapone and single-dose levodopa. *Br. J. Clin. Pharmacol.* *40*, 253–262.
- Doerr, J., Schwarz, M.K., Wiedermann, D., Leinhaas, A., Jakobs, A., Schloen, F., Schwarz, I., Diederhofen, M., Braun, N.C., Koch, P., et al. (2017). Whole-brain 3D mapping of human neural transplant innervation. *Nat. Commun.* *8*, 14162.
- Doetschman, T.C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., and Kemler, R. (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* *87*, 27–45.
- Dorsey, E.R., Constantinescu, R., Thompson, J.P., Biglan, K.M., Holloway, R.G., Kieburtz, K., Marshall, F.J., Ravina, B.M., Schifitto, G., Siderowf, A., et al. (2007). Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* *68*, 384–386.
- Doty, R.L. (2012). Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.* *8*, 329–339.
- Drucker-Colín, R., Madrazo, I., Ostrosky-Solís, F., Shkurovich, M., Franco, R., and Torres, C. (1988). Adrenal medullary tissue transplants in the caudate nucleus of Parkinson's patients. *Prog. Brain Res.* *78*, 567–574.
- Dunn, E.H. (1917). Primary and secondary findings in a series of attempts to transplant cerebral cortex in the albino rat. *J. Comp. Neurol.* *27*, 565–582.
- Dunnett, S.B., and Lelos, M. (2010). Behavioral analysis of motor and non-motor symptoms in rodent models of Parkinson's disease. *Prog. Brain Res.* *184*, 35–51.

- Dunnett, S.B., Björklund, A., Stenevi, U., and Iversen, S.D. (1981a). Behavioural recovery following transplantation of substantia nigra in rats subjected to 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. I. Unilateral lesions. *Brain Res.* 215, 147–161.
- Dunnett, S.B., Björklund, A., Stenevi, U., and Iversen, S.D. (1981b). Behavioural recovery following transplantation of substantia nigra in rats subjected to 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. II. Bilateral lesions. *Brain Res.* 229, 457–470.
- Dunnett, S.B., Björklund, A., and Lindvall, O. (2001). Cell therapy in Parkinson's disease - stop or go? *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 365–369.
- Ehringer, H., and Hornykiewicz, O. (1960). [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin. Wochenschr.* 38, 1236–1239.
- Elbaz, A., Carcaillon, L., Kab, S., and Moisan, F. (2016). Epidemiology of Parkinson's disease. *Rev. Neurol. (Paris)* 172, 14–26.
- Elkabetz, Y., Panagiotakos, G., Al Shamy, G., Socci, N.D., Tabar, V., and Studer, L. (2008). Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes Dev.* 22, 152–165.
- Evans, M.J., and Kaufma *Etat de santé de la population en France - 6^{ème} édition ; Direction de la recherche, des études, de l'évaluation et des statistiques (DREES) et Direction générale de la santé (DGS), Ministère des Affaires sociales et de la Santé, 2015).*
- n, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156.
- Fahn, S. (2015). The medical treatment of Parkinson disease from James Parkinson to George Cotzias: Treatment of PD From Parkinson to Cotzias. *Mov. Disord.* 30, 4–18.
- Fan, L., Hu, K., Ji, K., Sun, Q., Xiong, J., Yang, L., and Liu, H. (2014). Directed differentiation of aged human bone marrow multipotent stem cells effectively generates dopamine neurons. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 50, 304–312.
- Fathi, A., Rasouli, H., Yeganeh, M., Salekdeh, G.H., and Baharvand, H. (2015). Efficient differentiation of human embryonic stem cells toward dopaminergic neurons using recombinant LMX1A factor. *Mol. Biotechnol.* 57, 184–194.
- Fearnley, J.M., and Lees, A.J. (1991). Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114, 2283–2301.
- Fernandez, H.H., Standaert, D.G., Hauser, R.A., Lang, A.E., Fung, V.S.C., Klostermann, F., Lew, M.F., Odin, P., Steiger, M., Yakupov, E.Z., et al. (2015). Levodopa-carbidopa intestinal gel in advanced Parkinson's disease: final 12-month, open-label results. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 30, 500–509.
- Ferraye, M.U., Debû, B., Fraix, V., Goetz, L., Ardouin, C., Yelnik, J., Henry-Lagrange, C., Seigneuret, E., Piallat, B., Krack, P., et al. (2010). Effects of pedunculopontine nucleus area stimulation on gait disorders in Parkinson's disease. *Brain J. Neurol.* 133, 205–214.
- Ferreira, J.J., Lees, A., Rocha, J.-F., Poewe, W., Rascol, O., Soares-da-Silva, P., and Bi-Park 1 investigators (2016). Opicapone as an adjunct to levodopa in patients with

- Parkinson's disease and end-of-dose motor fluctuations: a randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet Neurol.* *15*, 154–165.
- Fico, A., de Chevigny, A., Melon, C., Bohic, M., Kerkerian-Le Goff, L., Maina, F., Dono, R., and Cremer, H. (2014). Reducing glypican-4 in ES cells improves recovery in a rat model of Parkinson's disease by increasing the production of dopaminergic neurons and decreasing teratoma formation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *34*, 8318–8323.
- Fjodorova, M., Torres, E.M., and Dunnett, S.B. (2017). Transplantation site influences the phenotypic differentiation of dopamine neurons in ventral mesencephalic grafts in Parkinsonian rats. *Exp. Neurol.* *291*, 8–19.
- Franklin, K.B.J., and Paxinos, G. (2008). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic Press).
- Freed, C.R., Rosenberg, N.L., Schneck, S.A., and Breeze, R.E. (1992). Improved drug responsiveness following fetal tissue implant for Parkinson's disease. *Neurochem. Int.* *20 Suppl*, 321S–327S.
- Freed, C.R., Greene, P.E., Breeze, R.E., Tsai, W.Y., DuMouchel, W., Kao, R., Dillon, S., Winfield, H., Culver, S., Trojanowski, J.Q., et al. (2001). Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* *344*, 710–719.
- Freed, W.J., Morihisa, J.M., Spoor, E., Hoffer, B.J., Olson, L., Seiger, A., and Wyatt, R.J. (1981). Transplanted adrenal chromaffin cells in rat brain reduce lesion-induced rotational behaviour. *Nature* *292*, 351–352.
- Freeman, T.B., Olanow, C.W., Hauser, R.A., Nauert, G.M., Smith, D.A., Borlongan, C.V., Sanberg, P.R., Holt, D.A., Kordower, J.H., and Vingerhoets, F.J. (1995). Bilateral fetal nigral transplantation into the postcommissural putamen in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* *38*, 379–388.
- Friling, S., Andersson, E., Thompson, L.H., Jönsson, M.E., Hebsgaard, J.B., Nanou, E., Alekseenko, Z., Marklund, U., Kjellander, S., Volakakis, N., et al. (2009). Efficient production of mesencephalic dopamine neurons by Lmx1a expression in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 7613–7618.
- Funayama, M., Hasegawa, K., Kowa, H., Saito, M., Tsuji, S., and Obata, F. (2002). A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann. Neurol.* *51*, 296–301.
- Gage, F.H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* *287*, 1433–1438.
- Gaillard, A., and Jaber, M. (2011). Rewiring the brain with cell transplantation in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* *34*, 124–133.
- Gaillard, A., Decressac, M., Frappé, I., Fernagut, P.O., Prestoz, L., Besnard, S., and Jaber, M. (2009a). Anatomical and functional reconstruction of the nigrostriatal pathway by intranigral transplants. *Neurobiol. Dis.* *35*, 477–488.
- Gaillard, A., Decressac, M., Frappé, I., Fernagut, P.O., Prestoz, L., Besnard, S., and Jaber, M. (2009b). Anatomical and functional reconstruction of the nigrostriatal pathway by intranigral transplants. *Neurobiol. Dis.* *35*, 477–488.
- Ganat, Y.M., Calder, E.L., Kriks, S., Nelander, J., Tu, E.Y., Jia, F., Battista, D., Harrison, N., Parmar, M., Tomishima, M.J., et al. (2012). Identification of embryonic stem cell-

- derived midbrain dopaminergic neurons for engraftment. *J. Clin. Invest.* *122*, 2928–2939.
- Gensburger, C., Labourdette, G., and Sensenbrenner, M. (1987). Brain basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation of rat neuronal precursor cells in vitro. *FEBS Lett.* *217*, 1–5.
- Gerfen, C.R., Baimbridge, K.G., and Miller, J.J. (1985). The neostriatal mosaic: compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *82*, 8780–8784.
- Gibb, W.R., and Lees, A.J. (1991). Anatomy, pigmentation, ventral and dorsal subpopulations of the substantia nigra, and differential cell death in Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *54*, 388–396.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Del Tredici, K., and Braak, H. (2012). 100 years of Lewy pathology. *Nat. Rev. Neurol.* *9*, 13–24.
- Goetz, C.G. (2011a). The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies. Cold Spring Harb. Perspect. Med. *1*, a008862–a008862.
- Goetz, C.G. (2011b). The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies. Cold Spring Harb. Perspect. Med. *1*, a008862–a008862.
- Goetz, C.G., Olanow, C.W., Koller, W.C., Penn, R.D., Cahill, D., Morantz, R., Stebbins, G., Tanner, C.M., Klawans, H.L., and Shannon, K.M. (1989). Multicenter study of autologous adrenal medullary transplantation to the corpus striatum in patients with advanced Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* *320*, 337–341.
- Goetz, C.G., Stebbins, G.T., Klawans, H.L., Koller, W.C., Grossman, R.G., Bakay, R.A., and Penn, R.D. (1991). United Parkinson Foundation Neurotransplantation Registry on adrenal medullary transplants: presurgical, and 1- and 2-year follow-up. *Neurology* *41*, 1719–1722.
- Golbe, L.I., Lieberman, A.N., Muentner, M.D., Ahlskog, J.E., Gopinathan, G., Neophytides, A.N., Foo, S.H., and Duvoisin, R.C. (1988). Deprenyl in the treatment of symptom fluctuations in advanced Parkinson's disease. *Clin. Neuropharmacol.* *11*, 45–55.
- Goldman, S.M. (2014). Environmental Toxins and Parkinson's Disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *54*, 141–164.
- Gong, L., Zhang, Q.-L., Zhang, N., Hua, W.-Y., Huang, Y.-X., Di, P.-W., Huang, T., Xu, X.-S., Liu, C.-F., Hu, L.-F., et al. (2012). Neuroprotection by urate on 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease: linking to Akt/GSK3 β signaling pathway. *J. Neurochem.* *123*, 876–885.
- Gopalakrishnan, S., Hor, P., and Ichida, J.K. (2017). New approaches for direct conversion of patient fibroblasts into neural cells. *Brain Res.* *1656*, 2–13.
- Gorell, J.M., Peterson, E.L., Rybicki, B.A., and Johnson, C.C. (2004). Multiple risk factors for Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* *217*, 169–174.
- Grealish, S., Jönsson, M.E., Li, M., Kirik, D., Björklund, A., and Thompson, L.H. (2010). The A9 dopamine neuron component in grafts of ventral mesencephalon is an important determinant for recovery of motor function in a rat model of Parkinson's disease. *Brain J. Neurol.* *133*, 482–495.

- Grealish, S., Diguët, E., Kirkeby, A., Mattsson, B., Heuer, A., Bramouille, Y., Van Camp, N., Perrier, A.L., Hantraye, P., Björklund, A., et al. (2014). Human ESC-derived dopamine neurons show similar preclinical efficacy and potency to fetal neurons when grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Cell Stem Cell* *15*, 653–665.
- Greenfield, J.G., and Bosanquet, F.D. (1953). The brain-stem lesions in Parkinsonism. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *16*, 213–226.
- Greig, S.L., and McKeage, K. (2016). Carbidopa/Levodopa ER Capsules (Rytary[®]), Numient[™]): A Review in Parkinson's Disease. *CNS Drugs* *30*, 79–90.
- Gross, R.E. (2008). What happened to posteroventral pallidotomy for Parkinson's disease and dystonia? *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* *5*, 281–293.
- Gugliandolo, A., Bramanti, P., and Mazzon, E. (2016). Mesenchymal stem cell therapy in Parkinson's disease animal models. *Curr. Res. Transl. Med.*
- Gustavsson, A., Svensson, M., Jacobi, F., Allgulander, C., Alonso, J., Beghi, E., Dodel, R., Ekman, M., Faravelli, C., Fratiglioni, L., et al. (2011). Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *Eur. Neuropsychopharmacol.* *21*, 718–779.
- Halliday, G.M., Blumbergs, P.C., Cotton, R.G., Blessing, W.W., and Geffen, L.B. (1990). Loss of brainstem serotonin- and substance P-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain Res.* *510*, 104–107.
- Halliday, G.M., McRitchie, D.A., Cartwright, H., Pamphlett, R., Hely, M.A., and Morris, J.G. (1996). Midbrain neuropathology in idiopathic Parkinson's disease and diffuse Lewy body disease. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* *3*, 52–60.
- Hanaway, J., McConnell, J.A., and Netsky, M.G. (1971). Histogenesis of the substantia nigra, ventral tegmental area of Tsai and interpeduncular nucleus: an autoradiographic study of the mesencephalon in the rat. *J. Comp. Neurol.* *142*, 59–73.
- Hargus, G., Cooper, O., Deleidi, M., Levy, A., Lee, K., Marlow, E., Yow, A., Soldner, F., Hockemeyer, D., Hallett, P.J., et al. (2010). Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 15921–15926.
- Hariz, M.I., and Hariz, G.-M. (2013). Therapeutic stimulation versus ablation. *Handb. Clin. Neurol.* *116*, 63–71.
- Haute Autorité de Santé (HAS), Guide du parcours de soins, Maladie de Parkinson, Service évaluation de la pertinence des soins et amélioration des pratiques et des parcours, Septembre 2016
- Hauser, R.A., Lyons, K.E., McClain, T., Carter, S., and Perlmutter, D. (2009). Randomized, double-blind, pilot evaluation of intravenous glutathione in Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* *24*, 979–983.
- Hayashi, H., Morizane, A., Koyanagi, M., Ono, Y., Sasai, Y., Hashimoto, N., and Takahashi, J. (2008). Meningeal cells induce dopaminergic neurons from embryonic stem cells. *Eur. J. Neurosci.* *27*, 261–268.
- Hedlund, E., Pruszek, J., Lardaro, T., Ludwig, W., Viñuela, A., Kim, K.-S., and Isacson, O. (2008). Embryonic stem cell-derived Pitx3-enhanced green fluorescent protein

- midbrain dopamine neurons survive enrichment by fluorescence-activated cell sorting and function in an animal model of Parkinson's disease. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 1526–1536.
- Helmich, R., and Dirkx, M. (2017). Pathophysiology and Management of Parkinsonian Tremor. *Semin. Neurol.* 37, 127–134.
- Hely, M.A., Reid, W.G.J., Adena, M.A., Halliday, G.M., and Morris, J.G.L. (2008). The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: The inevitability of dementia at 20 years: Twenty Year Sydney Parkinson's Study. *Mov. Disord.* 23, 837–844.
- Higuchi, Y., Matsuda, S., and Serizawa, T. (2017). Gamma knife radiosurgery in movement disorders: Indications and limitations. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 32, 28–35.
- 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.
- Hochedlinger, K., and Plath, K. (2009). Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Dev. Camb. Engl.* 136, 509–523.
- Hockemeyer, D., Soldner, F., Cook, E.G., Gao, Q., Mitalipova, M., and Jaenisch, R. (2008). A drug-inducible system for direct reprogramming of human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 3, 346–353.
- Holloway, R.G., Shoulson, I., Fahn, S., Kieburtz, K., Lang, A., Marek, K., McDermott, M., Seibyl, J., Weiner, W., Musch, B., et al. (2004). Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson disease: a 4-year randomized controlled trial. *Arch. Neurol.* 61, 1044–1053.
- Holmqvist, S., Chutna, O., Bousset, L., Aldrin-Kirk, P., Li, W., Björklund, T., Wang, Z.-Y., Roybon, L., Melki, R., and Li, J.-Y. (2014). Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 128, 805–820.
- Honig, H., Antonini, A., Martinez-Martin, P., Forgacs, I., Faye, G.C., Fox, T., Fox, K., Mancini, F., Canesi, M., Odin, P., et al. (2009). Intrajejunal levodopa infusion in Parkinson's disease: a pilot multicenter study of effects on nonmotor symptoms and quality of life. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 24, 1468–1474.
- Hooper, A.K., Okun, M.S., Foote, K.D., Fernandez, H.H., Jacobson, C., Zeilman, P., Romrell, J., and Rodriguez, R.L. (2008). Clinical cases where lesion therapy was chosen over deep brain stimulation. *Stereotact. Funct. Neurosurg.* 86, 147–152.
- Hornykiewicz, O. (1966). Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacol. Rev.* 18, 925–964.
- Hostiuc, S., Drima, E., and Buda, O. (2016). Shake the Disease. Georges Marinesco, Paul Blocq and the Pathogenesis of Parkinsonism, 1893. *Front. Neuroanat.* 10.
- Hu, K. (2014). All roads lead to induced pluripotent stem cells: the technologies of iPSC generation. *Stem Cells Dev.* 23, 1285–1300.

- Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E., and Melton, D.A. (2008). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat. Biotechnol.* *26*, 795–797.
- Hughes, A.J., Daniel, S.E., Kilford, L., and Lees, A.J. (1992). Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *55*, 181–184.
- Hughes, A.J., Daniel, S.E., Blankson, S., and Lees, A.J. (1993). A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease. *Arch. Neurol.* *50*, 140–148.
- Hutton, J.T., Morris, J.L., and Brewer, M.A. (1993). Controlled study of the antiparkinsonian activity and tolerability of cabergoline. *Neurology* *43*, 613–616.
- Hynes, M., Porter, J.A., Chiang, C., Chang, D., Tessier-Lavigne, M., Beachy, P.A., and Rosenthal, A. (1995). Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog. *Neuron* *15*, 35–44.
- Ingelsson, M. (2016). Alpha-Synuclein Oligomers-Neurotoxic Molecules in Parkinson's Disease and Other Lewy Body Disorders. *Front. Neurosci.* *10*, 408.
- Inzelberg, R., Schechtman, E., and Nisipeanu, P. (2003). Cabergoline, pramipexole and ropinirole used as monotherapy in early Parkinson's disease: an evidence-based comparison. *Drugs Aging* *20*, 847–855.
- Iwai, A., Masliah, E., Yoshimoto, M., Ge, N., Flanagan, L., de Silva, H.A., Kittel, A., and Saitoh, T. (1995). The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* *14*, 467–475.
- Iwawaki, T., Kohno, K., and Kobayashi, K. (2000). Identification of a potential nurr1 response element that activates the tyrosine hydroxylase gene promoter in cultured cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *274*, 590–595.
- Jaenisch, R., and Young, R. (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* *132*, 567–582.
- Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *79*, 368–376.
- Jankovic, J., Grossman, R., Goodman, C., Pirozzolo, F., Schneider, L., Zhu, Z., Scardino, P., Garber, A.J., Jhingran, S.G., and Martin, S. (1989). Clinical, biochemical, and neuropathologic findings following transplantation of adrenal medulla to the caudate nucleus for treatment of Parkinson's disease. *Neurology* *39*, 1227–1234.
- Jarraya, B., Boulet, S., Ralph, G.S., Jan, C., Bonvento, G., Azzouz, M., Miskin, J.E., Shin, M., Delzescaux, T., Drouot, X., et al. (2009). Dopamine gene therapy for Parkinson's disease in a nonhuman primate without associated dyskinesia. *Sci. Transl. Med.* *1*, 2ra4.
- Javoy, F., Sotelo, C., Herbet, A., and Agid, Y. (1976). Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intracerebral injection of 6-hydroxydopamine in the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* *102*, 201–215.
- Jellinger, K.A. (2015). Neuropathobiology of non-motor symptoms in Parkinson disease. *J. Neural Transm.* *122*, 1429–1440.

- Jensen, P., Krabbe, C., and Meyer, M. (2011). Cell Therapy for Parkinson's Disease: Status and Perspectives. In *Towards New Therapies for Parkinson's Disease*, (InTech), p.
- Jeon, B.S., Jackson-Lewis, V., and Burke, R.E. (1995). 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegener. J. Neurodegener. Disord. Neuroprotection Neuroregeneration* 4, 131–137.
- Joannides, A.J., Fiore-Hériché, C., Battersby, A.A., Athauda-Arachchi, P., Bouhon, I.A., Williams, L., Westmore, K., Kemp, P.J., Compston, A., Allen, N.D., et al. (2007). A scaleable and defined system for generating neural stem cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 25, 731–737.
- Jonsson, G., and Sachs, C. (1970). Effects of 6-hydroxydopamine on the uptake and storage of noradrenaline in sympathetic adrenergic neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 9, 141–155.
- Jourdain, V.A., Schechtmann, G., and Di Paolo, T. (2014). Subthalamotomy in the treatment of Parkinson's disease: clinical aspects and mechanisms of action. *J. Neurosurg.* 120, 140–151.
- Joyner, A.L. (1996). Engrailed, Wnt and Pax genes regulate midbrain--hindbrain development. *Trends Genet. TIG* 12, 15–20.
- Juncos, J.L., Engber, T.M., Raisman, R., Susel, Z., Thibaut, F., Ploska, A., Agid, Y., and Chase, T.N. (1989). Continuous and intermittent levodopa differentially affect basal ganglia function. *Ann. Neurol.* 25, 473–478.
- Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., and Woltjen, K. (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458, 771–775.
- Kalia, L.V., Kalia, S.K., and Lang, A.E. (2015). Disease-modifying strategies for Parkinson's disease: Disease-Modifying Strategies for PD. *Mov. Disord.* 30, 1442–1450.
- Kanazawa, T., Adachi, E., Orimo, S., Nakamura, A., Mizusawa, H., and Uchihara, T. (2012). Pale neurites, premature α -synuclein aggregates with centripetal extension from axon collaterals. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 22, 67–78.
- Katz, M., Won, S.J., Park, Y., Orr, A., Jones, D.P., Swanson, R.A., and Glass, G.A. (2015). Cerebrospinal fluid concentrations of N-acetylcysteine after oral administration in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 21, 500–503.
- Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakanishi, S., Nishikawa, S.I., and Sasai, Y. (2000). Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 28, 31–40.
- Kawasaki, H., Suemori, H., Mizuseki, K., Watanabe, K., Urano, F., Ichinose, H., Haruta, M., Takahashi, M., Yoshikawa, K., Nishikawa, S.-I., et al. (2002). Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 1580–1585.
- Kefalopoulou, Z., Politis, M., Piccini, P., Mencacci, N., Bhatia, K., Jahanshahi, M., Widner, H., Rehncrona, S., Brundin, P., Björklund, A., et al. (2014). Long-term Clinical Outcome of Fetal Cell Transplantation for Parkinson Disease: Two Case Reports. *JAMA Neurol.* 71, 83.

- Keränen, T., Gordin, A., Karlsson, M., Korpela, K., Pentikäinen, P.J., Rita, H., Schultz, E., Seppälä, L., and Wikberg, T. (1994). Inhibition of soluble catechol-O-methyltransferase and single-dose pharmacokinetics after oral and intravenous administration of entacapone. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* *46*, 151–157.
- Kikuchi, T., Morizane, A., Doi, D., Onoe, H., Hayashi, T., Kawasaki, T., Saiki, H., Miyamoto, S., and Takahashi, J. (2011). Survival of human induced pluripotent stem cell-derived midbrain dopaminergic neurons in the brain of a primate model of Parkinson's disease. *J. Park. Dis.* *1*, 395–412.
- Kim, D., Kim, C.-H., Moon, J.-I., Chung, Y.-G., Chang, M.-Y., Han, B.-S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., et al. (2009a). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* *4*, 472–476.
- Kim, D.-W., Chung, S., Hwang, M., Ferree, A., Tsai, H.-C., Park, J.-J., Chung, S., Nam, T.S., Kang, U.J., Isacson, O., et al. (2006a). Stromal cell-derived inducing activity, Nurr1, and signaling molecules synergistically induce dopaminergic neurons from mouse embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* *24*, 557–567.
- Kim, H.-J., Sugimori, M., Nakafuku, M., and Svendsen, C.N. (2007). Control of neurogenesis and tyrosine hydroxylase expression in neural progenitor cells through bHLH proteins and Nurr1. *Exp. Neurol.* *203*, 394–405.
- Kim, J., Su, S.C., Wang, H., Cheng, A.W., Cassady, J.P., Lodato, M.A., Lengner, C.J., Chung, C.-Y., Dawlaty, M.M., Tsai, L.-H., et al. (2011a). Functional integration of dopaminergic neurons directly converted from mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* *9*, 413–419.
- Kim, J., Efe, J.A., Zhu, S., Talantova, M., Yuan, X., Wang, S., Lipton, S.A., Zhang, K., and Ding, S. (2011b). Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 7838–7843.
- Kim, J.B., Greber, B., Araúzo-Bravo, M.J., Meyer, J., Park, K.I., Zaehres, H., and Schöler, H.R. (2009b). Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* *461*, 649–643.
- Kim, J.-H., Auerbach, J.M., Rodríguez-Gómez, J.A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., Lee, S.-H., Nguyen, J., Sánchez-Pernaute, R., Bankiewicz, K., et al. (2002a). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* *418*, 50–56.
- Kim, J.-H., Auerbach, J.M., Rodríguez-Gómez, J.A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., Lee, S.-H., Nguyen, J., Sánchez-Pernaute, R., Bankiewicz, K., et al. (2002b). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* *418*, 50–56.
- Kim, M., Habiba, A., Doherty, J.M., Mills, J.C., Mercer, R.W., and Huettner, J.E. (2009c). Regulation of mouse embryonic stem cell neural differentiation by retinoic acid. *Dev. Biol.* *328*, 456–471.
- Kim, S.U., Park, I.H., Kim, T.H., Kim, K.S., Choi, H.B., Hong, S.H., Bang, J.H., Lee, M.A., Joo, I.S., Lee, C.S., et al. (2006b). Brain transplantation of human neural stem cells transduced with tyrosine hydroxylase and GTP cyclohydrolase 1 provides functional

- improvement in animal models of Parkinson disease. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* *26*, 129–140.
- Kirik, D., Winkler, C., and Björklund, A. (2001). Growth and functional efficacy of intrastriatal nigral transplants depend on the extent of nigrostriatal degeneration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 2889–2896.
- Kirkeby, A., Grealish, S., Wolf, D.A., Nelander, J., Wood, J., Lundblad, M., Lindvall, O., and Parmar, M. (2012). Generation of regionally specified neural progenitors and functional neurons from human embryonic stem cells under defined conditions. *Cell Rep.* *1*, 703–714.
- Kirkeby, A., Parmar, M., and Barker, R.A. (2017). Strategies for bringing stem cell-derived dopamine neurons to the clinic: A European approach (STEM-PD). *Prog. Brain Res.* *230*, 165–190.
- Kish, S.J., Shannak, K., and Hornykiewicz, O. (1988). Uneven Pattern of Dopamine Loss in the Striatum of Patients with Idiopathic Parkinson’s Disease. *N. Engl. J. Med.* *318*, 876–880.
- Kitagawa, M., Murata, J., Uesugi, H., Kikuchi, S., Saito, H., Tashiro, K., and Sawamura, Y. (2005). Two-year follow-up of chronic stimulation of the posterior subthalamic white matter for tremor-dominant Parkinson’s disease. *Neurosurgery* *56*, 281–289; discussion 281–289.
- Kittappa, R., Chang, W.W., Awatramani, R.B., and McKay, R.D.G. (2007). The *foxa2* gene controls the birth and spontaneous degeneration of dopamine neurons in old age. *PLoS Biol.* *5*, e325.
- Klingelhoefer, L., and Reichmann, H. (2015). Pathogenesis of Parkinson disease—the gut–brain axis and environmental factors. *Nat. Rev. Neurol.* *11*, 625–636.
- Kompoliti, K., Chu, Y., Shannon, K.M., and Kordower, J.H. (2007). Neuropathological study 16 years after autologous adrenal medullary transplantation in a Parkinson’s disease patient. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* *22*, 1630–1633.
- Kordower, J.H., Freeman, T.B., Snow, B.J., Vingerhoets, F.J., Mufson, E.J., Sanberg, P.R., Hauser, R.A., Smith, D.A., Nauert, G.M., and Perl, D.P. (1995). Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson’s disease. *N. Engl. J. Med.* *332*, 1118–1124.
- Kordower, J.H., Freeman, T.B., Chen, E.Y., Mufson, E.J., Sanberg, P.R., Hauser, R.A., Snow, B., and Olanow, C.W. (1998). Fetal nigral grafts survive and mediate clinical benefit in a patient with Parkinson’s disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* *13*, 383–393.
- Kordower, J.H., Chu, Y., Hauser, R.A., Freeman, T.B., and Olanow, C.W. (2008). Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson’s disease. *Nat. Med.* *14*, 504–506.
- Kotzbauer, P.T., Lampe, P.A., Heuckeroth, R.O., Golden, J.P., Creedon, D.J., Johnson, E.M., and Milbrandt, J. (1996). Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature* *384*, 467–470.

- Krack, P., Martinez-Fernandez, R., Del Alamo, M., and Obeso, J.A. (2017). Current applications and limitations of surgical treatments for movement disorders. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* *32*, 36–52.
- Kriks, S., Shim, J.-W., Piao, J., Ganat, Y.M., Wakeman, D.R., Xie, Z., Carrillo-Reid, L., Auyeung, G., Antonacci, C., Buch, A., et al. (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* *480*, 547–551.
- Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kösel, S., Przuntek, H., Eppelen, J.T., Schöls, L., and Riess, O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* *18*, 106–108.
- Kuhn, W., Winkel, R., Woitalla, D., Meves, S., Przuntek, H., and Müller, T. (1998). High prevalence of parkinsonism after occupational exposure to lead-sulfate batteries. *Neurology* *50*, 1885–1886.
- Kuusisto, E., Parkkinen, L., and Alafuzoff, I. (2003). Morphogenesis of Lewy bodies: dissimilar incorporation of alpha-synuclein, ubiquitin, and p62. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *62*, 1241–1253.
- Kuwamura, M., Muraguchi, T., Matsui, T., Ueno, M., Takenaka, S., Yamate, J., Kotani, T., Kuramoto, T., Guénet, J.-L., Kitada, K., et al. (2005). Mutation at the *Lmx1a* locus provokes aberrant brain development in the rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *155*, 99–106.
- Kwon, Y.-W., Chung, Y.-J., Kim, J., Lee, H.-J., Park, J., Roh, T.-Y., Cho, H.-J., Yoon, C.-H., Koo, B.-K., and Kim, H.-S. (2014). Comparative study of efficacy of dopaminergic neuron differentiation between embryonic stem cell and protein-based induced pluripotent stem cell. *PloS One* *9*, e85736.
- Lancaster, M.A., Renner, M., Martin, C.-A., Wenzel, D., Bicknell, L.S., Hurles, M.E., Homfray, T., Penninger, J.M., Jackson, A.P., and Knoblich, J.A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* *501*, 373–379.
- Lanciego, J.L., Luquin, N., and Obeso, J.A. (2012). Functional Neuroanatomy of the Basal Ganglia. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *2*, a009621–a009621.
- Lang, A.E. (2010). Clinical trials of disease-modifying therapies for neurodegenerative diseases: the challenges and the future. *Nat. Med.* *16*, 1223–1226.
- Lang, A.E., and Lozano, A.M. (1998). Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* *339*, 1044–1053.
- Lang, A.E., Gill, S., Patel, N.K., Lozano, A., Nutt, J.G., Penn, R., Brooks, D.J., Hotton, G., Moro, E., Heywood, P., et al. (2006). Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Ann. Neurol.* *59*, 459–466.
- Langston, J.W., and Ballard, P.A. (1983). Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N. Engl. J. Med.* *309*, 310.
- Law, S.W., Conneely, O.M., DeMayo, F.J., and O'Malley, B.W. (1992). Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *6*, 2129–2135.

- Lee, A., and Gilbert, R.M. (2016). Epidemiology of Parkinson Disease. *Neurol. Clin.* *34*, 955–965.
- Lee, H.-S., Bae, E.-J., Yi, S.-H., Shim, J.-W., Jo, A.-Y., Kang, J.-S., Yoon, E.-H., Rhee, Y.-H., Park, C.-H., Koh, H.-C., et al. (2009). Foxa2 and Nurr1 Synergistically Yield A9 Nigral Dopamine Neurons Exhibiting Improved Differentiation, Function and Cell Survival. *STEM CELLS N/A-N/A*.
- Lee, K.-W., Chen, W., Junn, E., Im, J.-Y., Grosso, H., Sonsalla, P.K., Feng, X., Ray, N., Fernandez, J.R., Chao, Y., et al. (2011). Enhanced phosphatase activity attenuates α -synucleinopathy in a mouse model. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 6963–6971.
- Lee, S.H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J.M., and McKay, R.D. (2000a). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* *18*, 675–679.
- Lee, S.H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J.M., and McKay, R.D. (2000b). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* *18*, 675–679.
- Lesage, S., Anheim, M., Letournel, F., Bousset, L., Honoré, A., Rozas, N., Pieri, L., Madiona, K., Dürr, A., Melki, R., et al. (2013). G51D α -synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Ann. Neurol.* *73*, 459–471.
- Levy, G. (2007). The relationship of Parkinson disease with aging. *Arch. Neurol.* *64*, 1242–1246.
- Levy, R., Lang, A.E., Dostrovsky, J.O., Pahapill, P., Romas, J., Saint-Cyr, J., Hutchison, W.D., and Lozano, A.M. (2001). Lidocaine and muscimol microinjections in subthalamic nucleus reverse Parkinsonian symptoms. *Brain J. Neurol.* *124*, 2105–2118.
- LeWitt, P.A., Rezai, A.R., Leehey, M.A., Ojemann, S.G., Flaherty, A.W., Eskandar, E.N., Kostyk, S.K., Thomas, K., Sarkar, A., Siddiqui, M.S., et al. (2011). AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson’s disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet Neurol.* *10*, 309–319.
- LeWitt, P.A., Huff, F.J., Hauser, R.A., Chen, D., Lissin, D., Zomorodi, K., and Cundy, K.C. (2014). Double-blind study of the actively transported levodopa prodrug XP21279 in Parkinson’s disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* *29*, 75–82.
- Lewy, F. (1912). Paralysis agitans. I. Pathologische Anatomy. In *Handbuch der Neurologie Vol. 3* (eds Lewandowsky, M. & Abelsdorff, G.) 920–933 (Springer-Verlag, Berlin).
- Li, L., and Xie, T. (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *21*, 605–631.
- Li, J.-Y., Englund, E., Holton, J.L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A.J., Lashley, T., Quinn, N.P., Rehncrona, S., Björklund, A., et al. (2008). Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson’s disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat. Med.* *14*, 501–503.
- Li, J.-Y., Englund, E., Widner, H., Rehncrona, S., Björklund, A., Lindvall, O., and Brundin, P. (2010). Characterization of Lewy body pathology in 12- and 16-year-old intrastriatal mesencephalic grafts surviving in a patient with Parkinson’s disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* *25*, 1091–1096.

- Liang, C.L., Sinton, C.M., Sonsalla, P.K., and German, D.C. (1996). Midbrain dopaminergic neurons in the mouse that contain calbindin-D28k exhibit reduced vulnerability to MPTP-induced neurodegeneration. *Neurodegener. J. Neurodegener. Disord. Neuroprotection Neuroregeneration* 5, 313–318.
- Lie, D.C., Dziejczapolski, G., Willhoite, A.R., Kaspar, B.K., Shults, C.W., and Gage, F.H. (2002). The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 6639–6649.
- Lieberman, A., Olanow, C.W., Sethi, K., Swanson, P., Waters, C.H., Fahn, S., Hurtig, H., and Yahr, M. (1998). A multicenter trial of ropinirole as adjunct treatment for Parkinson's disease. Ropinirole Study Group. *Neurology* 51, 1057–1062.
- Lin, R., and Iacovitti, L. (2015). Classic and novel stem cell niches in brain homeostasis and repair. *Brain Res.* 1628, 327–342.
- Lin, J.-Y., Xie, C.-L., Zhang, S.-F., Yuan, W., and Liu, Z.-G. (2017). Current Experimental Studies of Gene Therapy in Parkinson's Disease. *Front. Aging Neurosci.* 9, 126.
- Lin, L.F., Doherty, D.H., Lile, J.D., Bektesh, S., and Collins, F. (1993). GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260, 1130–1132.
- Lindvall, O., and Hagell, P. (2000). Clinical observations after neural transplantation in Parkinson's disease. *Prog. Brain Res.* 127, 299–320.
- Lindvall, O., Backlund, E.O., Farde, L., Sedvall, G., Freedman, R., Hoffer, B., Nobin, A., Seiger, A., and Olson, L. (1987). Transplantation in Parkinson's disease: two cases of adrenal medullary grafts to the putamen. *Ann. Neurol.* 22, 457–468.
- Lindvall, O., Rehnström, S., Gustavii, B., Brundin, P., Astedt, B., Widner, H., Lindholm, T., Björklund, A., Leenders, K.L., Rothwell, J.C., et al. (1988). Fetal dopamine-rich mesencephalic grafts in Parkinson's disease. *Lancet Lond. Engl.* 2, 1483–1484.
- Liu, X., Li, F., Stubblefield, E.A., Blanchard, B., Richards, T.L., Larson, G.A., He, Y., Huang, Q., Tan, A.-C., Zhang, D., et al. (2012). Direct reprogramming of human fibroblasts into dopaminergic neuron-like cells. *Cell Res.* 22, 321–332.
- Loh, Y.-H., Agarwal, S., Park, I.-H., Urbach, A., Huo, H., Heffner, G.C., Kim, K., Miller, J.D., Ng, K., and Daley, G.Q. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 113, 5476–5479.
- Lotia, M., and Jankovic, J. (2016). New and emerging medical therapies in Parkinson's disease. *Expert Opin. Pharmacother.* 17, 895–909.
- Lowry, W.E., and Plath, K. (2008). The many ways to make an iPS cell. *Nat. Biotechnol.* 26, 1246–1248.
- Lowry, W.E., Richter, L., Yachechko, R., Pyle, A.D., Tchieu, J., Sridharan, R., Clark, A.T., and Plath, K. (2008). Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 2883–2888.
- Lujan, E., and Wernig, M. (2013). An indirect approach to generating specific human cell types. *Nat. Methods* 10, 44–45.

- Ma, D.K., Bonaguidi, M.A., Ming, G.-L., and Song, H. (2009). Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system. *Cell Res.* 19, 672–682.
- Mack, A.A., Kroboth, S., Rajesh, D., and Wang, W.B. (2011). Generation of induced pluripotent stem cells from CD34+ cells across blood drawn from multiple donors with non-integrating episomal vectors. *PloS One* 6, e27956.
- Maday, S., Twelvetrees, A.E., Moughamian, A.J., and Holzbaur, E.L.F. (2014). Axonal transport: cargo-specific mechanisms of motility and regulation. *Neuron* 84, 292–309.
- Madrazo, I., Drucker-Colín, R., Díaz, V., Martínez-Mata, J., Torres, C., and Becerril, J.J. (1987). Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 316, 831–834.
- Madrazo, I., León, V., Torres, C., Aguilera, M.C., Varela, G., Alvarez, F., Fraga, A., Drucker-Colín, R., Ostrosky, F., and Skurovich, M. (1988). Transplantation of fetal substantia nigra and adrenal medulla to the caudate nucleus in two patients with Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 318, 51.
- Mahalik, T.J., Finger, T.E., Stromberg, I., and Olson, L. (1985). Substantia nigra transplants into denervated striatum of the rat: ultrastructure of graft and host interconnections. *J. Comp. Neurol.* 240, 60–70.
- Mahlknecht, P., Krismer, F., Poewe, W., and Seppi, K. (2017). Meta-analysis of dorsolateral nigral hyperintensity on magnetic resonance imaging as a marker for Parkinson's disease: DNH on MRI as a Marker for PD. *Mov. Disord.* 32, 619–623.
- Mallon, B.S., Park, K.-Y., Chen, K.G., Hamilton, R.S., and McKay, R.D.G. (2006). Toward xeno-free culture of human embryonic stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 1063–1075.
- Maranis, S., Tsouli, S., and Konitsiotis, S. (2011). Treatment of motor symptoms in advanced Parkinson's disease: A practical approach. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35, 1795–1807.
- Marfia, G., Madaschi, L., Marra, F., Menarini, M., Bottai, D., Formenti, A., Bellardita, C., Di Giulio, A.M., Carelli, S., and Gorio, A. (2011). Adult neural precursors isolated from post mortem brain yield mostly neurons: an erythropoietin-dependent process. *Neurobiol. Dis.* 43, 86–98.
- Marks, W.J., Ostrem, J.L., Verhagen, L., Starr, P.A., Larson, P.S., Bakay, R.A., Taylor, R., Cahn-Weiner, D.A., Stoessl, A.J., Olanow, C.W., et al. (2008). Safety and tolerability of intraputamenal delivery of CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *Lancet Neurol.* 7, 400–408.
- Marks, W.J., Bartus, R.T., Siffert, J., Davis, C.S., Lozano, A., Boulis, N., Vitek, J., Stacy, M., Turner, D., Verhagen, L., et al. (2010). Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol.* 9, 1164–1172.
- Marks, W.J., Baumann, T.L., and Bartus, R.T. (2016). Long-Term Safety of Patients with Parkinson's Disease Receiving rAAV2-Neurturin (CERE-120) Gene Transfer. *Hum. Gene Ther.* 27, 522–527.

- Maroteaux, L., Campanelli, J.T., and Scheller, R.H. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J. Neurosci.* *8*, 2804–2815.
- Marro, S., Pang, Z.P., Yang, N., Tsai, M.-C., Qu, K., Chang, H.Y., Südhof, T.C., and Wernig, M. (2011). Direct lineage conversion of terminally differentiated hepatocytes to functional neurons. *Cell Stem Cell* *9*, 374–382.
- Martinat, C., Bacci, J.-J., Leete, T., Kim, J., Vanti, W.B., Newman, A.H., Cha, J.H., Gether, U., Wang, H., and Abeliovich, A. (2006). Cooperative transcription activation by Nurr1 and Pitx3 induces embryonic stem cell maturation to the midbrain dopamine neuron phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 2874–2879.
- Martinez-Martin, P., Schapira, A.H.V., Stocchi, F., Sethi, K., Odin, P., MacPhee, G., Brown, R.G., Naidu, Y., Clayton, L., Abe, K., et al. (2007). Prevalence of nonmotor symptoms in Parkinson’s disease in an international setting; study using nonmotor symptoms questionnaire in 545 patients. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* *22*, 1623–1629.
- McCann, H., Cartwright, H., and Halliday, G.M. (2016). Neuropathology of α -synuclein propagation and Braak hypothesis. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* *31*, 152–160.
- McGeer, P.L., Itagaki, S., Akiyama, H., and McGeer, E.G. (1988). Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. *Ann. Neurol.* *24*, 574–576.
- McKay, R. (1997). Stem cells in the central nervous system. *Science* *276*, 66–71.
- McNeill, T.H., Brown, S.A., Rafols, J.A., and Shoulson, I. (1988). Atrophy of medium spiny I striatal dendrites in advanced Parkinson’s disease. *Brain Res.* *455*, 148–152.
- Meissner, K.K., Kirkham, D.L., and Doering, L.C. (2005). Transplants of neurosphere cell suspensions from aged mice are functional in the mouse model of Parkinson’s. *Brain Res.* *1057*, 105–112.
- Mendez, I., Dagher, A., Hong, M., Hebb, A., Gaudet, P., Law, A., Weerasinghe, S., King, D., Desrosiers, J., Darvesh, S., et al. (2000). Enhancement of survival of stored dopaminergic cells and promotion of graft survival by exposure of human fetal nigral tissue to glial cell line--derived neurotrophic factor in patients with Parkinson’s disease. Report of two cases and technical considerations. *J. Neurosurg.* *92*, 863–869.
- Mendez, I., Sanchez-Pernaute, R., Cooper, O., Viñuela, A., Ferrari, D., Björklund, L., Dagher, A., and Isacson, O. (2005). Cell type analysis of functional fetal dopamine cell suspension transplants in the striatum and substantia nigra of patients with Parkinson’s disease. *Brain J. Neurol.* *128*, 1498–1510.
- Meyers, R. (1951). Surgical experiments in the therapy of certain “extrapyramidal” diseases: a current evaluation. *Acta Psychiatr. Neurol. Suppl.* *67*, 1–42.
- Meynert, T. (1871). Ueber Beiträge zur differential Diagnose der paralytischen Irrsinn. *Weiner Médical Press* *11*, 645-647.
- Miller, R.A., and Ruddle, F.H. (1976). Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids. *Cell* *9*, 45–55.

- Montoya, C.P., Campbell-Hope, L.J., Pemberton, K.D., and Dunnett, S.B. (1991). The “staircase test”: a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *J. Neurosci. Methods* *36*, 219–228.
- Morizane, A., Takahashi, J., Takagi, Y., Sasai, Y., and Hashimoto, N. (2002). Optimal conditions for in vivo induction of dopaminergic neurons from embryonic stem cells through stromal cell-derived inducing activity. *J. Neurosci. Res.* *69*, 934–939.
- Morrison, B.E. (2016). Discovery of nigral dopaminergic neurogenesis in adult mice. *Neural Regen. Res.* *11*, 878–881.
- Mueller, J.C., Fuchs, J., Hofer, A., Zimprich, A., Lichtner, P., Illig, T., Berg, D., Wüllner, U., Meitinger, T., and Gasser, T. (2005). Multiple regions of alpha-synuclein are associated with Parkinson’s disease. *Ann. Neurol.* *57*, 535–541.
- Mullin, S., and Schapira, A. (2013). α -Synuclein and mitochondrial dysfunction in Parkinson’s disease. *Mol. Neurobiol.* *47*, 587–597.
- Murry, C.E., and Keller, G. (2008). Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* *132*, 661–680.
- Nagaseki, Y., Shibasaki, T., Hirai, T., Kawashima, Y., Hirato, M., Wada, H., Miyazaki, M., and Ohye, C. (1986). Long-term follow-up results of selective VIM-thalamotomy. *J. Neurosurg.* *65*, 296–302.
- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* *26*, 101–106.
- Natalwala, A., and Kunath, T. (2017). Preparation, characterization, and banking of clinical-grade cells for neural transplantation: Scale up, fingerprinting, and genomic stability of stem cell lines. *Prog. Brain Res.* *230*, 133–150.
- Ng, K.Y., Chase, T.N., Colburn, R.W., and Kopin, I.J. (1970). L-Dopa-Induced Release of Cerebral Monoamines. *Science* *170*, 76–77.
- Nicoletti, F., Bockaert, J., Collingridge, G.L., Conn, P.J., Ferraguti, F., Schoepp, D.D., Wroblewski, J.T., and Pin, J.P. (2011). Metabotropic glutamate receptors: from the workbench to the bedside. *Neuropharmacology* *60*, 1017–1041.
- Nikkhah, G., Bentlage, C., Cunningham, M.G., and Björklund, A. (1994). Intranigral fetal dopamine grafts induce behavioral compensation in the rat Parkinson model. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *14*, 3449–3461.
- Nikkhah, G., Cunningham, M.G., McKay, R., and Björklund, A. (1995). Dopaminergic microtransplants into the substantia nigra of neonatal rats with bilateral 6-OHDA lesions. II. Transplant-induced behavioral recovery. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *15*, 3562–3570.
- Nishimura, F., Yoshikawa, M., Kanda, S., Nonaka, M., Yokota, H., Shiroy, A., Nakase, H., Hirabayashi, H., Ouji, Y., Birumachi, J.-I., et al. (2003). Potential use of embryonic stem cells for the treatment of mouse parkinsonian models: improved behavior by transplantation of in vitro differentiated dopaminergic neurons from embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* *21*, 171–180.

- Odekerken, V.J.J., Boel, J.A., Schmand, B.A., de Haan, R.J., Figee, M., van den Munckhof, P., Schuurman, P.R., de Bie, R.M.A., and NSTAPS study group (2016). GPi vs STN deep brain stimulation for Parkinson disease: Three-year follow-up. *Neurology* 86, 755–761.
- Okabe, S., Forsberg-Nilsson, K., Spiro, A.C., Segal, M., and McKay, R.D. (1996). Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech. Dev.* 59, 89–102.
- Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313–317.
- Okita, K., Yamakawa, T., Matsumura, Y., Sato, Y., Amano, N., Watanabe, A., Goshima, N., and Yamanaka, S. (2013). An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 31, 458–466.
- Olanow, C.W. (2007). The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease – 2007. *Mov. Disord.* 22, S335–S342.
- Olanow, C.W., Goetz, C.G., Kordower, J.H., Stoessl, A.J., Sossi, V., Brin, M.F., Shannon, K.M., Nauert, G.M., Perl, D.P., Godbold, J., et al. (2003). A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 54, 403–414.
- Olanow, C.W., Hauser, R.A., Jankovic, J., Langston, W., Lang, A., Poewe, W., Tolosa, E., Stocchi, F., Melamed, E., Eyal, E., et al. (2008). A randomized, double-blind, placebo-controlled, delayed start study to assess rasagiline as a disease modifying therapy in Parkinson's disease (the ADAGIO study): rationale, design, and baseline characteristics. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 23, 2194–2201.
- Olanow, C.W., Stern, M.B., and Sethi, K. (2009). The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009). *Neurology* 72, S1-136.
- Olson, L., and Malmfors, T. (1970). Growth characteristics of adrenergic nerves in the adult rat. Fluorescence histochemical and 3H-noradrenaline uptake studies using tissue transplantations to the anterior chamber of the eye. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 348, 1–112.
- Olsson, M., Nikkhah, G., Bentlage, C., and Björklund, A. (1995). Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 3863–3875.
- Ono, Y., Nakatani, T., Sakamoto, Y., Mizuhara, E., Minaki, Y., Kumai, M., Hamaguchi, A., Nishimura, M., Inoue, Y., Hayashi, H., et al. (2007). Differences in neurogenic potential in floor plate cells along an anteroposterior location: midbrain dopaminergic neurons originate from mesencephalic floor plate cells. *Dev. Camb. Engl.* 134, 3213–3225.
- Pakkenberg, B., Møller, A., Gundersen, H.J., Dam, A.M., and Pakkenberg, H. (1991). The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 54, 30–33.

- Pang, Z.P., Yang, N., Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Fuentes, D.R., Yang, T.Q., Citri, A., Sebastiano, V., Marro, S., Südhof, T.C., et al. (2011). Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature* *476*, 220–223.
- Papanikolaou, T., Lenington, J.B., Betz, A., Figueiredo, C., Salamone, J.D., and Conover, J.C. (2008). In vitro generation of dopaminergic neurons from adult subventricular zone neural progenitor cells. *Stem Cells Dev.* *17*, 157–172.
- Parish, C.L., Parisi, S., Persico, M.G., Arenas, E., and Minchiotti, G. (2005). Cripto as a target for improving embryonic stem cell-based therapy in Parkinson's disease. *Stem Cells Dayt. Ohio* *23*, 471–476.
- Parish, C.L., Castelo-Branco, G., Rawal, N., Tonnesen, J., Sorensen, A.T., Salto, C., Kokaia, M., Lindvall, O., and Arenas, E. (2008). Wnt5a-treated midbrain neural stem cells improve dopamine cell replacement therapy in parkinsonian mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 149–160.
- Park, C.-H., Kang, J.S., Shin, Y.H., Chang, M.-Y., Chung, S., Koh, H.-C., Zhu, M.H., Oh, S.B., Lee, Y.-S., Panagiotakos, G., et al. (2006). Acquisition of in vitro and in vivo functionality of Nurr1-induced dopamine neurons. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *20*, 2553–2555.
- Park, I.-H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G.Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* *134*, 877–886.
- Park, S., Lee, K.S., Lee, Y.J., Shin, H.A., Cho, H.Y., Wang, K.C., Kim, Y.S., Lee, H.T., Chung, K.S., Kim, E.Y., et al. (2004). Generation of dopaminergic neurons in vitro from human embryonic stem cells treated with neurotrophic factors. *Neurosci. Lett.* *359*, 99–103.
- Parkes, J.D., Baxter, R.C., Curzon, G., Knill-Jones, R.P., Knott, P.J., Marsden, C.D., Tattersall, R., and Vollum, D. (1971). Treatment of Parkinson's disease with amantadine and levodopa. A one-year study. *Lancet Lond. Engl.* *1*, 1083–1086.
- Parkinson, J. (2002). An essay on the shaking palsy. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* *14*, 223–236.
- Parkinson Study Group (2002). A controlled trial of rasagiline in early Parkinson disease: the TEMPO Study. *Arch. Neurol.* *59*, 1937–1943.
- Parkinson Study Group (2004). A controlled, randomized, delayed-start study of rasagiline in early Parkinson disease. *Arch. Neurol.* *61*, 561–566.
- Pasanen, P., Myllykangas, L., Siitonen, M., Raunio, A., Kaakkola, S., Lyytinen, J., Tienari, P.J., Pöyhönen, M., and Paetau, A. (2014). Novel α -synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology. *Neurobiol. Aging* *35*, 2180.e1-5.
- Perlow, M.J., Freed, W.J., Hoffer, B.J., Seiger, A., Olson, L., and Wyatt, R.J. (1979). Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science* *204*, 643–647.
- Perrier, A.L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M.E., Bruses, J., Topf, N., Harrison, N.L., and Studer, L. (2004). Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 12543–12548.

- Peschanski, M., Defer, G., N'Guyen, J.P., Ricolfi, F., Monfort, J.C., Remy, P., Geny, C., Samson, Y., Hantraye, P., and Jeny, R. (1994). Bilateral motor improvement and alteration of L-dopa effect in two patients with Parkinson's disease following intrastriatal transplantation of foetal ventral mesencephalon. *Brain J. Neurol.* *117* (Pt 3), 487–499.
- Pezzoli, G., and Cereda, E. (2013). Exposure to pesticides or solvents and risk of Parkinson disease. *Neurology* *80*, 2035–2041.
- Pfisterer, U., Kirkeby, A., Torper, O., Wood, J., Nelander, J., Dufour, A., Björklund, A., Lindvall, O., Jakobsson, J., and Parmar, M. (2011). Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 10343–10348.
- Phani, S., Loike, J.D., and Przedborski, S. (2012). Neurodegeneration and inflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* *18 Suppl 1*, S207-209.
- Piccini, P., Brooks, D.J., Björklund, A., Gunn, R.N., Grasby, P.M., Rimoldi, O., Brundin, P., Hagell, P., Rehncrona, S., Widner, H., et al. (1999). Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat. Neurosci.* *2*, 1137–1140.
- Pires, A.O., Teixeira, F.G., Mendes-Pinheiro, B., Serra, S.C., Sousa, N., and Salgado, A.J. (2017). Old and new challenges in Parkinson's disease therapeutics. *Prog. Neurobiol.*
- Playne, R., and Connor, B. (2017). Understanding Parkinson's Disease through the Use of Cell Reprogramming. *Stem Cell Rev.* *13*, 151–169.
- Politis, M., and Lindvall, O. (2012). Clinical application of stem cell therapy in Parkinson's disease. *BMC Med.* *10*, 1.
- Pollak, P., Benabid, A.L., Gross, C., Gao, D.M., Laurent, A., Benazzouz, A., Hoffmann, D., Gentil, M., and Perret, J. (1993). [Effects of the stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson disease]. *Rev. Neurol. (Paris)* *149*, 175–176.
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., et al. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* *276*, 2045–2047.
- Porritt, M.J., Kingsbury, A.E., Hughes, A.J., and Howells, D.W. (2006). Striatal dopaminergic neurons are lost with Parkinson's disease progression. *Mov. Disord.* *21*, 2208–2211.
- Prashanth, L.K., Fox, S., and Meissner, W.G. (2011). L-Dopa-Induced Dyskinesia—Clinical Presentation, Genetics, and Treatment. In *International Review of Neurobiology*, (Elsevier), pp. 31–54.
- Przedborski, S. (2017). The two-century journey of Parkinson disease research. *Nat. Rev. Neurosci.* *18*, 251–259.
- Przedborski, S., Levivier, M., Jiang, H., Ferreira, M., Jackson-Lewis, V., Donaldson, D., and Togasaki, D.M. (1995). Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience* *67*, 631–647.
- Puelles, E., Annino, A., Tuorto, F., Usiello, A., Acampora, D., Czerny, T., Brodski, C., Ang, S.-L., Wurst, W., and Simeone, A. (2004). Otx2 regulates the extent, identity and fate of neuronal progenitor domains in the ventral midbrain. *Dev. Camb. Engl.* *131*, 2037–2048.

- Qiu, L., Liao, M.-C., Chen, A.K., Wei, S., Xie, S., Reuveny, S., Zhou, Z.D., Hunziker, W., Tan, E.K., Oh, S.K.W., et al. (2017). Immature Midbrain Dopaminergic Neurons Derived from Floor-Plate Method Improve Cell Transplantation Therapy Efficacy for Parkinson's Disease. *Stem Cells Transl. Med.*
- Raudino, F. (2012). The Parkinson disease before James Parkinson. *Neurol. Sci.* 33, 945–948.
- Redmond, D.E., Vinuela, A., Kordower, J.H., and Isacson, O. (2008). Influence of cell preparation and target location on the behavioral recovery after striatal transplantation of fetal dopaminergic neurons in a primate model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 29, 103–116.
- Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* 18, 399–404.
- Reubinoff, B.E., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M.F., Reinhartz, E., Itzik, A., and Ben-Hur, T. (2001). Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 1134–1140.
- Reyes, S., Fu, Y., Double, K., Thompson, L., Kirik, D., Paxinos, G., and Halliday, G.M. (2012). GIRK2 expression in dopamine neurons of the substantia nigra and ventral tegmental area. *J. Comp. Neurol.* 520, 2591–2607.
- Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707–1710.
- Richter, F., Fleming, S.M., Watson, M., Lemesre, V., Pellegrino, L., Ranes, B., Zhu, C., Mortazavi, F., Mulligan, C.K., Sioshansi, P.C., et al. (2014). A GCase chaperone improves motor function in a mouse model of synucleinopathy. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 11, 840–856.
- Ritz, B., Rhodes, S.L., Qian, L., Schernhammer, E., Olsen, J.H., and Friis, S. (2010). L-type calcium channel blockers and Parkinson disease in Denmark. *Ann. Neurol.* 67, 600–606.
- Rivetti di Val Cervo, P., Romanov, R.A., Spigolon, G., Masini, D., Martín-Montañez, E., Toledo, E.M., La Manno, G., Feyder, M., Pifl, C., Ng, Y.-H., et al. (2017). Induction of functional dopamine neurons from human astrocytes in vitro and mouse astrocytes in a Parkinson's disease model. *Nat. Biotechnol.* 35, 444–452.
- Rodríguez-Gómez, J.A., Lu, J.-Q., Velasco, I., Rivera, S., Zoghbi, S.S., Liow, J.-S., Musachio, J.L., Chin, F.T., Toyama, H., Seidel, J., et al. (2007). Persistent dopamine functions of neurons derived from embryonic stem cells in a rodent model of Parkinson disease. *Stem Cells Dayt. Ohio* 25, 918–928.
- Roy, N.S., Cleren, C., Singh, S.K., Yang, L., Beal, M.F., and Goldman, S.A. (2006). Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat. Med.* 12, 1259–1268.
- Roybon, L., Hjalt, T., Christophersen, N.S., Li, J.-Y., and Brundin, P. (2008). Effects on differentiation of embryonic ventral midbrain progenitors by *Lmx1a*, *Msx1*, *Ngn2*, and *Pitx3*. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 3644–3656.

- Rumpel, R., Hohmann, M., Klein, A., Wesemann, M., Baumgärtner, W., Ratzka, A., and Grothe, C. (2015). Transplantation of fetal ventral mesencephalic progenitor cells overexpressing high molecular weight fibroblast growth factor 2 isoforms in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Neuroscience* 286, 293–307.
- Ruottinen, H.M., and Rinne, U.K. (1996). Entacapone prolongs levodopa response in a one month double blind study in parkinsonian patients with levodopa related fluctuations. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 60, 36–40.
- Sacchetti, P., Mitchell, T.R., Granneman, J.G., and Bannon, M.J. (2001). Nurr1 enhances transcription of the human dopamine transporter gene through a novel mechanism. *J. Neurochem.* 76, 1565–1572.
- Sánchez-Danés, A., Consiglio, A., Richaud, Y., Rodríguez-Pizà, I., Dehay, B., Edel, M., Bové, J., Memo, M., Vila, M., Raya, A., et al. (2012). Efficient generation of A9 midbrain dopaminergic neurons by lentiviral delivery of LMX1A in human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Hum. Gene Ther.* 23, 56–69.
- Sánchez-Pernaute, R., Studer, L., Bankiewicz, K.S., Major, E.O., and McKay, R.D. (2001). In vitro generation and transplantation of precursor-derived human dopamine neurons. *J. Neurosci. Res.* 65, 284–288.
- Sanchez-Pernaute, R., Lee, H., Patterson, M., Reske-Nielsen, C., Yoshizaki, T., Sonntag, K.C., Studer, L., and Isacson, O. (2008). Parthenogenetic dopamine neurons from primate embryonic stem cells restore function in experimental Parkinson's disease. *Brain J. Neurol.* 131, 2127–2139.
- Saner, A., and Thoenen, H. (1971). Model experiments on the molecular mechanism of action of 6-hydroxydopamine. *Mol. Pharmacol.* 7, 147–154.
- Sardi, S.P., Clarke, J., Viel, C., Chan, M., Tamsett, T.J., Treleaven, C.M., Bu, J., Sweet, L., Passini, M.A., Dodge, J.C., et al. (2013). Augmenting CNS glucocerebrosidase activity as a therapeutic strategy for parkinsonism and other Gaucher-related synucleinopathies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 3537–3542.
- Sauer, H., and Oertel, W.H. (1994). Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* 59, 401–415.
- Schapira, A.H.V., Chaudhuri, K.R., and Jenner, P. (2017). Non-motor features of Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 435–450.
- Schein, J.C., Hunter, D.D., and Roffler-Tarlov, S. (1998). Girk2 expression in the ventral midbrain, cerebellum, and olfactory bulb and its relationship to the murine mutation weaver. *Dev. Biol.* 204, 432–450.
- Schenck, C.H., Bundlie, S.R., and Mahowald, M.W. (1996). Delayed emergence of a parkinsonian disorder in 38% of 29 older men initially diagnosed with idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder. *Neurology* 46, 388–393.
- Schultz, W. (2007). Multiple Dopamine Functions at Different Time Courses. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 259–288.

- Shahed, J., and Jankovic, J. (2007). Motor symptoms in Parkinson's disease. *Handb. Clin. Neurol.* *83*, 329–342.
- Shamblott, M.J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E.M., Littlefield, J.W., Donovan, P.J., Blumenthal, P.D., Huggins, G.R., and Gearhart, J.D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 13726–13731.
- Sheng, C., Zheng, Q., Wu, J., Xu, Z., Wang, L., Li, W., Zhang, H., Zhao, X.-Y., Liu, L., Wang, Z., et al. (2012). Direct reprogramming of Sertoli cells into multipotent neural stem cells by defined factors. *Cell Res.* *22*, 208–218.
- Shim, J.-W., Park, C.-H., Bae, Y.-C., Bae, J.-Y., Chung, S., Chang, M.-Y., Koh, H.-C., Lee, H.-S., Hwang, S.-J., Lee, K.-H., et al. (2007). Generation of functional dopamine neurons from neural precursor cells isolated from the subventricular zone and white matter of the adult rat brain using *Nurr1* overexpression. *Stem Cells Dayt. Ohio* *25*, 1252–1262.
- Shintani, A., Nakao, N., Kakishita, K., and Itakura, T. (2008). Generation of dopamine neurons from embryonic stem cells in the presence of the neuralizing activity of bone marrow stromal cells derived from adult mice. *J. Neurosci. Res.* *86*, 2829–2838.
- Shults, C.W., Hashimoto, R., Brady, R.M., and Gage, F.H. (1990). Dopaminergic cells align along radial glia in the developing mesencephalon of the rat. *Neuroscience* *38*, 427–436.
- Sidhu, K.S., Walke, S., and Tuch, B.E. (2008). Derivation and propagation of hESC under a therapeutic environment. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* *Chapter 1*, Unit 1A.4.
- Siegfried, J., and Lippitz, B. (1994). Bilateral chronic electrostimulation of ventroposterolateral pallidum: a new therapeutic approach for alleviating all parkinsonian symptoms. *Neurosurgery* *35*, 1126-1129; discussion 1129-1130.
- Singleton, A.B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., et al. (2003). alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* *302*, 841.
- Smidt, M.P., van Schaick, H.S., Lanctôt, C., Tremblay, J.J., Cox, J.J., van der Kleij, A.A., Wolterink, G., Drouin, J., and Burbach, J.P. (1997). A homeodomain gene *Ptx3* has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 13305–13310.
- Smith, Y., Wichmann, T., Factor, S.A., and DeLong, M.R. (2012). Parkinson's disease therapeutics: new developments and challenges since the introduction of levodopa. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *37*, 213–246.
- Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G.W., Cook, E.G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M., et al. (2009). Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* *136*, 964–977.
- Sonntag, K.-C., Pruszek, J., Yoshizaki, T., van Arensbergen, J., Sanchez-Pernaute, R., and Isacson, O. (2007). Enhanced yield of neuroepithelial precursors and midbrain-like dopaminergic neurons from human embryonic stem cells using the bone morphogenic protein antagonist *noggin*. *Stem Cells Dayt. Ohio* *25*, 411–418.

- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839–840.
- Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Cairns, N.J., Lantos, P.L., and Goedert, M. (1998). Filamentous α -synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci. Lett.* 251, 205–208.
- Stadtfeld, M., and Hochedlinger, K. (2010). Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev.* 24, 2239–2263.
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008a). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322, 945–949.
- Stadtfeld, M., Brennand, K., and Hochedlinger, K. (2008b). Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr. Biol.* CB 18, 890–894.
- Steele, J.W., Ju, S., Lachenmayer, M.L., Liken, J., Stock, A., Kim, S.H., Delgado, L.M., Alfaro, I.E., Bernales, S., Verdile, G., et al. (2013). Latrepirdine stimulates autophagy and reduces accumulation of α -synuclein in cells and in mouse brain. *Mol. Psychiatry* 18, 882–888.
- Steiger, M.J., El-Debas, T., Anderson, T., Findley, L.J., and Marsden, C.D. (1996). Double-blind study of the activity and tolerability of cabergoline versus placebo in parkinsonians with motor fluctuations. *J. Neurol.* 243, 68–72.
- Stenevi, U., Björklund, A., and Svendgaard, N.A. (1976). Transplantation of central and peripheral monoamine neurons to the adult rat brain: techniques and conditions for survival. *Brain Res.* 114, 1–20.
- Stevens, L.C. (1970). The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.* 21, 364–382.
- Stibe, C.M., Lees, A.J., Kempster, P.A., and Stern, G.M. (1988). Subcutaneous apomorphine in parkinsonian on-off oscillations. *Lancet Lond. Engl.* 1, 403–406.
- Stocchi, F., and Olanow, C.W. (2013). Obstacles to the development of a neuroprotective therapy for Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 28, 3–7.
- Stocchi, F., Borgohain, R., Onofrj, M., Schapira, A.H.V., Bhatt, M., Lucini, V., Giuliani, R., Anand, R., and Study 015 Investigators (2012). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of safinamide as add-on therapy in early Parkinson's disease patients. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 27, 106–112.
- Strecker, R.E., Sharp, T., Brundin, P., Zetterström, T., Ungerstedt, U., and Björklund, A. (1987). Autoregulation of dopamine release and metabolism by intrastriatal nigral grafts as revealed by intracerebral dialysis. *Neuroscience* 22, 169–178.
- Studer, L. (2017). Strategies for bringing stem cell-derived dopamine neurons to the clinic—The NYSTEM trial. *Prog. Brain Res.* 230, 191–212.
- Studer, L., Tabar, V., and McKay, R.D. (1998). Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat. Neurosci.* 1, 290–295.

- 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.
- Takagi, Y., Takahashi, J., Saiki, H., Morizane, A., Hayashi, T., Kishi, Y., Fukuda, H., Okamoto, Y., Koyanagi, M., Ideguchi, M., et al. (2005). Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J. Clin. Invest.* *115*, 102–109.
- Takahashi, J. (2017). Strategies for bringing stem cell-derived dopamine neurons to the clinic: The Kyoto trial. *Prog. Brain Res.* *230*, 213–226.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* *126*, 663–676.
- Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat. Protoc.* *2*, 3081–3089.
- Takeuchi, Y., Sawada, T., Blunt, S., Jenner, P., and Marsden, C.D. (1991). Serotonergic sprouting in the neostriatum after intrastriatal transplantation of fetal ventral mesencephalon. *Brain Res.* *551*, 171–177.
- Tanner, C.M., Kamel, F., Ross, G.W., Hoppin, J.A., Goldman, S.M., Korell, M., Marras, C., Bhudhikanok, G.S., Kasten, M., Chade, A.R., et al. (2011). Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease. *Environ. Health Perspect.* *119*, 866–872.
- Tashiro, Y., Sugimoto, T., Hattori, T., Uemura, Y., Nagatsu, I., Kikuchi, H., and Mizuno, N. (1989). Tyrosine hydroxylase-like immunoreactive neurons in the striatum of the rat. *Neurosci. Lett.* *97*, 6–10.
- Tatton, W.G., Chalmers-Redman, R., Brown, D., and Tatton, N. (2003). Apoptosis in Parkinson's disease: Signals for neuronal degradation. *Ann. Neurol.* *53*, S61–S72.
- Thinyane, K., Baier, P.C., Schindehütte, J., Mansouri, A., Paulus, W., Trenkwalder, C., Flügge, G., and Fuchs, E. (2005). Fate of pre-differentiated mouse embryonic stem cells transplanted in unilaterally 6-hydroxydopamine lesioned rats: histological characterization of the grafted cells. *Brain Res.* *1045*, 80–87.
- Thiruchelvam, M., Brockel, B.J., Richfield, E.K., Baggs, R.B., and Cory-Slechta, D.A. (2000). Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease? *Brain Res.* *873*, 225–234.
- Thomas, A., Iacono, D., Luciano, A.L., Armellino, K., Di Iorio, A., and Onofri, M. (2004). Duration of amantadine benefit on dyskinesia of severe Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *75*, 141–143.
- Thompson, L., Barraud, P., Andersson, E., Kirik, D., and Björklund, A. (2005a). Identification of dopaminergic neurons of nigral and ventral tegmental area subtypes in grafts of fetal ventral mesencephalon based on cell morphology, protein expression, and efferent projections. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 6467–6477.
- Thompson, L., Barraud, P., Andersson, E., Kirik, D., and Björklund, A. (2005b). Identification of Dopaminergic Neurons of Nigral and Ventral Tegmental Area Subtypes in Grafts of

- Fetal Ventral Mesencephalon Based on Cell Morphology, Protein Expression, and Efferent Projections. *J. Neurosci.* *25*, 6467–6477.
- Thompson, L.H., Grealish, S., Kirik, D., and Björklund, A. (2009). Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway in the adult mouse brain. *Eur. J. Neurosci.* *30*, 625–638.
- Thomson, J.A., Kalishman, J., Golos, T.G., Durning, M., Harris, C.P., Becker, R.A., and Hearn, J.P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 7844–7848.
- Thomson, J.A., Marshall, V.S., and Trojanowski, J.Q. (1998a). Neural differentiation of rhesus embryonic stem cells. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* *106*, 149-156; discussion 156-157.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998b). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* *282*, 1145–1147.
- Tian, C., Li, Y., Huang, Y., Wang, Y., Chen, D., Liu, J., Deng, X., Sun, L., Anderson, K., Qi, X., et al. (2015). Selective Generation of Dopaminergic Precursors from Mouse Fibroblasts by Direct Lineage Conversion. *Sci. Rep.* *5*, 12622.
- Tipton, K.F., and Singer, T.P. (1993). Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. *J. Neurochem.* *61*, 1191–1206.
- Torper, O., and Götz, M. (2017). Brain repair from intrinsic cell sources: Turning reactive glia into neurons. *Prog. Brain Res.* *230*, 69–97.
- Torres, E.M., Monville, C., Gates, M.A., Bagga, V., and Dunnett, S.B. (2007). Improved survival of young donor age dopamine grafts in a rat model of Parkinson’s disease. *Neuroscience* *146*, 1606–1617.
- Torres, E.M., Weyrauch, U.M., Sutcliffe, R., and Dunnett, S.B. (2008a). A rat embryo staging scale for the generation of donor tissue for neural transplantation. *Cell Transplant.* *17*, 535–542.
- Torres, E.M., Dowd, E., and Dunnett, S.B. (2008b). Recovery of functional deficits following early donor age ventral mesencephalic grafts in a rat model of Parkinson’s disease. *Neuroscience* *154*, 631–640.
- Tretiakoff, C. (1919). Contribution à l'étude de l'anatomie pathologique du locus niger de Soemmering avec quelques déductions relatives à la pathologie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson. Thèse. Paris : Jouve.
- Trinh, J., and Farrer, M. (2013). Advances in the genetics of Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.* *9*, 445–454.
- Tu, P.H., Galvin, J.E., Baba, M., Giasson, B., Tomita, T., Leight, S., Nakajo, S., Iwatsubo, T., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1998). Glial cytoplasmic inclusions in white matter oligodendrocytes of multiple system atrophy brains contain insoluble alpha-synuclein. *Ann. Neurol.* *44*, 415–422.
- Twelves, D., Perkins, K.S.M., and Counsell, C. (2003). Systematic review of incidence studies of Parkinson’s disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* *18*, 19–31.

- Uéda, K., Fukushima, H., Masliah, E., Xia, Y., Iwai, A., Yoshimoto, M., Otero, D.A., Kondo, J., Ihara, Y., and Saitoh, T. (1993). Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *90*, 11282–11286.
- Ungerstedt, U. (1968). 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharmacol.* *5*, 107–110.
- Ungerstedt, U. (1971a). Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* *367*, 69–93.
- Ungerstedt, U. (1971b). Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand.* *82*, 95–122.
- Ungerstedt, U., and Arbuthnott, G.W. (1970). Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* *24*, 485–493.
- Valente, E.M., Salvi, S., Ialongo, T., Marongiu, R., Elia, A.E., Caputo, V., Romito, L., Albanese, A., Dallapiccola, B., and Bentivoglio, A.R. (2004). PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann. Neurol.* *56*, 336–341.
- Van Camp, N., Diguët, E., and Hantraye, P. (2017). Advanced imaging of transplant survival, fate, differentiation, and integration. *Prog. Brain Res.* *230*, 283–303.
- Venkataramana, N.K., Kumar, S.K.V., Balaraju, S., Radhakrishnan, R.C., Bansal, A., Dixit, A., Rao, D.K., Das, M., Jan, M., Gupta, P.K., et al. (2010). Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* *155*, 62–70.
- Vierbuchen, T., and Wernig, M. (2011). Direct lineage conversions: unnatural but useful? *Nat. Biotechnol.* *29*, 892–907.
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z.P., Kokubu, Y., Südhof, T.C., and Wernig, M. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* *463*, 1035–1041.
- Villalba, R.M., and Smith, Y. (2017). Loss and remodeling of striatal dendritic spines in Parkinson's disease: from homeostasis to maladaptive plasticity? *J. Neural Transm.*
- Visanji, N.P., Brotchie, J.M., Kalia, L.V., Koprach, J.B., Tandon, A., Watts, J.C., and Lang, A.E. (2016). α -Synuclein-Based Animal Models of Parkinson's Disease: Challenges and Opportunities in a New Era. *Trends Neurosci.* *39*, 750–762.
- Vogt Weisenhorn, D.M., Giesert, F., and Wurst, W. (2016). Diversity matters - heterogeneity of dopaminergic neurons in the ventral mesencephalon and its relation to Parkinson's Disease. *J. Neurochem.* *139 Suppl 1*, 8–26.
- Voorn, P., Kalsbeek, A., Jorritsma-Byham, B., and Groenewegen, H.J. (1988). The pre- and postnatal development of the dopaminergic cell groups in the ventral mesencephalon and the dopaminergic innervation of the striatum of the rat. *Neuroscience* *25*, 857–887.
- Wagner, J., Akerud, P., Castro, D.S., Holm, P.C., Canals, J.M., Snyder, E.Y., Perlmann, T., and Arenas, E. (1999). Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurr1-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. *Nat. Biotechnol.* *17*, 653–659.

- Wakabayashi, K., Tanji, K., Odagiri, S., Miki, Y., Mori, F., and Takahashi, H. (2013). The Lewy Body in Parkinson's Disease and Related Neurodegenerative Disorders. *Mol. Neurobiol.* *47*, 495–508.
- Wakeman, D.R., Redmond, D.E., Dodiya, H.B., Sladek, J.R., Leranath, C., Teng, Y.D., Samulski, R.J., and Snyder, E.Y. (2014). Human neural stem cells survive long term in the midbrain of dopamine-depleted monkeys after GDNF overexpression and project neurites toward an appropriate target. *Stem Cells Transl. Med.* *3*, 692–701.
- Wallén, A., and Perlmann, T. (2003). Transcriptional control of dopamine neuron development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *991*, 48–60.
- Walsh, D.M., and Selkoe, D.J. (2016). A critical appraisal of the pathogenic protein spread hypothesis of neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* *17*, 251–260.
- Walter, B.L., and Vitek, J.L. (2004). Surgical treatment for Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* *3*, 719–728.
- Wang, W.-P., He, Z.-L., Lu, S.-Y., Yan, M., Zhou, Y., Xie, T.-H., Yin, N., Wang, W.-J., Tang, D.-H., Li, H.-J., et al. (2015a). Dopaminergic neuron-like cells derived from bone marrow mesenchymal stem cells by *Lmx1 α* and neurturin overexpression for autologous cytotherapy in hemiparkinsonian rhesus monkeys. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* *10*, 109–120.
- Wang, W.-P., He, Z.-L., Lu, S.-Y., Yan, M., Zhou, Y., Xie, T.-H., Yin, N., Wang, W.-J., Tang, D.-H., Li, H.-J., et al. (2015b). Dopaminergic neuron-like cells derived from bone marrow mesenchymal stem cells by *Lmx1 α* and neurturin overexpression for autologous cytotherapy in hemiparkinsonian rhesus monkeys. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* *10*, 109–120.
- Wang, X., Lu, Y., Zhang, H., Wang, K., He, Q., Wang, Y., Liu, X., Li, L., and Wang, X. (2004). Distinct efficacy of pre-differentiated versus intact fetal mesencephalon-derived human neural progenitor cells in alleviating rat model of Parkinson's disease. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* *22*, 175–183.
- Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., et al. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* *7*, 618–630.
- Weintraub, D., and Elias, W.J. (2017). The emerging role of transcranial magnetic resonance imaging-guided focused ultrasound in functional neurosurgery. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* *32*, 20–27.
- Wernig, M., Zhao, J.-P., Pruszak, J., Hedlund, E., Fu, D., Soldner, F., Broccoli, V., Constantine-Paton, M., Isacson, O., and Jaenisch, R. (2008a). Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 5856–5861.
- Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J.P., and Jaenisch, R. (2008b). *c-Myc* is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* *2*, 10–12.

- West, A.B., Moore, D.J., Biskup, S., Bugayenko, A., Smith, W.W., Ross, C.A., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2005). Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 16842–16847.
- Westerlund, U., Svensson, M., Moe, M.C., Varghese, M., Gustavsson, B., Wallstedt, L., Berg-Johnsen, J., and Langmoen, I.A. (2005). Endoscopically harvested stem cells: a putative method in future autotransplantation. *Neurosurgery* *57*, 779-784; discussion 779-784.
- Whitehouse, P.J., Hedreen, J.C., White, C.L., and Price, D.L. (1983). Basal forebrain neurons in the dementia of Parkinson disease. *Ann. Neurol.* *13*, 243–248.
- Wictorin, K., Brundin, P., Sauer, H., Lindvall, O., and Björklund, A. (1992). Long distance directed axonal growth from human dopaminergic mesencephalic neuroblasts implanted along the nigrostriatal pathway in 6-hydroxydopamine lesioned adult rats. *J. Comp. Neurol.* *323*, 475–494.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* *385*, 810–813.
- Winkler, C., Kirik, D., and Björklund, A. (2005). Cell transplantation in Parkinson's disease: how can we make it work? *Trends Neurosci.* *28*, 86–92.
- Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämäläinen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., et al. (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* *458*, 766–770.
- Wood, L.D. (2010). Clinical review and treatment of select adverse effects of dopamine receptor agonists in Parkinson's disease. *Drugs Aging* *27*, 295–310.
- Wright, A.K., Arbuthnott, G.W., and Dunnett, S.B. (1991). Serotonin hyperinnervation after foetal nigra or raphe transplantation in the neostriatum of adult rats. *Neurosci. Lett.* *128*, 281–284.
- Wu, J., Sheng, C., Liu, Z., Jia, W., Wang, B., Li, M., Fu, L., Ren, Z., An, J., Sang, L., et al. (2015). Lmx1a enhances the effect of iNSCs in a PD model. *Stem Cell Res.* *14*, 1–9.
- Wuerthele, S.M., Freed, W.J., Olson, L., Morihisa, J., Spoor, L., Wyatt, R.J., and Hoffer, B.J. (1981). Effect of dopamine agonists and antagonists on the electrical activity of substantia nigra neurons transplanted into the lateral ventricle of the rat. *Exp. Brain Res.* *44*, 1–10.
- Wypijewska, A., Galazka-Friedman, J., Bauminger, E.R., Wszolek, Z.K., Schweitzer, K.J., Dickson, D.W., Jaklewicz, A., Elbaum, D., and Friedman, A. (2010). Iron and reactive oxygen species activity in parkinsonian substantia nigra. *Parkinsonism Relat. Disord.* *16*, 329–333.
- Xu, H., Fan, X., Wu, X., Tang, J., and Yang, H. (2005). Neural precursor cells differentiated from mouse embryonic stem cells relieve symptomatic motor behavior in a rat model of Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *326*, 115–122.
- Yahr, M.D., Duvoisin, R.C., Schear, M.J., Barrett, R.E., and Hoehn, M.M. (1969). Treatment of parkinsonism with levodopa. *Arch. Neurol.* *21*, 343–354.

- Yan, M., Sun, M., Zhou, Y., Wang, W., He, Z., Tang, D., Lu, S., Wang, X., Li, S., Wang, W., et al. (2013). Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopamine neurons mediated by the Lmx1a and neurturin in vitro: potential therapeutic application for Parkinson's disease in a rhesus monkey model. *PLoS One* 8, e64000.
- Yang, D., Zhang, Z.-J., Oldenburg, M., Ayala, M., and Zhang, S.-C. (2008). Human embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons reverse functional deficit in parkinsonian rats. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 55–63.
- Ye, W., Shimamura, K., Rubenstein, J.L., Hynes, M.A., and Rosenthal, A. (1998). FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* 93, 755–766.
- Yoo, A.S., Sun, A.X., Li, L., Shcheglovitov, A., Portmann, T., Li, Y., Lee-Messer, C., Dolmetsch, R.E., Tsien, R.W., and Crabtree, G.R. (2011). MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature* 476, 228–231.
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I.I., and Thomson, J.A. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324, 797–801.
- Yue, F., Cui, L., Johkura, K., Ogiwara, N., and Sasaki, K. (2006). Induction of midbrain dopaminergic neurons from primate embryonic stem cells by coculture with sertoli cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 24, 1695–1706.
- Zarranz, J.J., Alegre, J., Gómez-Esteban, J.C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atarés, B., et al. (2004). The new mutation, E46K, of α -synuclein causes parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.* 55, 164–173.
- Zeng, X., Cai, J., Chen, J., Luo, Y., You, Z.-B., Fötter, E., Wang, Y., Harvey, B., Miura, T., Backman, C., et al. (2004). Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 22, 925–940.
- Zhang, Z., and Alexanian, A.R. (2012). Dopaminergic-like cells from epigenetically reprogrammed mesenchymal stem cells. *J. Cell. Mol. Med.* 16, 2708–2714.
- Zhang, J., Götz, S., Vogt Weisenhorn, D.M., Simeone, A., Wurst, W., and Prakash, N. (2015). A WNT1-regulated developmental gene cascade prevents dopaminergic neurodegeneration in adult En1(+/-) mice. *Neurobiol. Dis.* 82, 32–45.
- Zhang, R.L., Zhang, L., Zhang, Z.G., Morris, D., Jiang, Q., Wang, L., Zhang, L.J., and Chopp, M. (2003). Migration and differentiation of adult rat subventricular zone progenitor cells transplanted into the adult rat striatum. *Neuroscience* 116, 373–382.
- Zhang, Y., Li, W., Laurent, T., and Ding, S. (2012). Small molecules, big roles -- the chemical manipulation of stem cell fate and somatic cell reprogramming. *J. Cell Sci.* 125, 5609–5620.
- Zhou, W., and Freed, C.R. (2009). Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 27, 2667–2674.
- Zhou, Y., Sun, M., Li, H., Yan, M., He, Z., Wang, W., Wang, W., and Lu, S. (2013). Recovery of behavioral symptoms in hemi-parkinsonian rhesus monkeys through combined gene and stem cell therapy. *Cytotherapy* 15, 467–480.

Ziegler, M., Castro-Caldas, A., Del Signore, S., and Rascol, O. (2003). Efficacy of piribedil as early combination to levodopa in patients with stable Parkinson's disease: a 6-month, randomized, placebo-controlled study. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* *18*, 418–425.

(1890). SUCCESSFUL BRAIN GRAFTING. *Science* *16*, 78–79.