

TABLE DES MATIERES

INDEX DES ILLUSTRATIONS.....	9
INTRODUCTION.....	11
PREMIERE PARTIE ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	13
I. <i>Connaissances actuelles sur la maladie de Parkinson.....</i>	<i>15</i>
I.1. Epidémiologie.....	15
I.1.1. Age.....	15
I.1.2. Sexe.....	16
I.1.3. Origine ethnique.....	16
I.2. Symptômes cliniques et diagnostic de la maladie de Parkinson.....	17
I.2.1. Signes cliniques et diagnostic.....	17
I.2.2. Diagnostic différentiel.....	18
I.3. Etiologie.....	20
I.3.1. Génétique et facteurs génétiques de la maladie de Parkinson.....	20
I.3.2. Facteurs environnementaux.....	25
I.4. Anatomie, physiologie et physiopathologie.....	29
I.4.1. Anatomie fonctionnelle de la substance noire et physiologie.....	29
I.4.2. Physiopathologie.....	33
I.5. Neuropathologie et mécanismes pathologiques de la maladie de Parkinson.....	34
I.5.1. L'α-synucléine et synucléinopathies.....	34
I.5.2. Mécanismes impliqués dans la maladie de Parkinson.....	37
I.6. Traitements actuels et perspectives.....	44
I.6.1. Traitement pharmacologique.....	44
I.6.2. Traitement non pharmacologique (Krauss et Grossman, 2002).....	48
I.6.3. Innovation thérapeutique (Storch et Schwarz, 2002).....	50
II. <i>Etude à grande échelle du transcriptome des cellules atteintes.....</i>	<i>54</i>
II.1. Objectifs du projet de recherche.....	54
II.2. Mise en œuvre expérimentale et protocole.....	55
II.3. Résultats.....	56
II.4. Confirmation des résultats et analyses complémentaires.....	57
SECONDE PARTIE ETUDE PERSONNELLE.....	59
CHAPITRE PREMIER INTRODUCTION.....	61
I. <i>Principe de l'Hybridation In Situ (HIS).....</i>	<i>61</i>
II. <i>Le choix de la sonde.....</i>	<i>64</i>
II.1. Les différents types de sondes disponibles.....	64
II.1.1. Sondes ADN double brin.....	64
II.1.2. Oligonucléotides (ADN synthétique).....	64
II.1.3. ARN.....	65
II.2. Les différents types de marquages.....	66
II.2.1. Marquage radioactif.....	66
II.2.2. Marquage antigénique.....	67
II.3. Considérations techniques pour la conception de la sonde.....	68
II.4. Choix raisonné du type de sonde et du type de marquage optimaux.....	69
II.4.1. Type de sonde.....	69
II.4.2. Type de marquage.....	70
III. <i>Les grandes étapes.....</i>	<i>71</i>
III.1. Conditions d'hygiène.....	71
III.2. Préparation des tissus.....	71
III.2.1. Fixation des tissus.....	71
III.2.2. Stockage des tissus.....	72
III.3. Hybridation.....	72
III.4. Lavages post-hybridation.....	74
III.5. Etape de révélation.....	74
III.6. Visualisation.....	74
III.7. Contrôles.....	74
CHAPITRE DEUXIEME MATERIELS ET METHODES.....	77
I. <i>Hybridation in situ.....</i>	<i>77</i>
I.1. Les sondes : GFAP et β-actine.....	77
I.1.1. GFAP.....	77
I.1.2. β-actine.....	79
I.2. La cible : Animaux et tissus.....	80
I.2.1. Les animaux.....	80
I.2.2. Tissus cibles.....	80

I.3.	Protocole d'hybridation <i>in situ</i> (annexe B).....	84
I.3.1.	Préparation des coupes de tissu	84
I.3.2.	Prétraitement des coupes de tissu	84
I.3.3.	Hybridation.....	85
I.3.4.	Lavages des lames	85
I.3.5.	Détection et visualisation des hybrides.....	86
I.3.6.	Contrôles	87
II.	<i>Immunocytochimie</i>	87
	CHAPITRE TROISIEME RESULTATS	89
I.	<i>Hybridation in situ</i>	89
II.	<i>Immunocytochimie</i>	97
	CHAPITRE QUATRIEME DISCUSSION.....	99
I.	<i>Bilan des expériences</i>	99
II.	<i>Comparaison des résultats avec la littérature</i>	100
III.	<i>Critique de la méthode</i>	101
III.1.	Absence de signal	101
III.1.1.	Hypothèse 1 : Médiocre qualité des solutions et des tissus	101
III.1.2.	Hypothèse 2 : Accès à la cible difficile.	102
III.1.3.	Hypothèse 3: Médiocres conditions d'hybridation.....	102
III.1.4.	Hypothèse 4: Concentration en sonde insuffisante	102
III.1.5.	Hypothèse 5: Sensibilité de la méthode de détection.....	103
III.1.6.	Hypothèse 6 : Absence de spécificité de la sonde	103
III.2.	Bruit de fond	104
IV.	<i>Perspectives</i>	104
IV.1.	Qualité de la méthode	104
IV.2.	Sensibilité de la méthode :	105
IV.3.	Synthèse d'une nouvelle sonde.....	107
IV.4.	Validation des résultats des microarrays.....	107
	CONCLUSION	109
	ANNEXES	111
	ABREVIATIONS	127
	BIBLIOGRAPHIE	129

INDEX DES ILLUSTRATIONS

Index des figures

Figure 1 Patient souffrant de la maladie de Parkinson.....	18
Figure 2 Dégradation des protéines anormales par le système ubiquitine-protéasome et altération du système qui conduit au développement de MP.....	23
Figure 3 Noyaux gris de la base et structures adjacentes observés après section frontale de l'encéphale	30
Figure 4 Principal circuit des noyaux gris de la base.....	31
Figure 5 Circuit des noyaux gris de la base incluant la substance noire	32
Figure 6 Section frontale de l'encéphale montrant la voie nigrostriatale et la localisation de la dégénérescence dopaminergique chez les patients atteints de MP.....	32
Figure 7 Dépigmentation de la substance noire dans un cas de maladie de Parkinson (A) et comparaison avec une substance noire normale (B).....	33
Figure 8 Section de substance noire montrant une réactivité à l' α -synucléine, une perte de neurones et un corps de Lewy (MP) en comparaison avec une section normale (NORMAL).....	37
Figure 9 Mécanismes impliqués dans la pathogénie de Parkinson	43
Figure 10 Métabolisme de la dopamine	45
Figure 11 Schéma décrivant un modèle de voies communes à la maladie de Parkinson.....	52
Figure 12 Protocole Affymetrix.....	56
Figure 13 Principe d'hybridation <i>in situ</i>	62
Figure 14 Différentes méthodes de marquage	79
Figure 15 Reconstruction tridimensionnelle du striatum dans un encéphale humain translucide.....	81
Figure 16 Section parasagittale de l'encéphale humain montrant le striatum	81
Figure 17 Coupe transversale d'encéphale de rat faisant apparaître le striatum = noyau caudé (36, 37) et putamen (38).....	81
Figure 18 Localisation du noyau facial dans le cerveau humain	82
Figure 19 Coupe transversale d'encéphale de rat faisant apparaître le noyau du nerf facial (243).....	83
Figure 20 Noyaux des nerfs faciaux de rats adultes 9 jours après une transsection du nerf facial	83
Figure 21 Cryostat	84
Figure 22 Principe du système de détection "TSA"	106

Index des tableaux

Table 1 Diagnostic différentiel de la maladie de Parkinson (d'après Guttman <i>et al.</i> , 2003)	19
Table 2 Différentes stratégies thérapeutiques pour la maladie de Parkinson (d'après Jankovic, 2002)	48
Table 3 Critères de choix pour déterminer le type de sondes à utiliser (d'après Morel et Cavalier, 2001)	69

Index des photos

Photo 1 Striatum-Sonde GFPA.....	95
Photo 2 Striatum-Sonde poly dT-FITC.....	95
Photo 3 Striatum-Sans sonde	95
Photo 4 Striatum-Sonde GFAP antisens- FITC-37°C.....	95
Photo 5 Striatum-Sonde GFAP sens-FITC-37°C-	95
Photo 6 Striatum-Sonde poly dT-DIG	95
Photo 7 Striatum-Sonde GFAP antisens	95
Photo 8 Striatum-Sonde GFAP antisens- DIG.....	97
Photo 9 Striatum-Sonde GFAP sens-DIG.....	97
Photo 10 Noyau facial-Sonde GFAP antisens-DIG	97
Photo 11 Noyau facial-Sonde GFAP sens-DIG	97
Photo 12 Noyau facial-Sonde poly dT-DIG	97
Photo 13 Noyau facial-Sonde GFAP antisens-DIG-37°C	97
Photo 14 Noyau facial-Sonde GFAP sens-DIG-37°C	97
Photo 15 Noyau facial-Sonde GFAP antisens-DIG-42°C	97
Photo 16 Immunocytochimie-Protéine GFAP	97

INTRODUCTION

La maladie de Parkinson est une des affections neurodégénératives les plus communes. Il s'agit d'un trouble progressif, chronique, d'origine mal connue qui touche les capacités motrices et cognitives. L'apparition de la maladie est due à la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire.

La maladie de Parkinson a une prévalence de 1 à 2% dans la population âgée de 50 ans et plus. Pour cette raison, cette maladie fait l'objet d'un intérêt particulier dans le milieu de la recherche pour comprendre ses mécanismes et aboutir à la mise au point de thérapies efficaces.

Aujourd'hui, l'étiologie de la dégénérescence sélective des neurones de la substance noire reste encore méconnue. L'opinion qui prévaut actuellement est que la maladie de Parkinson résulte de l'interaction entre une prédisposition génétique et des facteurs environnementaux. La contribution relative de chacun varie d'un individu à l'autre.

Afin de mieux comprendre l'influence génétique de la maladie de Parkinson, le groupe de Neuropathologie de l'hôpital Charing Cross à Imperial College, London essaie de déterminer le profil d'expression génétique (transcriptome) des cellules atteintes au moyen de microarrays¹ sur cerveaux humains d'individus parkinsoniens.

Dans un deuxième temps, il est nécessaire de localiser l'expression cellulaire des gènes identifiés par microarrays et retenus comme gènes aux rôles critiques dans les mécanismes génétiques de la maladie de Parkinson. Ceci est possible par l'utilisation de la méthode d'hybridation *in situ*. L'objet de ce travail est la mise au point de cette méthode pour le groupe de recherche afin qu'elle soit disponible pour valider et utiliser les résultats de microarrays après leur analyse. Etant donné le caractère précieux des cerveaux humains parkinsoniens, cette méthode est mise au point sur cerveaux de rats.

La première partie de ce travail expose les connaissances actuelles sur la maladie de Parkinson ainsi que le travail de recherche du groupe, tandis que la deuxième partie relate la mise au point de la méthode d'hybridation *in situ* et ses résultats.

¹ Microarrays : Plaque de verre sur laquelle est fixé un grand nombre d'oligonucléotides spécifiques de différents gènes permettant de détecter des cibles complémentaires marquées et présentes dans le mélange à analyser (autrement appelée puces à ADN).

Première partie
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Rapport-Gratuit.com

I. Connaissances actuelles sur la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) est une des affections neurodégénératives les plus communes, décrite pour la première fois en 1817 par James Parkinson dans son Essai sur la paralysie agitante.

Il s'agit d'un trouble progressif, chronique qui touche les capacités motrices et cognitives dont les symptômes sont caractérisés par une hypertonie musculaire, une akinésie (incapacité à initier les mouvements) et un tremblement au repos.

La maladie de Parkinson affecte principalement des individus dans la deuxième moitié de leur vie. Les symptômes parkinsoniens sont liés à la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire.

Malgré une intense recherche depuis une trentaine d'années, les causes de la maladie sont encore mal connues. De plus en plus d'éléments récents appuient l'hypothèse d'une association de facteurs génétiques et environnementaux.

I.1. Epidémiologie

L'épidémiologie est l'étude de la fréquence et des déterminants d'une maladie à l'échelle d'une population. En comparant la fréquence d'une maladie entre des populations à caractéristiques différentes, on peut identifier des facteurs de risque clefs. L'épidémiologie de la maladie de Parkinson a été systématiquement étudiée dans une large variété de populations, fournissant ainsi de nombreux indices sur les causes de la maladie.

La rareté des données sur l'incidence de la maladie de Parkinson en général est principalement due à la difficulté d'identifier un nombre suffisant d'individus atteints dans une population définie. Le problème majeur est la faible fréquence de la maladie de Parkinson et la difficulté à établir un diagnostic.

En 2003, la prévalence de la maladie de Parkinson était de 200-300 cas pour 100000 (Huang *et al.* , 2003) pour une incidence annuelle, âge, sexe et groupes ethniques confondus, estimée à 13. 4 pour 100000.

Cependant, l'incidence varie en fonction de l'âge, du sexe et de l'origine ethnique (Van den Eeden *et al.* , 2002).

I.1.1. Age

Il est établi de manière non équivoque que plus l'âge augmente plus les risques de MP augmente. Ceci est vérifié dans toutes les études, réalisées sur différentes communautés. La maladie se

développe dans la deuxième moitié de la vie (Tanner *et al.* , 2002). L'âge d'apparition des premiers symptômes est de 55 ± 11 ans avec des extrêmes allant de 17 à 89 ans (Cambier *et al.* , 2000). L'incidence annuelle est aux alentours de 10 pour 100000 à l'âge de 50 ans, pour augmenter de manière exponentielle à plus de 200 pour 100000 à l'âge de 80 ans.

I.1.2. *Sexe*

MP est presque deux fois plus commune chez les hommes que chez les femmes dans une même catégorie d'âge. La prépondérance masculine de la maladie est observée indépendamment de la localisation géographique ou de l'origine ethnique et est mise en évidence à la fois dans des études de prévalence et d'incidence.

Cependant, il n'a pas encore été montré que l'augmentation du facteur de risque chez les hommes peut être attribuée à un phénomène biologique résultant d'une influence des hormones sexuelles ou un phénomène culturel reflétant des expositions particulières liées à des activités masculines ou à d'autres facteurs de comportement.

I.1.3. *Origine ethnique*

La maladie de Parkinson semble être plus commune dans des nations constituées essentiellement de populations blanches bien que les évidences soient encore peu claires.

Dans une étude récente (Van den Eeden *et al.* , 2002), dont le but était d'estimer l'incidence de MP en fonction de l'âge, du sexe et de l'origine ethnique sur un nombre total de 588 cas dans une population californienne, les auteurs ont montré que l'incidence pour 100000 était plus élevée parmi les hispaniques (16. 6 pour 100000), suivis des blancs non-hispaniques (13. 6), des asiatiques (11. 3) et des noirs (10. 2).

I.2. Symptômes cliniques et diagnostic de la maladie de Parkinson

Le diagnostic de la maladie de Parkinson repose sur les signes et symptômes présentés, néanmoins identifier avec certitude un individu atteint de la maladie de Parkinson peut s'avérer difficile.

En effet, il n'existe pas de bio-marqueurs pour MP. Pendant la vie du patient, le diagnostic repose uniquement sur les signes cliniques observés et la confirmation stricte de ce diagnostic n'est possible que par un examen post-mortem (Tanner *et al.* , 2002).

I.2.1. *Signes cliniques et diagnostic*

Les 4 grands signes cliniques de la maladie de Parkinson sont tremblement, rigidité, akinésie et instabilité posturale (Hobson, 2003).

a. Tremblement

Le tremblement est la plus commune des manifestations initiales de la maladie de Parkinson. Il commence de manière intermittente, apparaissant dans des périodes de stress pendant des années avant l'établissement d'un diagnostic.

Le tremblement parkinsonien apparaît au repos et commence normalement dans un bras (tremblement unilatéral). Il peut également, au début, n'affecter que les doigts. Initialement, le tremblement s'aggrave de manière ipsilatérale avant de se propager à l'autre côté du corps.

Le tremblement diminue avec la relaxation et disparaît pendant le sommeil. Il empire avec le stress, la fatigue et le froid.

b. Akinésie

Chez les individus parkinsoniens, il existe un défaut de l'initiation du mouvement (akinésie), une diminution de son amplitude (hypokinésie) et sa vitesse (bradykinésie).

L'établissement clinique de l'akinésie implique l'observation d'une réduction de la vitesse d'exécution des mouvements rapides des membres.

Les désordres akinétiques impliquent également une perte des mouvements associés ou une diminution de la « versatilité cinétique » quand le patient doit passer d'un mouvement à un autre. Ceci explique la perte d'expression faciale, du clignement et autres mouvements réflexes associés.

Les patients rapportent leur lenteur dans la réalisation des activités quotidiennes comme se vêtir, marcher ou exécuter les tâches quotidiennes de la maison.

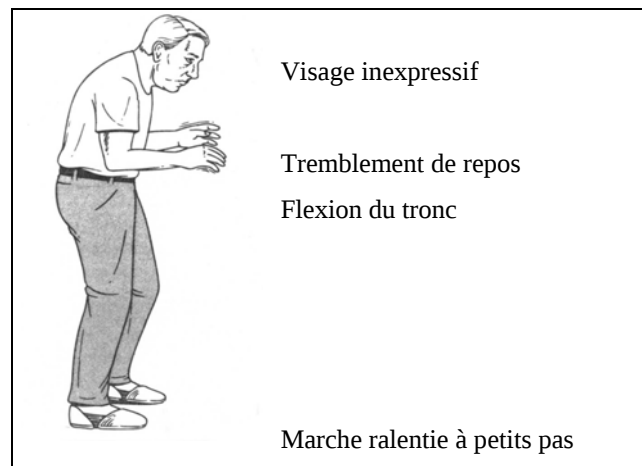
c. Rigidité

La rigidité des muscles pendant les mouvements passifs est caractéristique des individus atteints de Parkinson. Les mouvements passifs des articulations montrent une résistance continue pendant la totalité du temps d'exécution du mouvement.

d. Instabilité posturale et anormalité de l'allure

L'initiation de la marche est difficile et la marche est réduite à une lente « marche à petit pas » (Figure 1). Il y a une perte de l'anticipation des réflexes proprioceptifs. Cette perte progressive des réflexes résulte dans un nombre croissant de chutes et de phénomènes de rétropulsion (plus de deux pas vers l'arrière ou perte de l'équilibre).

Figure 1 Patient souffrant de la maladie de Parkinson
(D'après Pritchard et Alloway, 2002)



1.2.2. Diagnostic différentiel

Le **tremblement**, présent dans la maladie de Parkinson, peut être confondu avec le tremblement essentiel, plus commun. Cependant on peut les différencier en observant si le tremblement apparaît au repos (maladie de Parkinson) ou pendant une action (tremblement essentiel). En outre, le tremblement essentiel est classiquement présent dans les deux bras, tandis que les patients atteints de Parkinson ont normalement un tremblement unilatéral qui peut n'affecter qu'un bras ou qu'une jambe (Guttman *et al.*, 2003).

La **rigidité** des muscles pendant les mouvements passifs chez les individus parkinsoniens doit être distinguée de la rigidité résultant de lésions supérieures des motoneurones, par exemple chez les patients ayant subi une attaque d'apoplexie. Dans ce cas, les muscles, après une période initiale de rigidité et de résistance au mouvement, se relâchent soudainement, alors que dans le cas d'individus parkinsoniens, la résistance et la rigidité persistent. En outre, l'anormalité de tonicité présente chez les parkinsoniens est plus facile à détecter sur de grosses articulations telles que les coudes ou les

genoux, les chevilles et les poignets étant inadéquates. Aussi, l'examen de la tonicité du cou permet d'exclure des conditions entraînant des rigidités locales du squelette ou des muscles (arthrite, syndrome de la personne raide).

Le diagnostic différentiel entre la maladie de Parkinson et le parkinsonisme secondaire nécessite une connaissance de l'historique médical du patient. Il est nécessaire de vérifier la médication passée avec le patient et sa famille. En effet la cause la plus fréquente de parkinsonisme est la médication. De plus, il est nécessaire d'établir un historique de l'exposition aux toxines, des activités professionnelles passées, des infections et des attaques cérébrales ou affections similaires pouvant être survenues (Hobson, 2003).

C'est un réel défi de poser le diagnostic et de déterminer le pronostic avec le plus de précision possible. La présomption d'un diagnostic clinique de la maladie de Parkinson au moment de la consultation initiale est souvent erronée (20 à 25% des cas). Des informations supplémentaires précieuses peuvent émaner de l'évolution de la maladie de Parkinson et de la réponse à la médication. Cependant, la confirmation à l'autopsie reste la seule méthode de diagnostic définitif (Table 1).

Table 1 Diagnostic différentiel de la maladie de Parkinson (d'après Guttman *et al.* , 2003)

Diagnostic	Signes cliniques
Paralysie supranucléaire progressive	Dysfonctionnement oculomoteur, rigidité axiale, chutes pendant les phases précoces de la maladie, paralysie pseudobulbaire, dysfonctionnement de la déglutition, atteinte cognitive, apraxie d'ouverture des yeux, parkinsonisme avec manque de réponse à la lévodopa, progression rapide, dysarthrie.
Système d'atrophie multiple	Hypotension posturale et dysfonctionnement autonome (variant de Shy-Drager), dysfonctionnement cérébelleux (variant de l'atrophie du pont cérébelleux), parkinsonisme avec manque de réponse à la lévodopa (variant de la dégénérescence nigrostriatale), chutes pendant les phases précoces de la maladie, dysfonctionnement de la déglutition, progression rapide, flexion du cou, dysarthrie, myoclonies.
Parkinsonisme vasculaire	Partie inférieure du corps présentant des phases de blocage, signes d'atteinte du tractus pyramidal, atteinte cognitive, réponse relative à la lévodopa.
Maladie à corps de Lewy diffus	Démence précoce, hallucinations lors de thérapie à la lévodopa, niveau de vigilance variable, sensibilité aux effets secondaires extra-pyramidaux des neuroleptiques.
Dégénérescence corticobasale	Apraxie, signes sensoriels corticaux, myoclonies, dystonie, atteinte cognitive, manque de réponse à la lévodopa.

I.3. Etiologie

Le débat autour des causes de la maladie de Parkinson dure depuis quasiment aussi longtemps que l'identification de la maladie en 1877. L'opinion qui prévaut actuellement est que la maladie de Parkinson a une origine multifactorielle et résulte de l'interaction entre une prédisposition génétique et des facteurs environnementaux qui demeurent en grande partie inconnus. La contribution relative de chacun varie d'un individu à l'autre (Huang, 2003). Même dans les familles où plus d'un membre est atteint, l'influence prédominante peut être environnementale. Bien qu'elles soient en cause dans seulement une minorité des cas de la maladie, des mutations génétiques identifiées récemment ont fourni des indices précieux sur l'étiologie de la dégénérescence neuronale et ont permis de reconnaître l'importance d'un métabolisme protéique anormal dans la maladie de Parkinson.

On peut donc classer la maladie de Parkinson en deux groupes : un groupe de cas sporadiques, les plus répandus dont les causes sont à découvrir, et un groupe de cas familiaux, très rares, dûs à des mutations génétiques.

Dans cette partie nous allons faire le point sur les connaissances actuelles de l'étiologie génétique de la maladie de Parkinson et sur les facteurs environnementaux susceptibles d'être responsables de la maladie.

I.3.1. *Génétique et facteurs génétiques de la maladie de Parkinson*

Une des grandes avancées de ces dernières années a été la localisation et le clonage de gènes impliqués dans de rares cas de la maladie. Neuf gènes ont été mis en évidence pour leur lien avec la maladie de Parkinson et 3 ont été clairement identifiés (Hardy *et al.*, 2003).

Cependant, toutes les mutations et loci identifiés jusqu'ici semblent être incriminés dans seulement un petit nombre de familles atteintes de la maladie de Parkinson. La base génétique de la maladie de Parkinson pour la vaste majorité des cas, qui ne présente pas un mode d'hérédité mendélienne, reste toujours inconnue. Néanmoins, l'identification des déterminants génétiques de la maladie de Parkinson dans ces rares cas familiaux va fournir des indices importants sur le processus général de développement de la maladie de Parkinson et permettre ainsi une meilleure compréhension des troubles sporadiques plus communs de la maladie (Gasser, 2002).

Nous relatons ici les trois principaux gènes identifiés dans des cas familiaux comme étant la cause de la maladie de Parkinson.

- a. SNCA: La maladie de Parkinson est due à une mutation du gène SNCA, anciennement appelé PARK 1, codant pour l' α -synucléine

SNCA est le premier gène/locus qui a été identifié comme "gène MP". Il a été localisé sur le long bras du chromosome 4. Cette région contient le gène *α -synucléine* pour lequel deux mutations (A30P et A53T) ont été identifiées comme responsables de formes autosomiques dominantes de la maladie de Parkinson (Hardy, 2003).

Ces mutations, qui sont une cause très rare de la maladie de Parkinson, ont été mises en évidence dans plusieurs familles grecques.

L' α -synucléine est une protéine relativement petite qui est exprimée de manière abondante dans de nombreuses parties du cerveau et localisée principalement dans les terminaisons nerveuses pré-synaptiques. De nombreux aspects du fonctionnement normal de la protéine sont encore inconnus. Il a été montré que la protéine se lie aux vésicules et autres composants cellulaires et pourrait avoir un rôle dans la plasticité du cerveau (Gasser, 2002).

Le tableau clinique chez les sujets atteints de cette forme de la maladie est très similaire à celui observé dans les cas idiopathiques de Parkinson, bien que l'âge moyen de début des symptômes soit moins élevé (environ 45 ans) et que l'évolution de la maladie semble plus rapide que dans les cas sporadiques de MP.

L'identification d' *α -synucléine* comme "gène MP" a conduit à la découverte que la protéine α -synucléine est l'un des principaux composants des corps de Lewy, inclusions éosinophiliques présentes dans les neurones dopaminergiques survivants, reconnus comme empreintes pathologiques de MP dans les cas familiaux et sporadiques. Nous mentionnerons les corps de Lewy et leurs caractéristiques plus loin dans ce chapitre. Ainsi, l' α -synucléine pourrait jouer un rôle crucial dans le développement de la maladie. L'hypothèse la plus favorisée actuellement suppose que les variations d'acides aminés dans la protéine α -synucléine associée à la maladie de Parkinson favorisent sa conformation en feuillets β , ce qui pourrait conduire à une augmentation de la tendance à l'agrégation de la protéine. Cependant la relation entre la formation des agrégats et la mort cellulaire reste inconnue. On peut supposer qu'une erreur dans la dégradation protéique de l' α -synucléine et d'autres protéines peut conduire à une accumulation de composants toxiques, conduisant irréversiblement à la mort cellulaire. La formation d'agrégats contenant l' α -synucléine serait alors un effet secondaire.

L'élucidation de la voie moléculaire conduisant à l'agrégation d' α -synucléines et à la dégénérescence des neurones dopaminergiques va inévitablement générer de nouveaux gènes candidats permettant d'explorer d'autres facteurs génétiques dans les différents cas de maladies de Parkinson.

b. PARK 2 : Parkinsonisme juvénile autosomique récessif (AR-JP) dû à des mutations dans le gène *parkine*

Des cas juvéniles de parkinsonisme avec une hérédité récessive ont d'abord été identifiés au Japon (Gasser, 2002). Il a été montré depuis que cette forme de la maladie de Parkinson a une distribution mondiale et affecte, en particulier, de jeunes patients (apparition des premiers symptômes avant 50 ans ; Huang, 2003).

Cliniquement, ces patients souffrent d'un parkinsonisme répondant à la lévodopa (L-DOPA) et certains montrent des fluctuations diurnes, avec des symptômes s'aggravant en fin de journée.

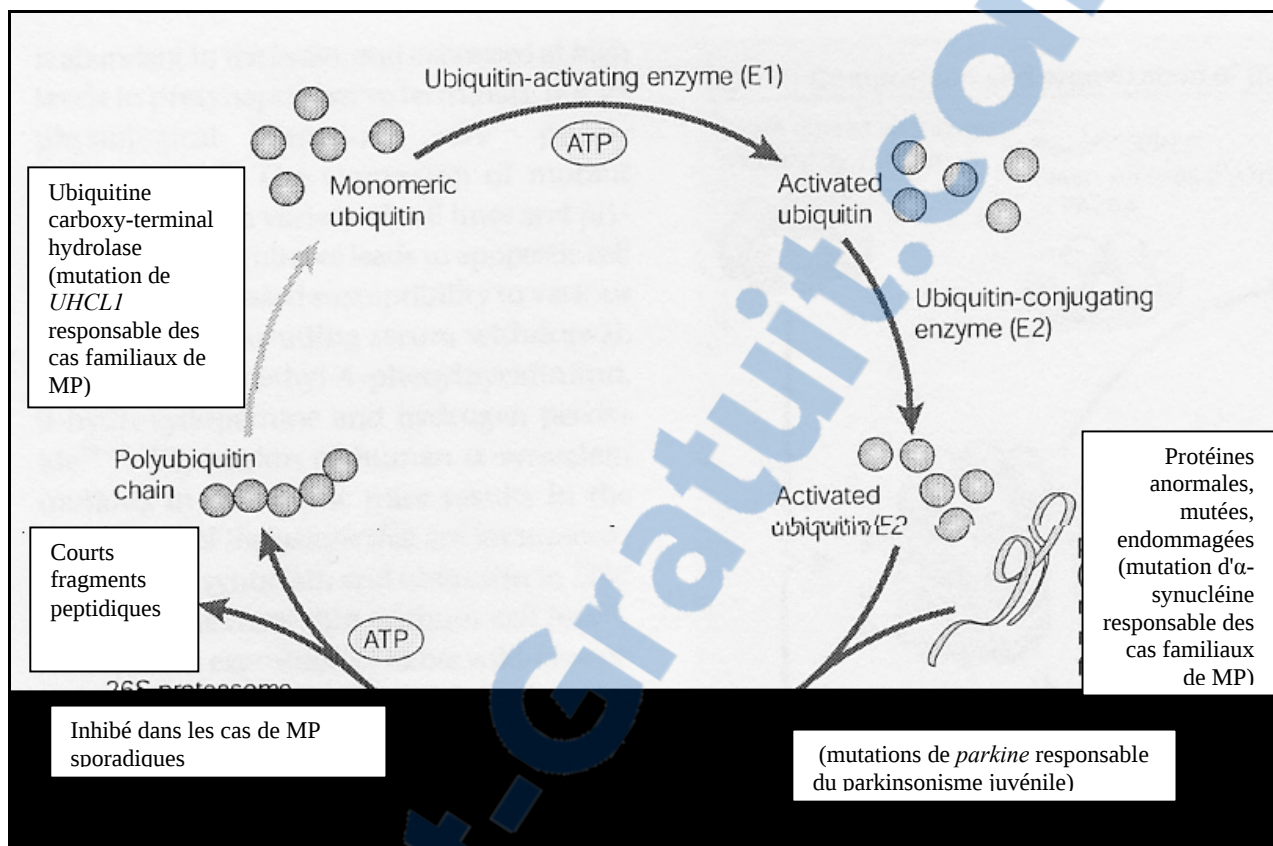
D'un point de vue pathologique, on observe une dégénérescence sévère et sélective des neurones dopaminergiques dans la substance noire mais on ne met pas en évidence de corps de Lewy. Le fait que la présence de corps de Lewy ne semble pas nécessaire à la dégénérescence sélective des neurones dopaminergiques de la substance noire soulève une question intéressante : cette marque pathologique (les corps de Lewy) doit-elle être considérée comme un composant essentiel du processus de la maladie (Gasser, 2002) ?

Le locus génétique de AR-JP a été localisé sur le chromosome 6 dans des populations japonaises ; et de multiples mutations ont été identifiées dans un grand gène de cette région appelé *parkine*, un gène à la fonction inconnue au moment de sa découverte.

La parkine est une protéine trouvée à la fois dans le cytosol et associée à des membranes. Elle fonctionne comme une ubiquitine-protéine ligase (E3) dans la voie de dégradation cellulaire d'ubiquitination. La ligase est responsable de l'attachement de la protéine ubiquitine à ses substrats. Il est concevable que la perte de la fonction *parkine* puisse conduire à l'accumulation de substrats non liés à l'ubiquitine, délétères pour la cellule dopaminergique, qui n'étant pas ubiquitinés, ne s'agrègeraient pas en corps de Lewy.

L'interaction possible entre l' α -synucléine et la parkine est à explorer. En effet cela pourrait fournir le lien entre le parkinsonisme juvénile associé à la parkine et la forme classique de MP (apparition tardive des premiers symptômes). Cependant, comme la parkine et l' α -synucléine sont toutes les deux des protéines exprimées abondamment dans le cerveau, ceci n'explique pas la sélectivité évidente du processus de dégénérescence des neurones dopaminergiques (Figure 2).

Figure 2 Dégradation des protéines anormales par le système ubiquitine-protéasome et altération du système qui conduit au développement de MP.
(D'après Mc Naught et al. , 2001)



c. *UCHL1*: Parkinsonisme associé à une mutation du gène *UCHL1* codant pour l'ubiquitine carboxy-terminal hydrolase L1.

Une mutation faux-sens dans le gène codant pour *UCHL1*, situé sur le chromosome 4p, a été identifiée chez des individus affectés par la maladie de Parkinson et issus de famille d'origine allemande.

UCH-L1 est une protéine abondamment exprimée dans le cerveau, on suppose même qu'elle représente 1% des protéines du cerveau. Sa fonction est inconnue, cependant il est supposé qu'elle a pour effet de recycler l'ubiquitine par hydrolyse des peptides ubiquitinés, produits du protéasome (Lansbury et Brice, 2002).

Il a été montré *in vitro* que cette mutation entraîne une réduction de l'activité enzymatique de l'hydrolase ubiquitine. Cependant, étant donné que ni sa fonction *in vivo* dans des conditions normales, ni son rôle dans la voie moléculaire conduisant à la dégénérescence de la substance noire ne sont connus, il est difficile aujourd'hui d'affirmer son rôle pathogénique.

Cependant la découverte de cette mutation associée à la maladie de Parkinson est intrigante, car encore une fois cela implique la voie de dégradation cellulaire ubiquitination/protéine (Gasser, 2001).

d. La voie de l'ubiquitine (Figure 2)

Il semble donc que les deux protéines parkine et UCH-L1 soient impliquées dans la voie métabolique incluant le système ubiquitine/protéasome de dégradation des protéines anormales, une voie considérée comme un contrôle de qualité cellulaire. En bref, le système ubiquitine correspond à un complexe multi-enzymatiques hautement conservé qui lie une chaîne de molécules ubiquitines (protéine de 76 acides aminés) à une variété de protéines dont la cellule souhaite se débarrasser (habituellement des protéines incapables de provoquer des liaisons ou des protéines endommagées). Dans la première étape, l'enzyme E1 (activante) active l'ubiquitine et la connecte à l'enzyme E2 (conjugante). L'enzyme E3 transfère alors l'ubiquitine activée de E2 à une protéine devant être dégradée. Ce processus est répété jusqu'à ce qu'une chaîne de plusieurs molécules d'ubiquitines soit formée. Le complexe conjugué "ubiquitine- protéines" est alors reconnu par le protéasome 26S qui dégrade les protéines en petits fragments puis en acides aminés.

Quand cette voie métabolique est défaillante, des processus pathologiques peuvent apparaître. Ainsi, il est possible que des mutations des gènes *parkine* et UCH-L1 puissent conduire au dysfonctionnement de cette voie ; les protéines anormales ne sont alors pas dégradées. Au lieu de cela, elles forment des agrégats qui conduisent à la dégénérescence cellulaire, par un mécanisme inconnu (Shastry, 2001).

En plus de ces trois principaux gènes, 6 autres loci ont été mis en évidence pour leur rôle potentiel dans une étiologie génétique de la maladie de Parkinson. Les résultats des nombreuses études à leur sujet sont encore trop peu informatifs pour les énumérer ici.

e. La contribution génétique aux cas sporadiques de MP

Bien que les analyses de génétique moléculaire aient permis des progrès significatifs dans les familles au phénotype parkinsonien avec une hérédité mendélienne, il faut se souvenir que la grande majorité des cas de MP est sporadique.

Il existe un sous-ensemble de 5 à 15% des familles avec plus d'un membre de la famille affecté. Des cas secondaires de MP sont relevés plus fréquemment parmi des parents des patients affectés que dans une population contrôle saine ; cependant un mode évident de transmission de la maladie ne peut être établi.

Le type et l'étendue d'une contribution génétique non-mendélienne sont encore controversés et de nombreuses études sont en cours pour investiguer cet aspect. Par exemple, une très grande étude (Tanner *et al.* , 1999 et Lazzarini *et al.* , 1994) réalisée sur des jumeaux a montré que des causes génétiques peuvent être particulièrement importantes dans les cas de MP où le début des symptômes est précoce (avant 50 ans), mais sont négligeables quand l'apparition des symptômes commencent après 50 ans.

D'autres investigations sont nécessaires pour permettre de mieux comprendre la part génétique de MP dans les cas sporadiques.

1.3.2. Facteurs environnementaux

La maladie de Parkinson typique a une forme sporadique et de nombreuses études soutiennent l'hypothèse d'une origine environnementale.

a. Xénobiotiques

Une grande avancée dans l'étude et la compréhension de la maladie de Parkinson a eu lieu avec la découverte du 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), un simple analogue de la pyridine, molécule ayant été identifiée comme la cause des syndromes parkinsoniens dans un groupe de narcotomanes. Cette découverte a déclenché l'idée qu'une exposition à des agents exogènes pouvait être une des causes de MP et a incité la recherche des facteurs environnementaux comme cause de MP.

MPTP a alors été utilisé comme paradigme pour se restreindre à la recherche de toxiques étiologiquement reliés à MP.

La toxicologie de MPTP est très bien caractérisée. Le composant traverse la barrière hémato-encéphalique grâce à sa lipophilie, où il est alors oxydé par la monoamine oxydase B (MAO-B) en 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP^+). MPP^+ est transporté activement dans les terminaisons nerveuses par le transporteur de la dopamine (DAT) et est concentré dans les mitochondries. Dans les mitochondries, MPP^+ inhibe le complexe I NADH, bloquant ainsi la phosphorylation oxydative et la production d'ATP ; ceci a pour effet d'augmenter la concentration en radicaux libres et en monoxyde d'azote conduisant ainsi à une mort cellulaire apoptotique rapide (Tanner, 2002).

b. Pesticides, Herbicides, Fongicides

Depuis la seconde guerre mondiale, de nombreux pesticides (insecticides, herbicides, fongicides, rodenticides et fumigènes) ont été largement utilisés. Depuis quelques dizaines années, l'exposition aux pesticides semble être considérée comme un facteur clef dans l'étiologie de MP (Lai et *al.*, 2001). Il existe aussi des indices soutenant l'hypothèse qu'une exposition aux pesticides augmente la mortalité chez les patients parkinsoniens (Huang, 2003).

L'exposition aux pesticides peut avoir lieu directement par contact avec la peau, absorption de nourriture ou eau contaminées, ou inhalation de particules aérosols de pesticides ou fumigènes.

Il faut noter que la plupart des études regroupent plusieurs agents -pesticides, herbicides et insecticides- dans la catégorie "pesticides". Ainsi, nous ne connaissons pas le risque associé à chacun des agents.

Les pesticides semblent agir comme poisons mitochondriaux. Les complexes de transports d'électrons dans la mitochondrie et la synthèse d'ATP sont inhibés par les herbicides diphényléther, DDT (dichloro-diphényl-trichloroéthane) et autres insecticides organochlorés, par les herbicides thiadiazoles, les insecticides pyréthroïdes et les fongicides benzimidazoles. Dans une étude récente, Betarbet *et al.* ont décrit un modèle animal de MP obtenu par administration chronique de l'insecticide roténone à des rats. Ce modèle est unique pour plusieurs raisons. D'abord, d'un point de vue pathologique, il imite MP de manière encore plus fidèle que le modèle MPTP : dégénérescence hautement spécifique des neurones dopaminergiques avec inclusions de type "corps de Lewy", accompagnée d'hypokinésie et de rigidité. Ensuite, le syndrome ne se développe qu'après administration chronique. Enfin, comme MPTP, la roténone est un potentiel inhibiteur du complexe mitochondrial I, qui est désigné comme le "site sensible à la roténone".

Enfin, en plus de leurs effets directs sur la respiration mitochondriale, d'autres mécanismes pourraient expliquer la toxicité des pesticides. Il semble que de nombreux composants, roténone incluse, accélèrent la formation des fibrilles d' α -synucléine (Uversky *et al.* , 2001). Les fibrilles conduisent alors à la formation d'agrégats de protéines α -synucléines, de même type que ceux trouvés dans les corps de Lewy. Le rôle de ces agrégats dans MP, déclencheurs ou protecteurs, n'est pas encore déterminé. Cependant, le fait que les pesticides aient la capacité d'imiter une caractéristique pathologique de MP *in vitro*, fournit un indice important pour la compréhension du processus de dégénérescence présent dans MP (Tanner, 2002).

c. Mode de vie rurale et agriculture

Diverses études cas/témoins réalisées dans le monde entier ont identifié le mode de vie rurale, les activités de la ferme, le jardinage et la consommation d'eau de puits comme des facteurs de risque pour MP. Il reste cependant à comprendre comment des facteurs ruraux peuvent être en relation avec MP en dehors de l'exposition aux pesticides (Tanner, 2002).

d. Infection

Depuis l'observation pendant la pandémie de grippe au début du siècle que l'encéphalite peut précéder le parkinsonisme, de nombreuses études ont cherché à identifier un agent infectieux comme facteur étiologique dans les MP typiques. Bien qu'une poignée d'associations sporadiques aient été publiées, ceci a rarement été confirmé.

Par exemple, l'exposition *in utero* au virus de la grippe serait responsable de l'endommagement de la substance noire fœtale, prédisposant ainsi à MP à l'âge adulte. D'autre part la diphtérie chez l'enfant et le croup ont été directement associés à MP.

Bien qu'un processus infectieux puisse expliquer la nature familiale de MP, le manque de mise en évidence de groupements familiaux ou géographiques et l'impossibilité d'identifier un agent infectieux spécifique sont en défaveur de l'infection comme facteur étiologique primaire (Tanner, 2002).

e. Régime alimentaire

Des différences de régimes alimentaires pourraient expliquer la variabilité géographique de la prévalence de MP ou le regroupement familial de la maladie. Le rôle possible du régime alimentaire comme facteur protecteur de MP a été investigué dans de nombreuses études cas/témoins. Celles-ci ont fourni plusieurs associations, qu'il reste encore à évaluer.

Etant donné le rôle potentiellement protecteur des antioxydants contenus dans la nourriture et les vitamines, de nombreuses études ont examiné l'association de ceux-ci avec MP. Les résultats sont très mitigés.

Aujourd'hui, certaines données soutiennent le rôle protecteur du tocophérol. Aucune autre association avec d'autres vitamines antioxydantes n'a été trouvée. On observe également une association inverse entre MP et la prise de niacine, et la consommation de légumes, noix et pommes de terre. La consommation de nourriture à taux élevé en lipides d'origine animale a été associée positivement à MP dans plusieurs études, ainsi que la consommation élevée de calories. Il est suggéré qu'à la fois une forte consommation de calories et de lipides augmente le stress oxydatif, l'un des mécanismes suggérés dans MP (que nous expliciterons plus tard dans cette partie).

Enfin, il a été montré que des restrictions alimentaires ralentissent la perte de neurones dopaminergiques chez des rats ayant reçus le neurotoxique MPTP (Tanner, 2001).

f. Caféine

Il a été mis en évidence une association inverse entre la consommation de café et caféine et MP. Chez les hommes, plus de café ou caféine sont consommés au cours de la vie adulte, moins le risque de développer la maladie de Parkinson ultérieurement est important. Chez les femmes, cet effet n'est pas vérifié avec autant de certitude.

Il est supposé que l'effet stimulant de la caféine agit par son effet antagoniste sur le récepteur A2a à l'adénosine. Un effet neuroprotecteur possible de la caféine et autres antagonistes des récepteurs A2a à l'adénosine a été mis en évidence par des expériences dans lesquelles la pré-administration de caféine ou autres antagonistes des récepteurs A2a à l'adénosine atténuent la perte de dopamine dans le striatum chez des souris ayant reçu MPTP.

g. Dépression et stress

Une dépression importante apparaît souvent chez les patients atteints de la maladie de Parkinson et est indépendante du degré de l'altération fonctionnelle. Certaines études ont montré que la dépression peut précéder les symptômes moteurs, cependant il n'est pas établi de manière claire si la dépression est un facteur de risque pour le développement futur de MP ou une manifestation précoce de la maladie.

D'autres formes de stress physique et psychologique ont été liées à un risque accru de MP. Ces états physiologiques peuvent être associés à un accroissement du métabolisme des catécholamines conduisant à un stress oxydatif neuronal (Tanner, 2001).

h. Tabagisme

Un des facteurs de risque le plus régulièrement observé est le non-tabagisme. Il a été observé une association inverse entre la consommation de cigarettes et MP dans diverses populations à travers des études s'étalant sur plus de 30 années, incluant plusieurs larges études prospectives.

Le risque de MP chez les fumeurs semblent deux fois moins important que chez les non-fumeurs, et inversement proportionnel à un "effet dose" sur l'ensemble de la vie, ceci suggérant un réel effet protecteur. Cette hypothèse est renforcée par des observations expérimentales montrant l'effet protecteur de la nicotine sur les effets du vieillissement, de MPTP et l'altération neuronale de la substance noire chez des rats induits par le 6-hydroxydopamine. De plus la nicotine possède des propriétés antioxydantes et accroît les facteurs trophiques du striatum.

Ainsi, l'étiologie primaire de la dégénérescence sélective des neurones de la substance noire responsable de MP reste encore largement méconnue. Il semble que la maladie de Parkinson résulte de l'interaction entre une prédisposition génétique et des facteurs environnementaux. Ces deux aspects doivent encore être étudiés pour accroître nos connaissances sur les causes de MP.

I.4. Anatomie, physiologie et physiopathologie

I.4.1. *Anatomie fonctionnelle de la substance noire et physiologie*

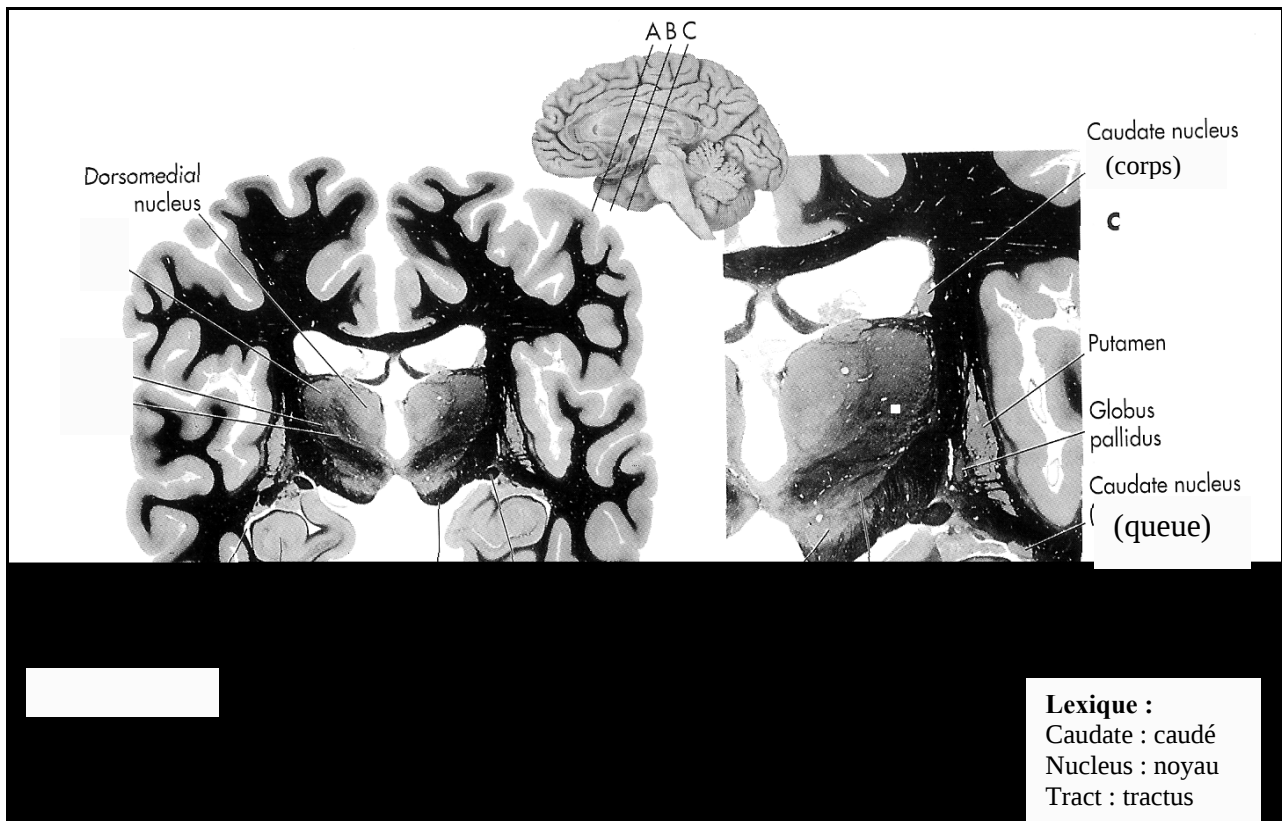
Les symptômes de la maladie sont provoqués par la lésion de la substance noire. La substance noire (SN) fait partie des cinq noyaux qui constituent les noyaux gris de la base.

Les noyaux gris de la base sont constitués d'un groupement de 5 structures de matière grise situés profondément dans le cerveau le long du cortex cérébral et entourant le thalamus et l'hypothalamus. Ces structures mésencéphaliques sont le noyau caudé, le putamen, le globus pallidus, les noyaux sous-thalamiques et la substance noire. Le putamen et le noyau caudé sont regroupés sous le nom de striatum.

La substance noire est située dans la moitié rostrale du mésencéphale où elle forme un noyau épais à la limite dorsale des pédoncules cérébraux. Elle est composée de deux couches distinctes: une ***pars reticulata*** et une ***pars compacta*** (Figure 3).

La partie ***pars compacta*** est située en partie dorsale de la SN et est composée de neurones associés de manière compacte et pigmentés; la région ***pars reticulata*** est située plus proche du pédoncule cérébrale et se compose de neurones associés de manière plus lâche et dont la plupart sont non-pigmentés (Nolte, 2002).

Figure 3 Noyaux gris de la base et structures adjacentes observés après section frontale de l'encéphale (D'après Nolte, 2002).

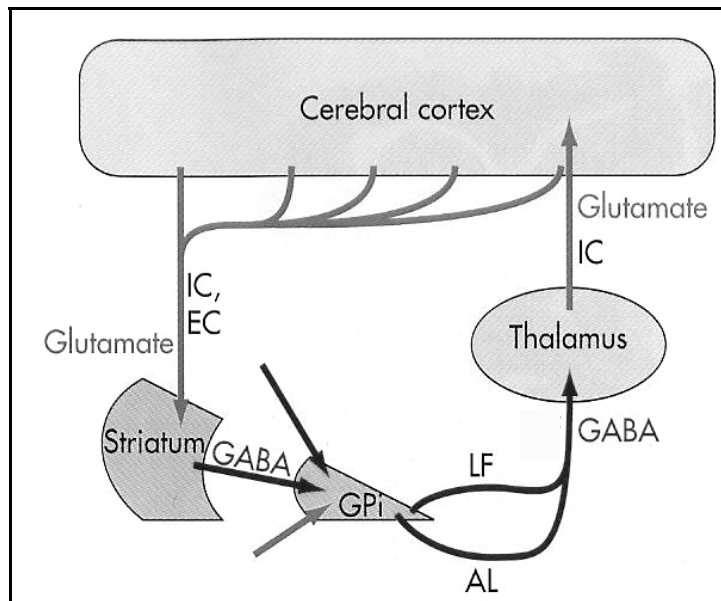


Les noyaux gris de la base sont responsables de la modulation et de la facilitation de l'exécution de divers programmes moteurs et cognitifs.

Bien que la physiologie exacte des noyaux gris de la base soit encore à établir, il est supposé que les noyaux gris de la base facilitent les mouvements moteurs grâce à une boucle feedback. Cette boucle s'initialise avec des projections originaires d'une aire du cortex cérébral, traverse le striatum, le pallidum et le thalamus pour revenir à l'aire corticale initiale (Young, 2002). Les projections du cortex atteignent le striatum, qui dans ce sens est le principal élément des noyaux gris de la base recevant des voies afférentes. Les voies efférentes quittent le segment interne du globus pallidus et la partie réticulaire de la substance noire.

Il existe de nombreuses versions de cette boucle, toutes similaires dans le principe mais chacune utilisant des aires corticales différentes et une portion particulière du striatum et du globus pallidus. (Figure 4).

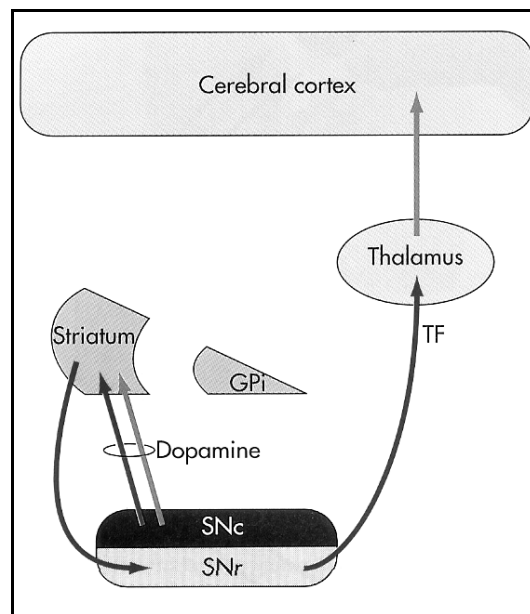
**Figure 4 Principal circuit des noyaux gris de la base
(D'après Nolte, 2002)**



IC: capsule interne; EC: capsule externe; GPi: globus pallidus interne ; LF: lenticular fasciculus; AL : anse lenticulaire ; cerebral cortex : cortex cérébral .

Les deux couches de la substance noire ont des rôles très distincts. Tandis que la partie réticulaire de SN (SNr) joue un rôle similaire à celui du globus pallidus comme il a été vu plus haut, les neurones pigmentés de la partie compacte de SN (SNc) projettent d'une manière topographique très organisée vers le putamen et le noyau caudé. Ils utilisent la dopamine comme neurotransmetteur. Ces projections dopaminergiques ascendantes modulent les effets des projections excitatrices venant du cortex cérébral (Figure 5 et Figure 6).

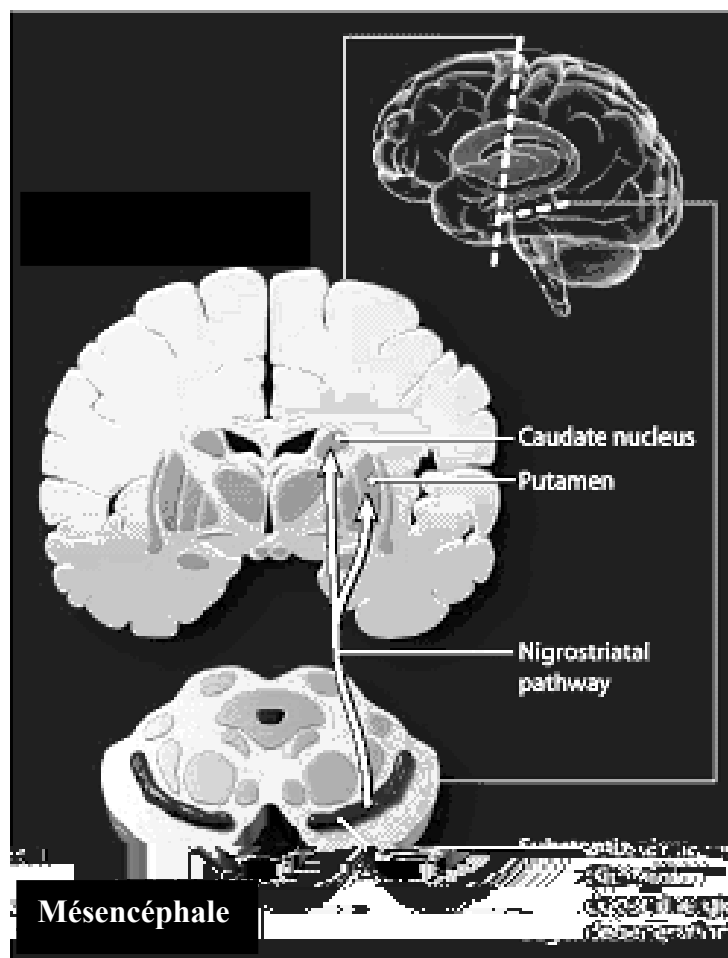
Figure 5 Circuit des noyaux gris de la base incluant la substance noire
(D'après Nolte, 2002)



SNc : substance noire partie compacte, SNr : substance noire partie réticulaire.

Figure 6 Section frontale de l'encéphale montrant la voie nigrostriatale et la localisation de la dégénérescence dopaminergique chez les patients atteints de MP
(D'après Guttman et al. , 2003)

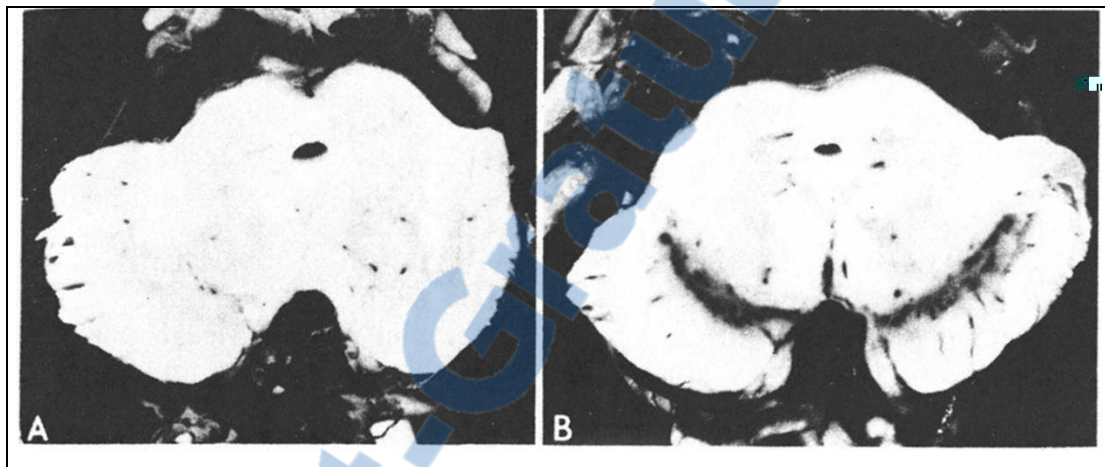
Caudate nucleus : noyau caudé ; Nigrostriatal pathway : voie nigrostriatale; Substantia nigra (site of dopaminergic degeneration : substance noire (site de dégénérescence dopaminergique).



I.4.2. Physiopathologie

Dans la maladie de Parkinson, il y a une dégénérescence sélective des neurones pigmentés de la SNc. La dégénérescence de la SN est donc accompagnée de sa dépigmentation. La Figure 7 présente deux SN, l'une saine, l'autre issue d'un individu Parkinsonien, la différence de pigmentation est nettement visible.

Figure 7 Dépigmentation de la substance noire dans un cas de maladie de Parkinson (A) et comparaison avec une substance noire normale (B)
(D'après Escourolle et Poirier, 1977).



La dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire provoque secondairement une diminution du niveau dopaminergique du système dopaminergique nigro-strié et secondairement la déplétion du noyau caudé et du putamen. Ceci entraîne donc des difficultés à faciliter ou maintenir les programmes moteurs, et donc l'exécution des mouvements désirés, et aboutit à l'apparition des symptômes parkinsoniens (Young, 2002).

Le premier symptôme du parkinsonisme apparaît lorsque environ 70 à 80% des cellules de la SNc sont mortes. Etant donné que la mort des cellules de la SNc persiste, le nombre des symptômes et leur gravité augmentent.

I.5. Neuropathologie et mécanismes pathologiques de la maladie de Parkinson

L'examen histologique de la substance noire met en évidence 4 éléments spécifiques:

- La **disparition** spécifique d'un grand nombre de **neurones pigmentés de la SNc** et une atrophie des neurones restants.
- Une immunoréactivité à l' α -synucléine.
- La présence de **corps de Lewy** dans les neurones dopaminergiques restants, inclusions neuronales cytoplasmiques, de forme arrondie, résultant essentiellement de l'agrégation de protéines α -synucléines. Ce sont les marqueurs spécifiques de la maladie de Parkinson.
- Une activation gliale.

La perte des neurones dopaminergiques est accompagnée d'une réduction dramatique de la teneur en dopamine de la substance noire et du striatum alors que ces structures renferment normalement 80% de la dopamine cérébrale (Dev et van der Putten, 2002).

I.5.1. *L' α -synucléine et synucléinopathies*

La forme classique de la maladie de Parkinson est classée dans les synucléinopathies, classement fondé sur les anomalies structurales et biochimiques de la protéine α -synucléine.

La protéine α -synucléine a été découverte comme composant non-amyloïde des plaques séniles dans la maladie d'Alzheimer. L'intérêt de la communauté scientifique pour la protéine α -synucléine s'est développé suite à la découverte que son gène, localisé sur le chromosome 4, était muté dans les rares cas de MP de forme familiale. Par la suite, il a été montré que l' α -synucléine était présente dans les corps de Lewy (CL). L' α -synucléine est une protéine hautement conservée chez les vertébrés et seulement 7 acides aminés sur 140 de la séquence protéique de l' α -synucléine diffèrent entre l'homme et la souris.

Fonction de la protéine α -synucléine (Dev et Hofele, 2002)

Le type sauvage de la protéine α -synucléine est exprimé dans un grand nombre de cellules neuronales et non-neuronales, parmi lesquelles on peut citer les neurones corticaux, dopaminergiques, noradrénergiques et les cellules endothéliales. En plus de son rôle de liaison aux acides gras, l' α -synucléine a aussi pour fonction la régulation physiologique de certaines enzymes, transporteurs et vésicules contenant des neurotransmetteurs, ainsi que des rôles dans la survie neuronale. Plus spécifiquement, on suppose que l' α -synucléine permet la régulation de la neurotransmission dopaminergique à travers son effet sur les vésicules de stockage de la dopamine.

Cette fonction est altérée lorsque l' α -synucléine est mutée. De manière plus générale, on pense que l' α -synucléine joue un rôle dans la régulation du pool de vésicules pré-synaptiques.

Synucléinopathies

En 1997, il a été découvert deux mutations (A53T et A30P) dans la région N-terminale de l' α -synucléine, responsables de rares formes de la maladie de Parkinson familiale. Contrairement aux cas familiaux de MP dus à des mutations de l' α -synucléine, les mécanismes de la maladie dans la plupart des synucléinopathies impliquent le type sauvage de l' α -synucléine et semblent tous converger autour d'altérations oxydatives et de dysfonctionnement du catabolisme protéique. Cependant, on ne sait pas encore si ces mécanismes impliquent l' α -synucléine dès le début ou si un défaut dans la gestion de cette protéine contribue à la progression de la maladie par accumulation de formes toxiques de l' α -synucléine et par conséquent à l'altération des neurones.

Rôle pathologique de l' α -synucléine (α Sn)

1. α Sn et CL : α Sn est le composant majeur des corps de Lewy.
2. Deux mutations de α Sn sont liées à des formes rares de MP familiales.
3. α Sn forme des fibrilles, protofibrilles et oligomères toxiques.
4. L'expression de α Sn dans les cellules facilite la mort cellulaire, promeut le déficit mitochondrial et augmente la sensibilité au stress oxydatif.
5. Des agrégats de α Sn sont présents dans les cellules de la SNc de modèles animaux dont la maladie de Parkinson a été induite chimiquement par MPTP.
6. Les agrégats de α Sn apparaissent après inhibition de la fonction mitochondriale et disparaissent après sa restauration.

a. Corps de Lewy

Les corps de Lewy (CL) décrits pour la première fois par Lewy en 1912 sont devenus, depuis, l'empreinte pathologique spécifique de la maladie de Parkinson (Fornai *et al.*, 2003).

Les corps de Lewy sont des inclusions concentriques cytoplasmiques hyalines retrouvées dans les populations de neurones les plus spécifiquement vulnérables, lors de la maladie de Parkinson. Ils contiennent des agrégats de nombreuses protéines différentes et sont principalement localisés dans les neurones dopaminergiques qui subsistent dans la SNc. Tandis que la plupart des CL sont uniques et sphériques, certains neurones présentent des CL multiples ou pléomorphiques.

L'ultrastructure des CL montre des structures non-membranées et granulo-filamenteuses. La région centrale du corps de Lewy est habituellement constituée d'un matériel dense et amorphe qui ne présente aucun détail particulier, tandis que la périphérie présente des filaments de 10 nm disposés selon le rayon du corps de Lewy.

Les neurones les plus susceptibles de présenter des CL sont les neurones dopaminergiques de la SNc, les neurones du locus ceruleus et ceux du noyau moteur dorsal du nerf vague. Les CL sont rarement retrouvés dans les noyaux gris de la base ou le thalamus.

Les corps de Lewy sont détectés par des analyses histopathologiques de routine.

Des anticorps anti-neurofilaments furent les premiers marqueurs à mettre les CL en évidence, cependant la plupart des anticorps anti-neurofilaments ne marquent qu'un sous groupe de CL. La protéine ubiquitine est présente dans la plupart des CL, mais la méthode la plus spécifique pour détecter les corps de Lewy est la détection immunocytochimique de la protéine α -synucléine.

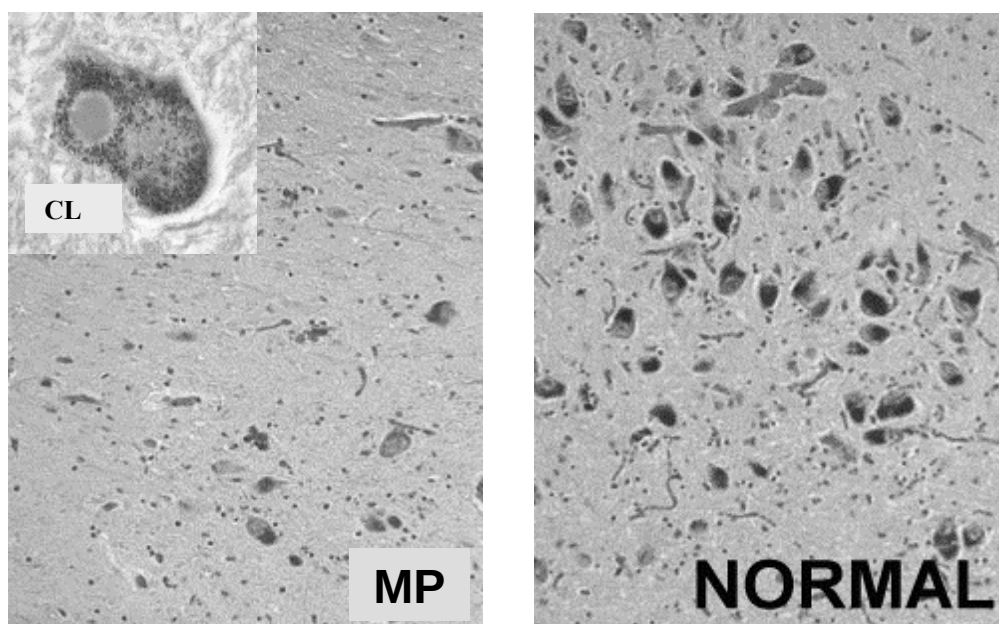
L' α -synucléine est le composant structural majeur des corps de Lewy dans lesquels la protéine forme des agrégats. Des études *in vitro* ont montré que l' α -synucléine s'agrège pour former des filaments similaires à ceux observés dans les corps de Lewy (Dickson, 2002).

Les agrégats protéiques des corps de Lewy sont aussi composés, en plus de l' α -synucléine, des protéines ubiquitine et parkine.

b. Pathologie de la maladie de Parkinson

A l'autopsie, un cerveau parkinsonien ne présente aucune caractéristique remarquable avant sa section. Après section, la perte de pigmentation de la substance noire devient apparente. La corrélation histologique de la perte de pigmentation est la perte des neurones pigmentés (contenant de la neuromélanine) de la SNc, mentionnée plus haut. La perte neuronale de la SN est accompagnée d'une activation des astrocytes et des cellules microgliales. De la neuromélanine est fréquemment retrouvée dans le cytoplasme de macrophages, et occasionnellement on peut observer des images de neurones phagocytés par des macrophages. Dans les neurones résiduels de la SNc, on trouve des corps de Lewy (Figure 8). Des caractéristique

Figure 8 Section de substance noire (MP) montrant une perte de neurones et une réactivité à l' α -synucléine dans un corps de Lewy (CL) en comparaison avec une section normale (NORMAL)
(D'après <http://www.medlib.med.utah.edu/WebPath/TUTORIAL/CNS/CNSDG.html>)



1.5.2. Mécanismes impliqués dans la maladie de Parkinson

a. Dysfonctionnement mitochondrial et maladie de Parkinson (Betarbet *et al.*, 2002)

MPTP et altération du complexe I

Nous avons déjà évoqué précédemment le fait que l'administration de la molécule MPTP est l'approche la plus commune pour étudier la maladie de Parkinson dans des modèles animaux.

L'exposition à MPTP conduit à la dégénérescence sélective des neurones dopaminergiques de la substance noire. En effet MPTP traverse la barrière hémato-encéphalique et est métabolisé en MPP^+ . MPP^+ , métabolite alors activé, pénètre sélectivement dans les neurones dopaminergiques grâce à son affinité pour le transporteur à la dopamine et devient alors sélectivement toxique pour les neurones dopaminergiques. De plus, MPP^+ s'accumule dans les mitochondries à l'échelle de concentrations millimolaires et inhibe la respiration mitochondriale au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire.

Ces données suggèrent donc que le dysfonctionnement mitochondrial et l'inhibition du complexe I jouent un rôle dans les mécanismes pathologiques de MP.

Complexe I et MP

La chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie produit de l'ATP grâce à des phosphorylations oxydatives. Ce processus implique l'activité de 5 complexes, nommés complexes I, II, III, IV et V situés sur la membrane interne de la mitochondrie. Les sous-unités

protéiques de ces complexes sont codées soit par le génome nucléaire soit par le génome mitochondrial. Schapira et ses collègues ont mis en évidence pour la première fois un défaut sélectif du complexe I dans la substance noire de patients atteints de MP (Schapira *et al.* , 1989). Plus tard, il a été mis en évidence le fait que le défaut du complexe I est systémique dans la maladie de Parkinson et affecte des tissus en dehors du cerveau comme les lymphocytes, plaquettes et muscles. L'origine du défaut du complexe I, génétique ou acquise, reste encore incertaine.

Il est supposé que le défaut systémique du complexe I dans les cas sporadiques de MP puisse être dû à l'acquisition d'anomalies dans les sous-unités protéiques codées par le génome nucléaire ou mitochondrial ou puisse résulter de l'inhibition du complexe I par des toxines environnementales.

Des études récentes indiquent qu'il existe une contribution de l'ADN mitochondrial (ADNmt) à la pathogénie de Parkinson. Il a été montré par études *in vitro* que le défaut du complexe I chez les parkinsoniens peut être transmis par l'ADNmt. Il est donc possible que le défaut du complexe I dans un sous-groupe de patients parkinsoniens soit dû à une anomalie de l'ADNmt (Graeber *et al.* , 1999).

Roténone et MP

Afin de comprendre comment le défaut systémique du complexe I résulte en une dégénérescence progressive et hautement sélective de la voie dopaminergique nigrostriatale, il a été développé un nouveau modèle de MP fondé sur l'inhibition chronique et systémique du complexe I grâce à la roténone. La roténone est un inhibiteur naturel du complexe I utilisé communément comme insecticide. De plus, la roténone est liposoluble, traverse aisément la barrière hémato-encéphalique et accède ainsi rapidement au cerveau. Par exposition systématique et chronique de rats à de faibles doses de roténone, on obtient une inhibition uniforme du complexe I dans l'ensemble du cerveau. Ainsi l'action de la roténone diffère de celle de MPTP qui inhibe spécifiquement le complexe I des neurones dopaminergiques en raison de son affinité pour le transporteur à la dopamine.

Bien que la roténone inhibe le complexe I de manière uniforme, elle provoque la dégénérescence sélective de la voie dopaminergique nigrostriatale et la formation d'inclusions positives à l'ubiquitine et l' α -synucléine dans les cellules de la SNC, similaires à des corps de Lewy.

Ainsi ce modèle montre que la maladie de MP peut être reproduite par inhibition systémique du complexe I. Ceci indique que la voie dopaminergique nigrostriatale est sélectivement et intrinsèquement sensible au dysfonctionnement du complexe I.

Le dysfonctionnement du complexe I peut prédisposer les neurones à l'excitotoxicité et au stress oxydatif, deux mécanismes impliqués dans la pathogenèse de MP.

b. Excitotoxicité (Betarbet *et al.* , 2002)

L'altération du complexe I associée à la maladie de Parkinson pourrait prédisposer les neurones à une mort excitotoxique. La théorie de l'excitotoxicité repose sur l'implication potentielle des acides aminés excitateurs dans les processus dégénératifs.

La diminution de la concentration cellulaire en ATP, conséquence du dysfonctionnement du complexe I, pourrait altérer l'homéostasie cellulaire. La perte d'ATP réduit alors la fonction ATPase Na^+/K^+ , ce qui résulte en la dépolarisation neuronale partielle et la diminution du blocage voltage-dépendant du récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA) au glutamate. Dans ces conditions, même des niveaux normaux de stimulation au glutamate pourraient causer une activation excitotoxique des récepteurs NMDA et provoquer de grands passages cellulaires de calcium, qui iraient alors interférer avec la production cellulaire d'énergie. Ainsi, le défaut du complexe I deviendrait responsable de l'activation excitotoxique des récepteurs NMDA et exposerait les neurones vulnérables à cette agression.

c. Stress oxydatif (Jenner, 2003)

Le stress oxydatif contribue à la cascade réactionnelle qui conduit à la dégénérescence des cellules dopaminergiques dans la maladie de Parkinson. Cependant, le stress oxydatif est intimement lié à d'autres composants du processus de dégénérescence, comme le dysfonctionnement mitochondrial, l'excitotoxicité, la toxicité du monoxyde d'azote et l'inflammation. Il est ainsi difficile de déterminer si le stress oxydatif conduit à ces événements ou est une de leurs conséquences.

La possibilité d'un stress oxydatif comme mécanisme responsable de la mort des cellules dopaminergiques est soutenue par des études post-mortem et par des études démontrant la capacité d'un stress oxydatif ou de toxines oxydantes à induire la dégénérescence des cellules nigrales.

La présence de neuromélanine dans les cellules dopaminergiques a attiré l'attention sur l'autoxydation de la dopamine et la formation et la polymérisation de sémiquinone, processus à travers lesquels des radicaux libres sont produits. Ceci conduit au concept que le métabolisme de la dopamine peut être responsable du niveau élevé de stress oxydatif basal dans la substance noire. La dégradation de la dopamine par la monoamine oxydase B qui produit du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est encore un autre élément permettant de comprendre l'implication d'un stress oxydatif.

L'oxydation enzymatique de la dopamine en H_2O_2 provoque la formation croissante de glutathion oxydé (GSSG), ce qui suggère la présence d'un stress oxydatif et l'altération d'un système antioxydant majeur. De plus, H_2O_2 est converti, par des réactions de Fenton, en radical hydroxyle, un radical hautement toxique. Ces réactions sont possibles en présence de hauts niveaux de fer, niveaux présents à l'état normal dans la substance noire.

Par conséquent, il s'est développé l'idée que des changements compensatoires précoces dans le métabolisme de la dopamine, résultant de l'initiation de la dégénérescence des cellules nigrales, conduiraient à une augmentation du nombre de métabolites oxydatifs et accentueraient le stress oxydatif dans la substance noire. Ceci contribuerait alors à la progression de la maladie de Parkinson. Tous les processus qui altèrent le cycle oxydation/réduction de GSH ou intensifient les réactions fer-dépendantes dans la substance noire peuvent alors contribuer au stress oxydatif.

La voie nigrostriatale est aussi vulnérable face à l'attaque des radicaux libres. Par exemple, la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) détruit les neurones dopaminergiques par des mécanismes qui agissent par l'intermédiaire de radicaux libres. De la même manière, MPTP induit le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale et accentue la formation de superoxyde, qui initie alors la mort cellulaire par apoptose par diminution du potentiel membranaire mitochondrial.

La plupart des composants supposés être responsables du stress oxydatif ont été mis en évidence par analyse post-mortem de tissus prélevés dans les noyaux gris de la base de patients morts de Parkinson. Il est observé que les niveaux de fer sont augmentés dans la substance noire lors de MP, que les niveaux de GSH réduits sont diminués et qu'il existe une altération du fonctionnement du complexe I mitochondrial.

En outre, il a été mis en évidence des altérations cellulaires, conséquences d'un stress oxydatif chez des patients parkinsoniens : on a observé une augmentation de la peroxydation lipidique et une altération oxydative de l'ADN et des protéines (Betarbet *et al.* , 2002).

d. Apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée, est caractérisée morphologiquement par un volume cellulaire réduit, une condensation de la chromatine et une fragmentation nucléaire avec préservation des membranes cellulaires.

Des signes d'apoptose ont été détectés post-mortem dans les neurones dopaminergiques de patients atteints de MP et de nombreuses études sont en faveur d'un mécanisme apoptotique pour expliquer la mort des neurones dopaminergiques dans MP (Orth et Schapira, 2002).

Cependant l'implication de ces mécanismes dans la pathogénie de MP est encore très controversée. En effet, il est avancé que MP est une maladie qui se développe sur de nombreuses années alors que l'apoptose est un processus très rapide, et donc qu'un mécanisme de mort cellulaire à lente évolution semble plus plausible dans MP (Kosel *et al.* , 1999 et Graeber ,1999).

Il reste donc encore à déterminer le mécanisme qui conduit à la mort des neurones dopaminergiques de la SNC.

e. Réponse inflammatoire (Wullner et Klockgether, 2003)

La production de médiateurs inflammatoires a été mise en évidence comme facteur pathogénique dans la maladie de Parkinson. En 1988, Mc Geer et ses collègues ont démontré la présence de lymphocytes T CD⁺ cytotoxiques dans la SNc de patients atteints de Parkinson.

Depuis, de nombreuses études sur tissus humains ou sur modèles animaux de MP ont mis en évidence la présence d'un processus inflammatoire.

Ce processus inflammatoire est caractérisé par l'activation des cellules de la microglie locale sans l'activation des astrocytes. Ceci suggère que la perte progressive des neurones dopaminergiques est un processus neurodégénératif permanent avec une implication minimale des tissus nerveux voisins.

f. MP et l'agrégation anormale des protéines

Les corps de Lewy, mentionnés plus haut, correspondent à l'accumulation de neurofilaments, de fibrilles d' α -synucléines, d'ubiquitines, des ubiquitine carboxy-terminal hydrolases L1 (UCHL1), de parkines, de protéines nitrées (dont des synucléines) et de nombreuses autres protéines non encore identifiées.

De plus, les mutations génétiques observées dans les cas familiaux de MP ont mis en avant l'idée que l'altération de la conformation ou du processus de dégradation d'une protéine pourrait être des éléments clefs et des facteurs communs au processus de dégénérescence dans les cas sporadiques de MP (Beterabet *et al.* , 2002).

Le système ubiquitine-protéasome (SUP)

SUP est un système essentiel pour la dégradation lysosomiale de protéines de courte durée de vie, mal localisées, de conformation anormale, mutées ou altérées (par des agressions oxydatives par exemple) dans les cellules eucaryotes.

Cette dégradation est réalisée par l'intermédiaire d'une série de réactions enzymatiques qui ont pour but d'identifier puis de lier de manière covalente les protéines anormales à de multiples molécules ubiquitines ; cette liaison agit comme signal pour la dégradation des protéines.

L'ubiquitine est activée par l'enzyme E1 grâce à un mécanisme ATP dépendant. L'ubiquitine activée est alors transférée à une enzyme E2 qui conjugue l'ubiquitine et est alors liée à des résidus lysines de substrats protéiques grâce à une réaction catalysée par de nombreuses et différentes ligases E3 de l'ubiquitine. E2 et E3 permettent le ciblage de protéines sélectives. Les protéines ubiquitines conjuguées sont ultérieurement reconnues et dégradées par le protéasome S26, qui correspond à de multiples sous-unités de protéases présentes dans le cytosol, la région périnucléaire et le noyau des cellules eucaryotes (Ciechanover, 1998).

Les produits de dégradation catalysés par le protéasome S26 sont constitués de courts fragments peptidiques et d'acides aminés qui peuvent alors être recyclés pour produire de nouvelles protéines.

Simultanément, les chaînes poly-ubiquitines sont libérées des protéines cibles et sont alors désassemblées par des hydrolases carboxy-terminale de l'ubiquitine en molécules monomériques d'ubiquitines qui entrent à nouveau dans le cycle SUP au niveau de la réaction enzymatique E1. Elles participent alors à nouveau à la dégradation de protéines anormales (Figure 2 p23).

Le dépôt de protéines dans les corps de Lewy

La première indication qu'un défaut dans la gestion des protéines anormales pourrait être un facteur crucial dans la pathogénie de MP a été la découverte des corps de Lewy, mentionnés plus haut. Le mécanisme par lequel les protéines présentes dans les corps de Lewy s'agrègent reste encore à déterminer.

Les protéines mutées dans les cas familiaux de MP

Nous avons mentionné plus haut les différentes mutations découvertes, à ce jour, associées à des cas familiaux de MP. Les effets de chacune de ces mutations semblent avoir la capacité d'interférer avec la dégradation protéique.

L' α -synucléine

Il semble que la protéine α -synucléine mutante ait tendance à s'agréger ou à être de conformation anormale et par conséquent puisse résister à la dégradation par SUP.

UCHL1

A l'état sauvage UCHL1 est responsable de l'hydrolyse des liens entre les molécules d'ubiquitines et a donc un rôle important dans la production de monomères d'ubiquitine. Il semble que la protéine mutée possède une activité réduite, ceci entraînant une réduction du nombre de protéines marquées et donc un défaut dans le système de dégradation des protéines anormales (Leroy *et al.* , 1998).

Parkine

La mutation du gène *parkine* provoque un parkinsonisme juvénile autosomique récessif (AR-JP). A l'état sauvage la parkine agit comme une enzyme ligase E3. Dans le cas de AR-JP, ni la protéine mutée, ni la protéine sauvage de la parkine ne sont présentes dans le cerveau des patients atteints.

Il semble que l'aptitude de SUP à éliminer les protéines anormales soit altérée chez les patients AR-JP.

Accumulation de protéines dans les cas sporadiques de MP

Il existe de plus en plus de données en faveur d'une altération de SUP dans le développement des cas sporadiques de MP.

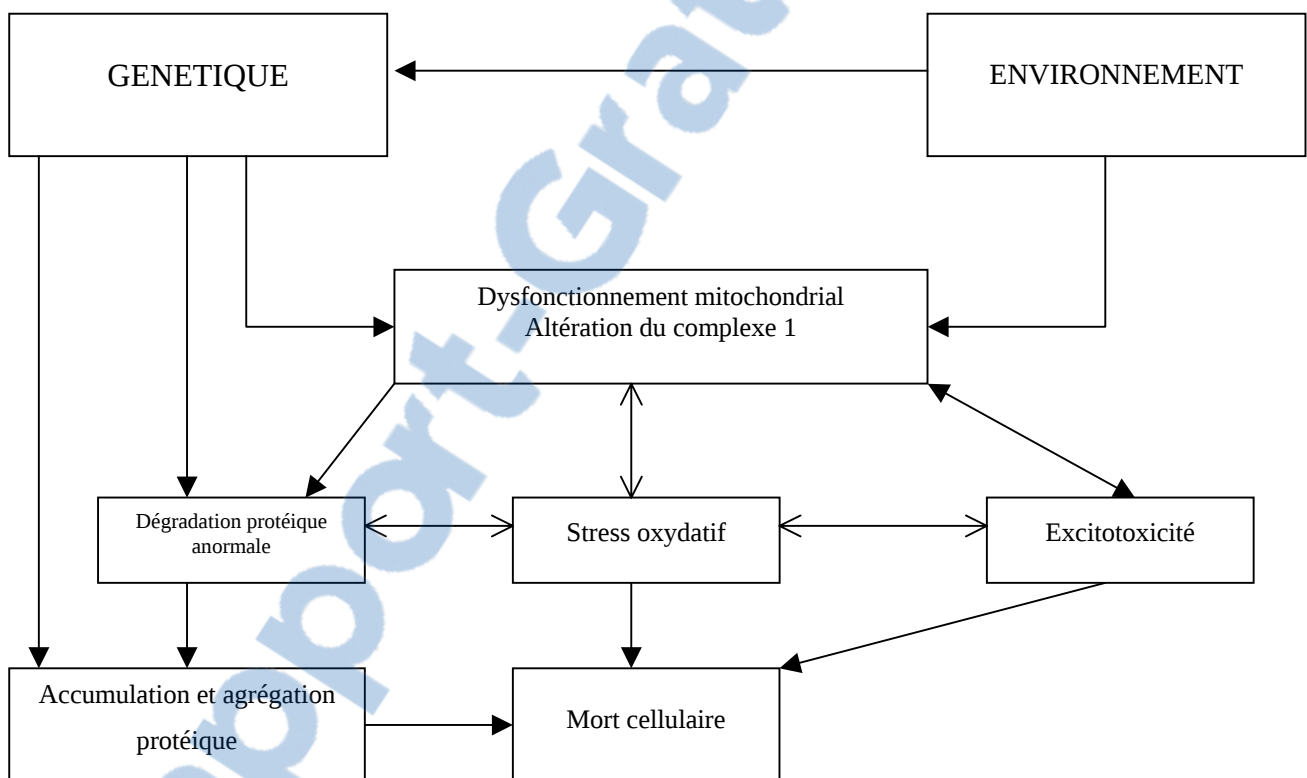
Il semble que les corps de Lewy présents dans les cas sporadiques accumulent différentes protéines qui semblent avoir été préparées à la dégradation mais qui n'entrent pas dans un processus normal de dégradation.

De plus le cerveau des patients atteints de MP contient une quantité augmentée de protéines oxydées qui pourraient être résistantes au protéasome S26.

Les cas sporadiques de MP présentent également un défaut du complexe I de la mitochondrie. Etant donné que le fonctionnement de SUP nécessite de l'ATP, l'altération du complexe I peut conduire à un dysfonctionnement de SUP.

La Figure 9 récapitule les différents mécanismes susceptibles d'être impliqués dans le développement de la maladie de Parkinson.

Figure 9 Mécanismes impliqués dans la pathogénie de Parkinson
(D'après Betarbet et al. , 2002).



I.6. Traitements actuels et perspectives

La maladie de Parkinson continue d'être l'une des causes les plus communes des handicaps moteurs affectant les personnes âgées.

Ces dernières années, en plus de l'amélioration de fonctions motrices, les avancées thérapeutiques ont eu un impact positif sur la qualité de vie des patients parkinsoniens.

Les diverses options thérapeutiques pour MP peuvent être divisées dans les différentes approches suivantes : (a) Dopaminergique—augmente la transmission dopaminergique en (i) augmentant la concentration synaptique en dopamine (DA) (lévopoda), (ii) administration d'agonistes de DA, (iii) favorisation de la libération de DA, (iv) blocage de la recapture de DA et (v) inhibition de la dégradation de DA ; (b) Non-dopaminergique—manipulation des neurotransmetteurs non-dopaminergiques avec des substances anticholinergiques et autres substances qui modulent les systèmes non-dopaminergiques ; (c) Symptomatique—traitements des symptômes spécifiques de Parkinson, (d) Neuroprotecteur—tentative de ralentir la progression de la maladie en protégeant les neurones encore présents, (e) Chirurgie—(i) ablatrice (thalamotomie, pallidotomie), (ii) stimulation profonde du cerveau et (f) Préventive—nécessitera la connaissance des causes de MP (Jankovic, 2002).

I.6.1. *Traitement pharmacologique*

a. Traitement symptomatique

Lévopoda

Le traitement principal de la maladie de Parkinson est un traitement symptomatique. Il s'agit d'un traitement par la lévopoda ou L-DOPA (nom générique), précurseur de la dopamine, qui a pour but de corriger le déficit en dopamine constaté au sein de la SN et du striatum.

La lévopoda ou désoxyphénylalanine (L-DOPA) est un acide aminé absorbé au niveau de l'intestin grêle et transporté jusqu'au cerveau à travers la barrière hémato-encéphalique (Martin et Wieler, 2003). Une fois dans le cerveau, la lévopoda est décarboxylée pour former de la dopamine. La dopamine administrée par voie générale ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique.

La nécessité de recourir à des doses élevées, de l'ordre de 3 ou 4 grammes par jour, résulte de la décarboxylation de la lévopoda en dopamine qui se produit dans la plupart des tissus de l'organisme, ne laissant qu'une fraction de la dose ingérée disponible pour le système nerveux central. Une partie des effets indésirables, notamment digestifs et cardiovasculaires, résulte de la production de dopamine au sein des divers tissus (Jankovic, 2002).

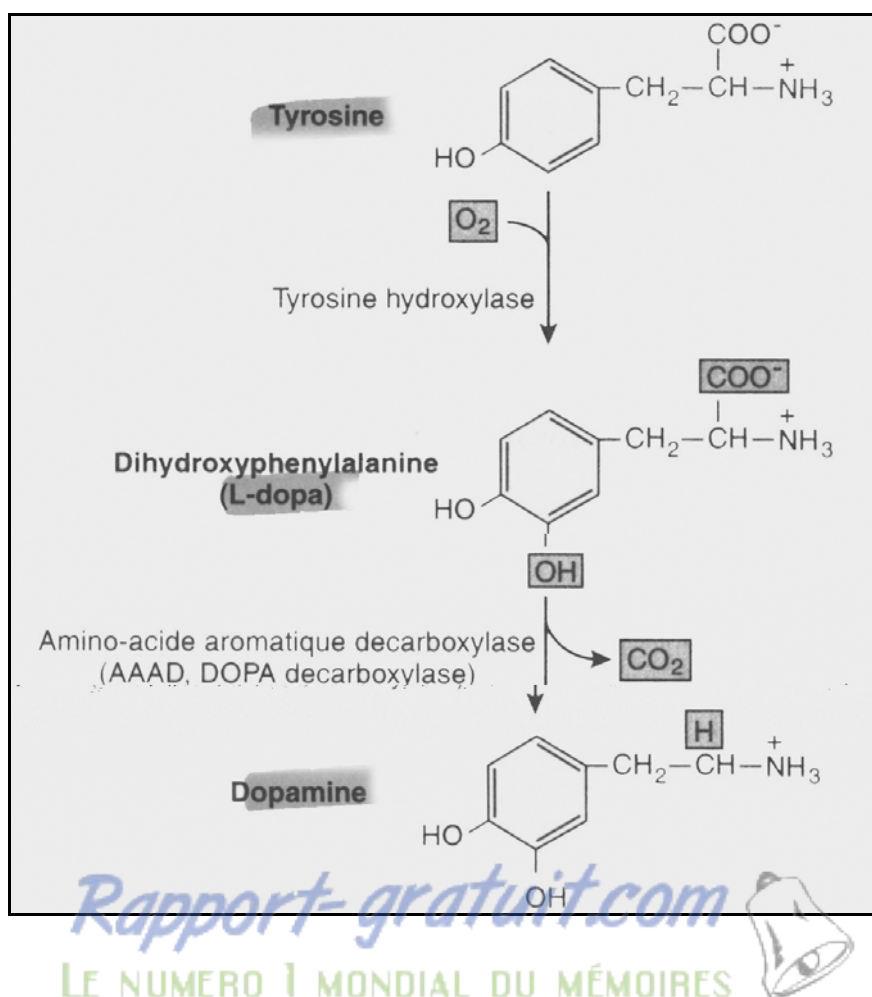
En routine, la lévopoda est administrée en association avec un inhibiteur de la dopadécarboxylase périphérique (Carbidopa), incapable de franchir la barrière hémato-encéphalique, pour éviter sa conversion systémique en dopamine. Ceci a le double avantage de prévenir les effets secondaires liés à la libération de dopamine dans l'ensemble de l'organisme et de réserver au système nerveux central l'action de la lévopoda ingérée (Figure 10).

La lévopoda est le médicament le plus efficace dans le traitement de MP. Son utilisation est associée à une morbidité et une mortalité décroissante et la plupart des patients qui prennent ce traitement présentent une amélioration clinique significative.

L'administration de la lévopoda commence généralement par des doses faibles. Ces doses sont ensuite graduellement augmentées. Ceci permet d'éviter des effets secondaires comme la nausée, les vomissements ou une hypotension posturale. Il est préférable d'administrer la plus faible des doses associées à une réponse clinique satisfaisante.

Les patients qui ne répondent pas à des doses élevées de lévopoda sont susceptibles de souffrir d'une autre forme de parkinsonisme que MP et ont peu de chance de répondre à des doses plus élevées de lévopoda ou à d'autres substances dopaminergiques.

Figure 10 Métabolisme de la dopamine
(D'après Pritchard et Alloway, 2002)



Les inhibiteurs de la COMT

La lévopoda est métabolisée périphériquement non seulement par la dopadécarboxylase mais aussi par une catéchol-o-méthyl transférase (COMT) (Martin et Wieler, 2003).

COMT est une enzyme ubiquitaire, très active. Ainsi, lorsque la lévopoda est administrée avec une décarboxylase périphérique, seulement 10% de la dose ingérée atteint le cerveau. Entacapone inhibe le métabolisme de la lévopoda par COMT, et augmente ainsi sa demi-vie plasmatique d'environ 50% et sa disponibilité au cerveau.

Les agonistes de la dopamine (DA)

Les agonistes de la dopamine sont des médicaments qui stimulent directement les récepteurs de la dopamine. Au Canada, la bromocriptine (Parlodel) et le pergolide (Permax) sont disponibles pour le traitement de MP depuis des années. Plus récemment, le ropinirole (Requip) et la pramipexole (Mirapex) sont devenus disponibles. Ces deux nouveaux médicaments diff  rent des deux précédents du fait que ce ne sont pas des dérivatifs d'ergot. De plus, ils sont relativement plus sélectifs dans la stimulation des récepteurs dopaminergiques D2 et D3. Cependant, le rôle joué par ces différents récepteurs lors des fonctions motrices normales est encore peu clair, bien qu'il soit établi depuis longtemps que les médicaments qui activent les récepteurs D2 ont des effets antiparkinsoniens.

Les agonistes de DA ont été utilisés initialement en association avec la lévopoda chez des patients qui commencent à présenter des complications motrices. L'administration d'agonistes de DA améliore les fonctions motrices et activités journalières des patients et permet une diminution du dosage en lévopoda. Il existe peu d'évidences cliniques du bénéfice de l'un des agonistes par rapport aux autres.

De plus en plus de données semblent montrer que l'utilisation d'agonistes de la DA dans la phase précoce de MP pourrait être une alternative efficace à l'utilisation de la lévopoda. D'autre part, l'utilisation d'agonistes de la DA en phase d'initialisation du traitement semble diminuer les complications motrices dues à l'utilisation de la DA

b. Traitement neuroprotecteur

Les thérapies neuroprotectrices sont définies comme des thérapies qui altèrent favorablement l'étiologie ou la pathogénie d'une maladie et ainsi retardent l'apparition des symptômes, ralentissent ou même stoppent la progression du processus dégénératif. Par opposition au traitement symptomatique, qui est conçu pour améliorer l'aspect clinique de la maladie, le but de la thérapie neuroprotectrice est de protéger les neurones qui sont sensibles au processus dégénératif. Dans l'idée que de tels traitements peuvent prévenir le processus dégénératif, ils doivent être mis en place

tôt dans le déroulement de la maladie. Plusieurs agents ont été mis en avant pour leurs effets neuroprotecteurs.

Il a été proposé un effet neuroprotecteur à la **sélégéline** à travers son effet sur la diminution de production de radicaux libres. Elle a été introduite dans l'essai clinique DATATOP (Deprenyl [nom déposé de la sélégéline] and Tocopherol Antioxidative Therapy of Parkinsonism ; Mytilineou et Cohen, 1985). Une analyse intermédiaire de cette étude a montré que la sélégéline réduisait de 50% le risque de développer un handicap nécessitant un traitement à la lévopoda.

L'effet neuroprotecteur des **agonistes de la DA**, dont le bénéfice symptomatique est bien établi, a longtemps été suggéré. Il est en cours d'investigation. Des études récentes utilisant de l'imagerie fonctionnelle ont montré que l'on observe une perte neuronale plus lente chez les patients traités par du pramipexole ou du ropinirole que chez les patients traités par la lévopoda (Parkinson Study Group, 2002 ; Whone *et al.* , 2002).

La Table 2 résume les différentes stratégies thérapeutiques disponibles pour la maladie de Parkinson.

Table 2 Différentes stratégies thérapeutiques pour la maladie de Parkinson (d'après Jankovic, 2002)

Amélioration de la transmission dopaminergique

- A. Augmentation de la synthèse de dopamine
 - 1. Stimuler la tyrosine hydroxylase (tétrahydrobioptérine, oxyferris-carbone)
 - 2. Précurseurs de la dopamine (tyrosine, lévodopa)
 - 3. Modifications de la pharmacocinétique de la dopamine
 - i. Modification du régime alimentaire (minimiser la prise d'acide aminés, administrer des antiacides)
 - ii. Bloquer la dopadécarboxylase périphérique (carbidopa, bensérazie)
 - iii. Libération lente de lévodopa (Sinemet, Madopar)
 - iv. Amélioration de l'administration des médicaments par injections (intraveineuses, intraduodénales, intraventriculaires)
 - v. Implants sous-cutanés et dans l'encéphale de polymères de lévodopa
- B. Amélioration de la libération de dopamine
 - 1. Méthylphénidate
 - 2. Dextroamphétamine
 - 3. Pémoline
 - 4. Amantadine
 - 5. Nicotine
 - 6. Thérapie électro-convulsive
- C. Blocage de la reprise de dopamine
 - 1. Tricycliques
 - 2. Bupropion
 - 3. Mazindol
 - 4. Benztropine
- D. Inhibition du catabolisme de la dopamine
 - 1. Inhibiteurs de la COMT
 - 2. Inhibiteurs de la MAO-B (déprényl, lazabémide)
- E. Administration d'agonistes de la dopamine
 - 1. Bromocriptine
 - 2. Pergolide
 - 3. Lisuride
 - 4. Apomorphine
 - 5. Pramipexole
 - 6. Ropinirole

7. Cabergoline

Manipulation des neurotransmetteurs non dopaminergiques

- A. Acétylcholine (anticholinergiques, tricycliques, amantadine)
- B. Norépinéphrine (L-Thréodihydroxyphénylsérine)
- C. 5-hydroxytryptamine
- D. GABA (progabide)
- E. Blocage des récepteurs glutamate
- F. Blocage de la libération de glutamate (riluzole)

Approche neurochirurgicale de la maladie de Parkinson

- A. Thalamotomie
- B. Pallidotomie
- C. Stimulation profonde du cerveau
 - 1. Thalamus
 - 2. Globus pallidus
 - 3. Noyau sub-thalamique
- A. Implantation (sous-cutanée, encéphale)
 - 1. Matrice de polymères de lévodopa
 - 2. Microsphères biodégradables contenant de la lévodopa
 - 3. Lignes cellulaires dopaminergiques encapsulées dans des polymères
- 4. Mésencéphale fœtal
- 5. Vecteurs génétiquement modifiés pour produire de la dopamine (fibroblaste, astrocyte, virus)

Ralentissement de la progression de la maladie par progression des neurones survivants

- A. Stratégie permettant l'économie de lévodopa
- B. Antioxydants
- C. Neutralisation des radicaux libres
- D. Chélateurs du fer
- E. Antagonistes du glutamate
- F. Facteurs trophiques

1.6.2. Traitement non pharmacologique (Krauss et Grossman, 2002)

a. Chirurgie

Depuis quelques années, la gestion neurochirurgicale de la maladie de Parkinson et autres troubles de la motricité est devenue une stratégie importante. Grâce aux méthodes actuelles, des bénéfices symptomatiques et fonctionnels sont obtenus à peu de risques sur des patients soigneusement sélectionnés. Les modèles actuels de l'organisation des noyaux gris de la base permettent une meilleure compréhension de la physiopathologie responsable des troubles du mouvement et une meilleure compréhension des effets de la chirurgie stéréotaxique.

Diverses procédures chirurgicales sont disponibles pour la maladie de Parkinson. Le but de la chirurgie stéréotaxique est de moduler l'activité du circuit des noyaux gris de la base.

Le principe de la chirurgie stéréotaxique repose sur l'acquisition de données au moyen de différents types d'imagerie et leur transfert dans un système de coordonnées cartésien. En chirurgie stéréotaxique fonctionnelle, ces coordonnées ont généralement pour référentiel le cadre stéréotaxique fixé sur la tête du patient. La chirurgie stéréotaxique fonctionnelle est réalisée sous anesthésie locale. La communication avec le patient et l'observation neurologique sont essentielles pour la confirmation neurophysiologique de la cible.

Pallidotomie

La pallidotomie unilatérale est l'une des procédures les plus communes pour les troubles du mouvement à travers le monde depuis sa réintroduction en 1992.

La différence de résultats d'un patient à l'autre dépend de la sélection initiale de ceux-ci, de leur médication et de la technique chirurgicale. L'effet le plus immédiat de la pallidotomie est l'amélioration nette voire l'abolition de la dyskinésie contralatérale. Le bénéfice sur la dyskinésie ipsilatérale est plus modéré.

La pallidotomie unilatérale diminue également la rigidité contralatérale de 25 à 60% et le tremblement de 30 à 70%. Elle améliore également le contrôle de la posture, amélioration habituellement observable 3 mois après l'opération.

La pallidotomie bilatérale est très rare, ses bénéfices sont limités et les risques de complications secondaires élevés.

Hypothalamotomie

Des indices nouveaux sur l'anatomie fonctionnelle des noyaux gris de la base ont conduit à l'introduction de nouvelles cibles comme l'hypothalamus, qui est aujourd'hui devenu la cible la plus fréquente dans le traitement de la maladie de Parkinson.

b. Thérapie physique et thérapie du langage (Martin et Wieler, 2003)

Bien que les traitements médicamenteux, et secondairement chirurgicaux, restent les principaux moyens de traitement de MP, il faut aussi envisager les aspects de la maladie que la médication ne prend pas en compte.

Le rôle de la **thérapie physique** est d'enseigner aux patients des stratégies pour apprendre à vivre avec leurs difficultés motrices par compensation et adaptation à leur handicap. Le but est de mettre en avant les symptômes susceptibles de changer pour minimiser les complications secondaires et enseigner des stratégies préventives quand ceci est indiqué. La thérapie physique doit être conçue et mise en place au cas par cas en fonction des besoins du patient et révisée à différentes phases de l'évolution de la maladie. La thérapie physique insiste sur les activités qui obligent à l'exécution de tâches motrices fonctionnelles comme marcher, tourner, passer de la position debout à assise,

assurer une mobilité relative en position couchée, prévenir les chutes, gérer la posture et manipuler des objets.

Le but de **la thérapie du langage** est de permettre au patient d'obtenir et de maintenir l'aptitude à communiquer. Dans MP, on observe souvent des troubles du langage et de la déglutition, dont la réponse à la médication est variable. Avec la progression de la maladie, les problèmes les plus courants sont une articulation imprécise et une diminution du contrôle de la respiration et des expressions faciales. Il existe de nombreux types de thérapies du langage. Suivies 1 à 2 fois par semaine par le patient, la thérapie semble avoir des effets immédiats. L'effet général sur le long terme est encore à vérifier. Comme pour toutes les autres thérapies de réhabilitation, la thérapie du langage nécessite de plus nombreuses et plus larges études pour illustrer son rôle dans la gestion de la maladie de Parkinson.

1.6.3. *Innovation thérapeutique (Storch et Schwarz, 2002)*

a. Cellules souches neuronales et MP

La découverte que des cellules souches embryonnaires et des cellules souches neuronales ont la faculté de se différencier en neurones et cellules gliales *in vitro* et *in vivo* a ouvert un nouveau champ d'investigation scientifique. La recherche actuelle pourrait rapidement avoir un impact majeur sur le diagnostic et le traitement d'une grande variété de troubles neuropsychiatriques. L'un des buts premiers de la recherche actuelle est de développer des sources de tissus pour restaurer la population neuronale chez les patients atteints de MP.

Diverses méthodes décrivent la production de neurones et plus spécifiquement de neurones dopaminergiques à partir de cellules souches embryonnaires avec des lignées murines. Cependant, la production de neurones dopaminergiques à partir de cellules souches embryonnaires n'a pas encore été décrite. De plus, les cellules souches embryonnaires murines ont un potentiel tératogène élevé une fois implantées dans le tissu hôte. Enfin, il existe de nombreux problèmes éthiques quant à l'utilisation de cellules souches embryonnaires humaines.

Les cellules souches neuronales (CSN) présentent une alternative intéressante. Elles sont capables de produire tous les types majeurs de cellules nerveuses et leur utilisation ne soulève pas de problèmes éthiques.

Les CSN peuvent être prélevées directement dans un tissu nerveux fœtal ou adulte par dissection et digestion de la région d'intérêt du cerveau. Divers sérums contenant un mitogène adéquate permettent la prolifération et différenciation de ces cellules. Il est encore difficile de comprendre quels mitogènes influencent la différenciation et comment ils le font.

La production de neurones dopaminergiques serait particulièrement intéressante pour MP.

Jusqu'alors seulement deux groupes ont décrit la production de neurones dopaminergiques humains à partir de cellules souches prélevées dans le tronc cérébral embryonnaire (Gritti *et al.* , 1996 et Johe *et al.* , 1996).

MP semble une cible idéale pour la transplantation de cellules souches nerveuses dans le système nerveux étant donné qu'un faible nombre de neurones doit être remplacé dans une zone cible spécifique.

De nombreuses études ont montré que l'implantation de précurseurs de neurones dopaminergiques de rongeurs est accompagnée d'un rétablissement histologique, biochimique et fonctionnel dans les modèles animaux. Des CSN dérivées de tronc cérébral embryonnaire humain ont aussi été transplantées dans des cerveaux de rats lésés et ont restauré le niveau dopaminergique.

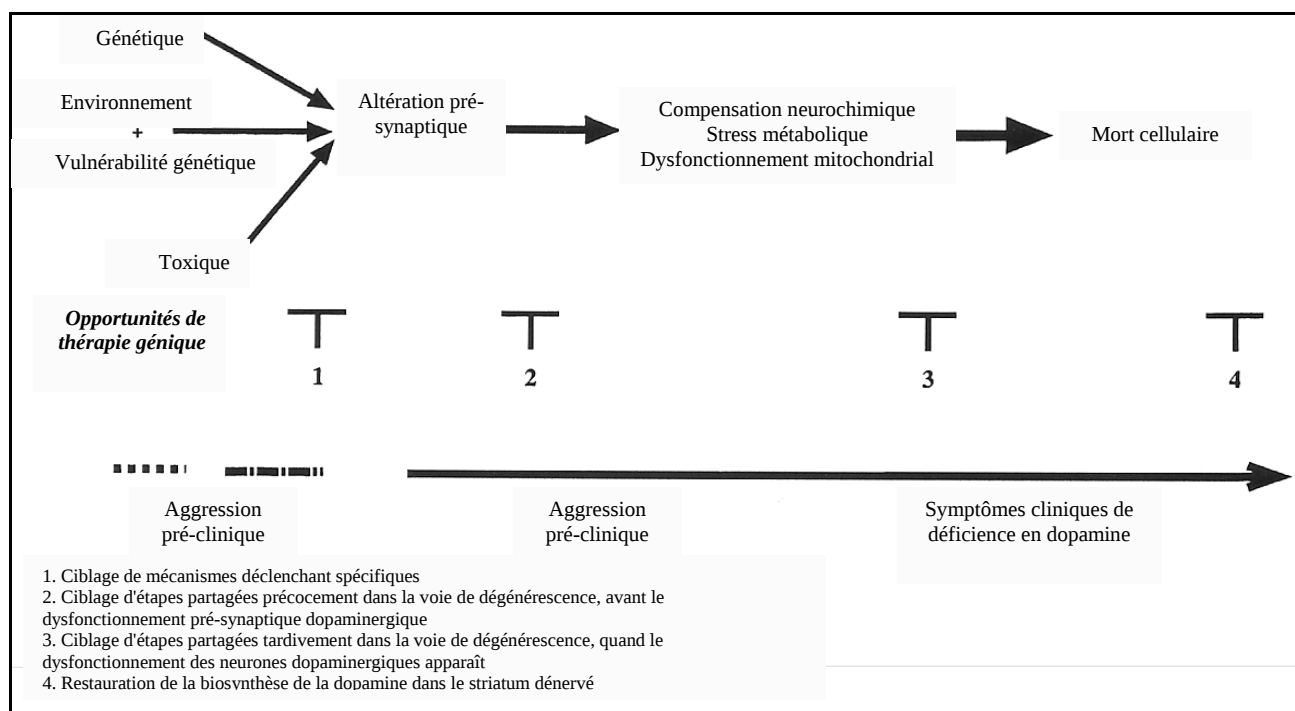
Bien que l'on puisse envisager le traitement des troubles neurologiques majeurs comme MP, il reste néanmoins des questions à se poser : Est-il possible de générer de larges quantités de cellules capables de se différencier en neurones humains spécifiques ? Quelle va être la réponse immunitaire suite à leur implantation intracérébrale ?

b. Thérapie génique

Etant donné que des facteurs environnementaux comme les pesticides, herbicides et produits chimiques ont été identifiés comme facteurs de risque potentiels dans MP et que des mutations génétiques ont aussi été identifiées, il est possible que ces facteurs déclenchants, seuls ou associés, produisent des symptômes similaires à ceux de MP. La Figure 11 propose une voie commune pour MP et suggère différentes cibles pour la thérapie génique sans nécessairement empêcher le mécanisme initial (Bowers *et al.* , 2001).

Dans cette voie commune qui aboutit à la mort cellulaire, la thérapie génique peut intervenir à 4 niveaux : (1) ciblage de mécanismes déclenchants spécifiques, (2) ciblage d'étapes partagées précocement dans la voie de dégénérescence, avant le dysfonctionnement pré-synaptique dopaminergique (3) ciblage d'étapes partagées tardivement dans la voie de dégénérescence, quand le dysfonctionnement des neurones dopaminergiques apparaît et (4) restauration de la biosynthèse de la dopamine dans le striatum dénervé.

Figure 11 Schéma décrivant un modèle de voies communes à la maladie de Parkinson (D'après Bowers et al. , 2001)



La sélection des transgènes est la première étape dans la mise au point d'une stratégie de thérapie génique. La thérapie génique pour MP peut être divisée en deux grandes cibles : des stratégies qui permettent d'augmenter la concentration en neurotransmetteurs ou des stratégies neuroprotectrices.

La première stratégie est similaire aux traitements pharmacologiques actuels, tels que l'administration de lévodopa, dont le but est de rétablir le niveau de DA dans le striatum. De nombreuses études ont montré qu'il est possible de délivrer des enzymes biosynthétisées impliquées dans la production de DA pour élever le niveau dopaminergique striatal. Tout comme le traitement pharmacologique, cette stratégie de thérapie génique ne permet pas de ralentir la perte de neurones de la substance noire.

Les tentatives d'augmentation du niveau dopaminergique sont également possibles par manipulation des récepteurs dopaminergiques, des systèmes de transport et des enzymes métabolisantes. Récemment, il a été montré que DAT, le transporteur de la DA qui permet la recapture de DA dans les terminaisons nerveuses présynaptiques, se lie directement à l' α -synucléine et accélère le recyclage et l'apoptose induite par DA. Une approche de thérapie génique qui permettrait de réguler les niveaux de DAT et/ou de l' α -synucléine, pourrait être bénéfique à la fois pour le traitement et pour la compréhension de MP. Finalement, la régulation neurochimique peut être réalisée par altération du métabolisme de DA. La monoamine oxydase B (MAO-B) est un candidat potentiel dans les transgènes cibles car elle produit des radicaux libres à travers son métabolisme oxydatif de DA, ce qui résulte en l'altération mitochondriale.

La seconde grande stratégie est une approche de thérapie génique neuroprotectrice. Des analyses génomiques de profil d'expression des gènes pourraient conduire à l'identification d'empreintes génétiques clefs dans MP et faciliteraient le diagnostic précoce de MP.

Des gènes codant pour des facteurs neurotrophiques ont été les plus largement utilisés dans des stratégies neuroprotectrices de thérapie génique. Les facteurs neurotrophiques sont des protéines solubles permettant la survie, la croissance et la différenciation cellulaire.

L'augmentation de la formation de radicaux libres est l'un des postulats pour expliquer la pathogénie de MP. Utiliser des transgènes qui pourraient empêcher la formation de radicaux libres ou permettre leur élimination, pourraient atténuer la neurodégénérescence.

Les produits génétiques exprimés dans la SNc capables de réduire ou éliminer les radicaux libres directement ou indirectement comme la superoxyde dismutase (SOD), les catalases, la glutathion réductase (GR), la glutathion peroxidase (GPO), peuvent prendre part à la neuroprotection.

Après la sélection de gènes potentiellement efficaces dans la thérapie de MP, il faut sélectionner le vecteur le plus approprié. Il faut prendre en compte la capacité du vecteur, sa spécificité, sa maintenance génomique, la durée et le niveau d'expression du transgène par le vecteur, et le profil du vecteur vis à vis de sa sécurité d'utilisation. Une fois qu'un vecteur adéquat a été sélectionné pour MP, il faut établir un moyen d'administration du vecteur efficace et sans danger pour permettre un effet thérapeutique optimal. Depuis les améliorations récentes des procédures de chirurgie stéréotaxique, on peut obtenir des livraisons du vecteur dans des régions précises du cerveau.

Avec une technologie de transfert de gènes et une compréhension des mécanismes pathogéniques de MP en constante progression, la mise au point de thérapies nouvelles, efficaces et sans danger devrait avoir lieu dans un futur proche.

II. Etude à grande échelle du transcriptome des cellules atteintes

Il semble aujourd'hui évident que la maladie de Parkinson a une origine génétique. Cependant, il existe encore très peu de données sur ce que sont ces facteurs génétiques potentiels et quelles sont leurs influences sur le développement de la maladie de Parkinson.

Dans le but d'enrichir nos connaissances sur l'aspect génétique de cette maladie, le groupe du Pr Graeber, laboratoire de neuropathologie de Charing Cross Hospital, Imperial College, London travaille sur le projet intitulé : « Profil génétique de cerveaux d'individus parkinsoniens par microarrays ».

II.1. Objectifs du projet de recherche

Il s'agit d'établir un profil détaillé de l'expression génétique de la substance noire et autres régions atteintes dans le cerveau d'individus parkinsoniens, ceci afin :

- d'identifier des gènes connus et impliqués dans les voies de mort cellulaires (comme celles du stress oxydatif).
- d'identifier de nouvelles voies moléculaires impliquées dans des mécanismes de neurodégénérescence.
- d'intégrer les caractéristiques histologiques et cliniques de la maladie de Parkinson aux données obtenues sur les gènes et voies moléculaires à travers le profil d'expression génétique.

L'analyse de tous les gènes exprimés dans la substance noire d'individus parkinsoniens est réalisée au moyen de microarrays et les différents niveaux d'expression de chacun de ces gènes sont comparés aux niveaux d'expression de ces mêmes gènes dans des cerveaux contrôles d'individus sains permettant ainsi l'identification de modifications pathologiques de voies de régulation et de voies neuroprotectrices. Cette comparaison permettra d'identifier des gènes aux rôles critiques qui sont sous- ou sur-exprimés et associés à la mort des cellules de la substance noire. Cela devrait permettre de disséquer successivement les composants moléculaires du programme de mort neuronale actifs dans MP et les mécanismes d'adaptation potentiellement protecteurs et compensatoires mis en place.

Les premières analyses de données vont se concentrer sur l'expression de gènes antioxydants, pro-oxydants ou liés à des voies de neurorégulation ainsi qu'à des gènes connus pour être impliqués dans des voies de mort cellulaire neuronale.

II.2. Mise en œuvre expérimentale et protocole

Tissus

Les cerveaux disponibles et utilisés pour cette étude sont fournis par la PDS (Parkinson Disease Society) Tissue Bank, unité de Charing Cross Hospital. Cette unité organise la collecte nationale de cerveaux frais d'individus parkinsoniens s'étant déclarés donneurs avant leur décès.

Initialement, l'étude du profil génétique est réalisée sur 7 cerveaux parkinsoniens et 4 cerveaux contrôles.

Chaque cerveau est analysé par la PDS Tissue Bank pour une vérification neuropathologique de la maladie de Parkinson et une gradation de la sévérité de la maladie. Ceci est réalisé grâce à des analyses histologiques de routine et des analyses immunohistochimiques (α -synucléine).

Le profil d'expression génétique de chaque cerveau, contrôle et atteint, est réalisé sur les régions suivantes :

- substance noire médiale et latérale,
- putamen, noyau rouge et cortex frontal.

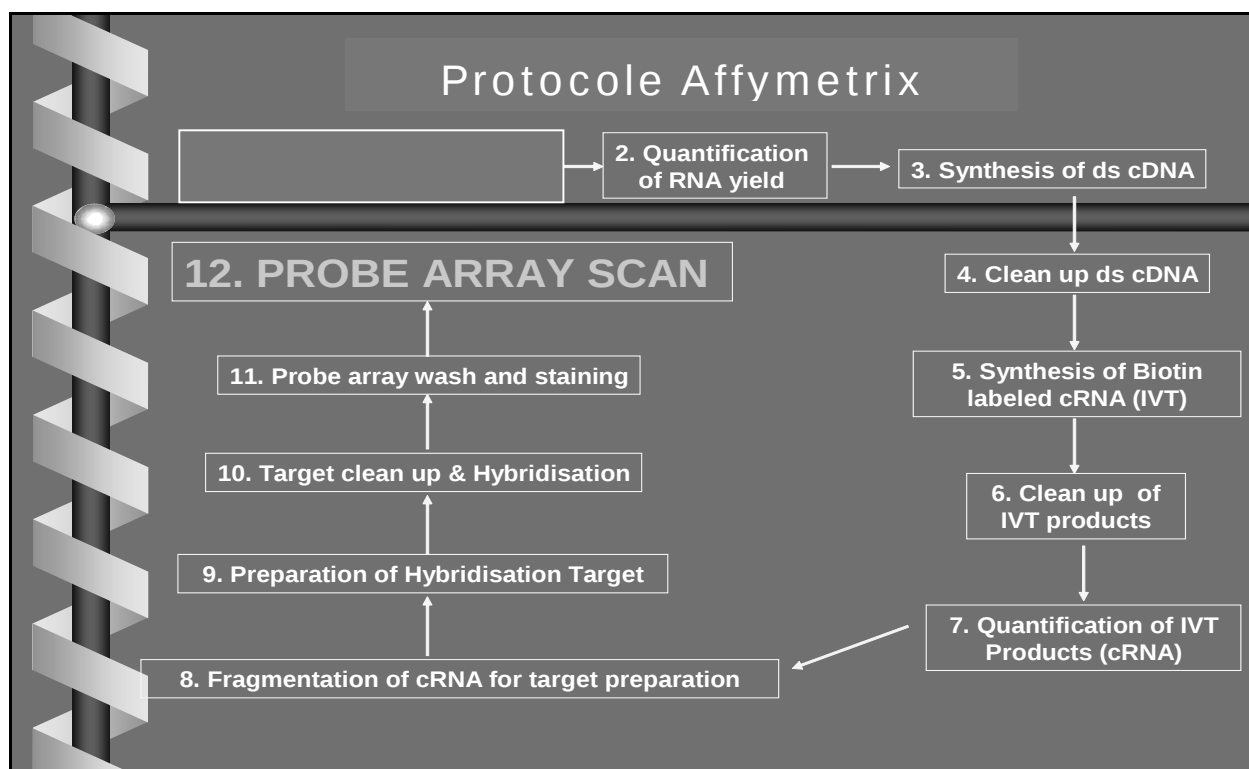
Micorarrays

Il s'agit de déterminer la composition quantitative et qualitative en ARN messagers de la substance noire et autres régions du cerveau. Les régions d'intérêt sont isolées du reste du cerveau puis disséquées par microdissection laser (laser UV).

Les microarrays utilisées sont The Human Genome U95 Set du laboratoire Affymetrix (<http://www.affymetrix.com>). U95 est composé de 2 puces microarrays. Les deux puces contiennent à elles deux plus de 33000 gènes ce qui couvre la plus vaste quantité de transcrits du génome humain connus aujourd'hui.

Les ADNc, obtenus à partir des ARN extraits et isolés des tissus d'intérêt, sont hybridés aux séquences (connues) des puces. La Figure 12 présente le protocole Affymetrix.

Figure 12 Protocole Affymetrix



Les données générées par ces microarrays sont alors traitées et analysées grâce au logiciel GeneSpring (<http://www.sigenetics.com>). Jusqu'alors 919 voies ont été définies. Il s'agit ensuite d'interpréter ce profil génétique au vu des connaissances actuelles. Cependant la quantité de données générées par les méthodes de microarrays est sans précédent et il est donc nécessaire d'adopter de nouvelles approches d'analyses des résultats pour déterminer le profil d'expression des gènes impliqués dans MP.

De même, plus tard, il faut mettre au point des techniques d'analyse innovantes pour lier le niveau d'expression du gène aux caractéristiques cliniques et morphologiques de la maladie. C'est l'établissement de ces méthodes d'analyse qui rend le travail lent et fastidieux.

II.3. Résultats

Ce projet est encore à l'état de mise au point. Aujourd'hui, les résultats sont classés de deux manières différentes pour permettre leur lecture et analyse :

- Analyse de voies métaboliques : grâce à GeneSpring, les gènes sont classés en fonction de la voie métabolique à laquelle ils appartiennent.
- Analyse chromosomique : les résultats sont présentés par chromosome sur lequel figure le niveau d'expression de chaque gène analysé.

A l'heure de la rédaction, aucun résultat n'a encore été publié.

II.4. Confirmation des résultats et analyses complémentaires

Pour confirmer les résultats des microarrays et intégrer ces données dans un ensemble clinico-pathologique, plusieurs autres analyses complémentaires sont effectuées.

Cartographie cellulaire

Une fois qu'un gène d'intérêt a été identifié dans la substance noire par les analyses de microarrays, les méthodes de RT-PCR et hybridation *in situ* seront employées sur des types cellulaires candidats dans le profil d'expression génétique pour confirmer les résultats de microarrays. Les étapes d'analyses de microarrays, de RT-PCR et d'hybridation *in situ* (HIS) se concentreront sur des modèles d'expression cellulaire de gènes de voies antioxydantes et pro-oxydantes déjà établis.

Nous mentionnerons la méthode RT-PCR utilisée plus tard dans cet exposé.

La mise au point de la méthode HIS fait l'objet de la seconde partie de cet exposé et consiste à l'établissement d'une méthode permettant la localisation cellulaire des messagers d'intérêt. En premier lieu, il s'agit de choisir et définir une méthode exacte, précise et reproductible.

Topographie et analyse neuro-anatomique comparée

Cette étape a pour but la comparaison neuro-anatomique des différentes régions anatomiques de la substance noire et de comparer leur degré d'implication dans MP grâce à la stéréologie.

Corrélations clinico - pathologiques.

Pour intégrer les résultats des microarrays aux données cliniques et pathologiques, chaque donneur se verra attribué une note en fonction de :

- La sévérité de la maladie
- L'âge à l'apparition des symptômes
- Les symptômes présentés
- Toutes autres observations cliniques et pathologiques.

L'étude à grande échelle du transcriptome des cellules atteintes représente un travail long et fastidieux. Par conséquent, la production de résultats clairs et cohérents demande plusieurs mois voire plusieurs années. Le projet du groupe de neuropathologie reste encore au stade de mise au point et d'analyses des résultats.

En outre, la mise au point d'une méthode d'HIS est une étape cruciale pour la validation des résultats de même qu'une meilleure compréhension des mécanismes pathogéniques.

Avec la production des premiers résultats, nous aurons d'emblée une meilleure connaissance et compréhension de l'implication des facteurs génétiques de la maladie de Parkinson, ce qui conduira

à une meilleure compréhension globale de la maladie et fournira alors des nouvelles informations pour l'amélioration des stratégies thérapeutiques.

Seconde partie
ETUDE PERSONNELLE

Chapitre premier

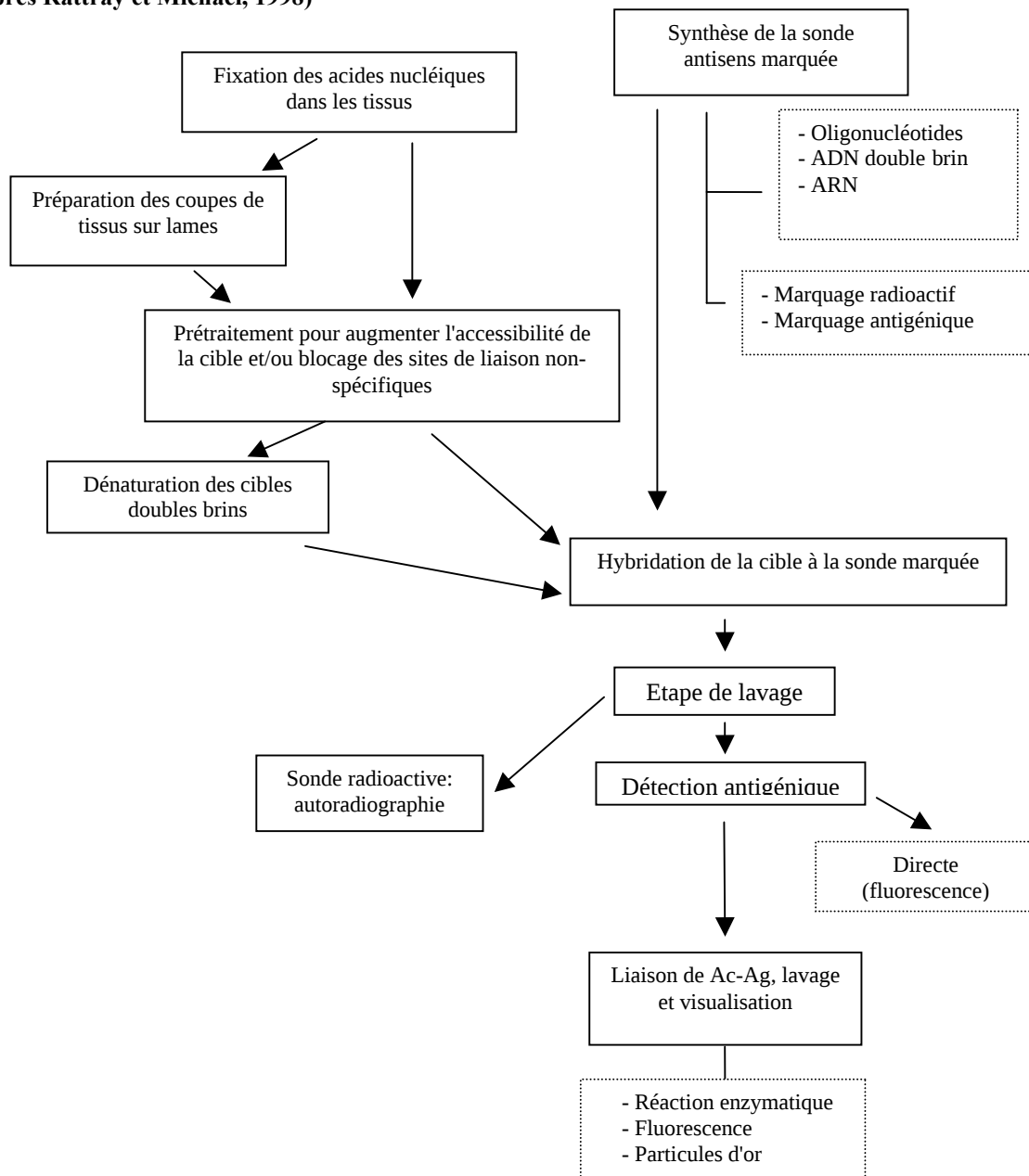
INTRODUCTION

Ce chapitre a pour but de présenter les méthodes utilisées ainsi que les différents outils disponibles pour l'expérimentateur et de justifier les choix de la partie « Matériels et Méthodes ».

I. Principe de l'Hybridation *In Situ* (HIS)

L'HIS, dont les grandes étapes sont présentées dans la figure 5, est la technique utilisée pour localiser des séquences d'acides nucléiques cibles sur cellules entières, coupes de tissus ou préparations chromosomiques. Le principe de la technique est intrinsèquement simple : il s'agit d'utiliser des sondes d'acides nucléiques de séquences connues et marquées, capables de s'apparier dans des conditions spécifiques à des séquences cibles d'ADN ou ARN complémentaires pour former une molécule hybride (Terenghi et Fallon, 1990). L'HIS se révèle donc être un outil essentiel en biologie cellulaire, en génétique et en pathologie pour la détection et la localisation de séquences d'acides nucléiques spécifiques (Speel, 1999). Cette possibilité de visualiser directement la répartition spatiale de séquences spécifiques fournit des informations cruciales pour comprendre l'organisation et la fonction des gènes (Rattray et Michael 1998 ; Figure 13).

Figure 13 Principe d'hybridation *in situ*
(D'après Rattray et Michael, 1998)



Depuis l'introduction de l'HIS en 1969 par Gall et Pardue, les conditions optimales d'hybridation ont été largement étudiées et sont maintenant bien décrites. Cependant, cette méthode en constante évolution nécessite une grande rigueur technique et sa sensibilité dépend de nombreuses variables (Hofler *et al.* , 1990) :

- Méthode de préparation histologique pour optimiser la rétention de la cible, ADN ou ARN, dans le tissu et l'accès à la cible.
- Conception de la sonde (type de sonde et type de marquage) et méthode de détection des hybrides.
- Conditions d'hybridation et ses effets sur la formation des hybrides.

La conception de la sonde est un critère essentiel pour la réussite de l'expérience. On doit tenir compte de multiples paramètres tels que par exemple, la nature de la cible, sa localisation, son abondance, les tissus disponibles, le coût et la rapidité d'exécution envisagés et souhaités pour l'expérience. Aussi, au moment de l'interprétation des résultats, si ceux-ci ne sont pas satisfaisants, il est préférable d'exclure tout doute possible quant à l'efficacité de la sonde. C'est le paramètre qui doit être le plus fiable possible et remis en question en dernier dans la discussion des résultats. Ainsi, dans le paragraphe suivant, nous allons étudier les différents types de sondes et de marquages à la disposition du scientifique aujourd'hui et justifier la motivation de notre choix pour un type de sonde.

II. Le choix de la sonde

II.1. Les différents types de sondes disponibles

Une sonde est un acide nucléique marqué (ADN ou ARN) dont la séquence nucléotidique est complémentaire de l'acide nucléique cible.

Le principe d'hybridation repose sur le fait que la séquence nucléotidique de la sonde doit être antiparallèle à celle de la cible : la cible est orientée 3'=>5', la sonde est orientée 5'=>3'.

La structure de la sonde peut être de 3 types : ADN double brin, oligonucléotides et ARN (Morel et Cavalier, 2001).

II.1.1. *Sondes ADN double brin*

Ces sondes sont des fragments double brin d'ADN génomique correspondant à des séquences spécifiques déjà clonées ou complémentaires d'ARN. Dans ce cas, il s'agit alors le plus souvent d'obtenir l'ADN complémentaire de la séquence d'un ARN messager (on les appelle donc ADN complémentaire ou ADNc). Cette séquence est publiée dans la littérature ou dans une banque de données.

Pour la construction de ces sondes, la séquence d'ADN est clonée dans un plasmide bactérien ou dans un bactériophage vecteur. Ceci permet un approvisionnement constant en sondes. Après avoir été clonées, les sondes sont simplement préparées et marquées selon des protocoles définis ou selon les instructions de kits disponibles commercialement.

Avantages	– Sondes très stables (ADN) – Protocoles de marquage bien établis
Désavantages	– Nécessité d'amplifier la sonde et donc d'avoir le matériel nécessaire – Nécessité de dénaturer avant hybridation

II.1.2. *Oligonucléotides (ADN synthétique)*

Ces sondes sont de courtes séquences d'ADN synthétique simple brin complémentaires de celles de l'acide nucléique cible. Les séquences utilisées sont publiées dans la littérature ou dans les banques de données. Elles sont disponibles commercialement.

Les critères de sa conception sont :

- une séquence complémentaire de celle de l'acide nucléique cible (l'ADNc publié correspond souvent à l'ARNm converti en ADNc, la sonde doit être complémentaire et anti-sens de cet ADNc).

- une séquence comprenant une région codante (particulièrement important si la cible est un ARNm).
- une séquence comprenant entre 20 et 50 nucléotides.
- une proportion de G+C entre 50 et 55%.
- l'absence de séquences palindromiques.

La **sonde antisens** est la séquence complémentaire antiparallèle à celle de l'ADNc.

La **sonde sens** est une sonde de même séquence et complémentaire, c'est-à-dire parallèle à la séquence d'ADNc. Elle permet ainsi un contrôle négatif.

Avantages	– Détermination très précise d'une séquence spécifique – Sondes très stables (ADN) – Disponibles en grande quantité et rapidement – Protocoles de marquage bien établis – Synthèse de sondes marquées, de sondes sens – Pénétration facilitée des tissus grâce à leur longueur réduite
Désavantages	– Difficulté de déterminer les conditions d'HIS – Marquage en 3', efficacité du marquage souvent limité dans le cas de nucléotides antigéniques

II.1.3. ARN

Ces sondes sont des simples brins d'ARN (ribosondes) résultant de la transcription *in vitro* d'un morceau d'ADNc cloné dans un plasmide bactérien. Cet ADN, double ou simple brin, doit être situé dans un plasmide contenant des sites de liaison pour l'ARN polymérase (promoteurs) adjacents, permettant ainsi la transcription de l'ADN en ARN.

L'hybridation avec ces ribosondes résulte en des hybrides RNA-DNA ou RNA-RNA. La température de fusion de ces hybrides est plus élevée que pour les hybrides DNA-DNA. Ceci signifie que l'on peut utiliser des températures d'hybridation et de lavages plus élevées et ainsi empêcher efficacement les liaisons non spécifiques.

Avantages	– Synthèse totale de la sonde – Marquage pendant la synthèse – Activité très spécifique – Sondes très stables – Longueur des sondes plus réduite que les sondes à ADN – Sondes sens disponibles – Dénaturation non nécessaire avant utilisation
Désavantages	– Préparation difficile (les ARN polymérases sont des enzymes très labiles et doivent être manipulées avec une extrême précaution) – Difficulté de stockage (sondes très instables)

Ainsi, de longues sondes simples brins (ARN) seront recommandées pour leur grande sensibilité dans la détection de cibles simples brins. Cependant, les oligonucléotides seront suffisamment sensibles dans de nombreux cas. Leur sensibilité peut même être accrue par l'utilisation d'un cocktail de sondes dirigées contre des régions différentes de la cible. De plus, elles ne nécessitent pas la connaissance de techniques de clonage moléculaire.

II.2. Les différents types de marquages

Les marqueurs des sondes sont des nucléotides triphosphates soit:

- portant un isotope radioactif (sondes chaudes)
- modifiées par une molécule antigénique (sondes froides).

Le choix du marquage détermine la méthode de détection :

- par autoradiographie dans le cas des sondes radioactives
- par immunocytochimie si la sonde a des propriétés antigéniques, par détection directe ou indirecte.

II.2.1. Marquage radioactif

La sonde radioactive idéale pour l'HIS devrait avoir une spécificité élevée tout en ayant une quantité d'énergie émise faible. La détection d'un tel marqueur serait sensible et rapide avec une résolution élevée. En réalité, une sonde rassemblant tous ces critères n'existe pas. Cependant, il y a à la disposition du scientifique une sélection d'isotopes qui les rassemblent à eux tous.

On utilise des isotopes radioactifs qui émettent des rayons β^- . Les plus communément utilisés sont ^{35}S , ^{33}P , ^{32}P , et ^3H . Chacun d'entre eux a ses avantages et ses inconvénients concernant la demi-vie, résolution, émission d'énergie, sensibilité et efficacité de l'autoradiographie. Leur position dans la structure nucléotidique dépend du type d'isotope choisi et de la technique utilisée pour leur incorporation.

Avantages	– Sensibilité plus élevée qu’avec les marqueurs antigéniques – Contrôle du procédé de marquage – Estimation quantitative du signal
Désavantages	– Mauvaise résolution – Temps d’exposition long (d’un jour à plusieurs mois) – Quantification seulement estimée – Précaution de manipulation nécessaire liée à l’utilisation d’isotopes – Coût élevé des manipulations dû au fréquent renouvellement des isotopes

II.2.2. *Marquage antigénique*

Les marqueurs utilisés sont des molécules antigéniques (haptènes) couplées chimiquement à des nucléotides triphosphates. Le radical libre du nucléotide est substitué par un haptène attaché au bout d’une chaîne carbonée de longueur variable.

Les marqueurs les plus souvent utilisés sont la biotine, la digoxigénine et la fluorescéine.

La détection des hybrides peut se faire par visualisation directe ou indirecte.

a. Visualisation directe :

Bien que rarement utilisée en détection directe pour la localisation d’ARNm, la fluorescéine, grâce à ces propriétés fluorescentes (émission de photons), permet d’être visualisée directement, et donc l’hybride auquel elle est liée, au moyen d’un microscope à fluorescence.

Cette méthode est plus couramment utilisée pour l’HIS chromosomique.

b. Visualisation indirecte

Elle se fait le plus souvent par utilisation d’une immunoglobuline G (IgG) dirigée contre l’haptène, c’est-à-dire une IgG anti-biotine, anti-digoxigénine ou anti-fluorescéine.

L’immunoglobuline G est elle-même liée à une enzyme phosphatase alcaline (PA) ou peroxydase de raifort (PR) dont la réaction avec le substrat adéquat, en phase de détection, va donner un précipité coloré insoluble. La localisation de ce précipité correspond alors à celle de l’hybride d’intérêt.

Pour la biotine, on peut également utiliser l’avidine ou la streptavidine, deux molécules à forte affinité pour la biotine (liaison par liaisons non covalentes).

La sensibilité de chacun de ces systèmes va dépendre du nombre de fluorochromes ou d’enzymes incorporé dans la phase de détection immunocytochimique.

Avantages	– Tous les désavantages de l'autoradiographie sont évités – Meilleure résolution qu'avec les sondes radioactives (à l'échelle de la cellule) – Nombre considérable de marqueurs différents et nombreux systèmes de détection. – Sondes très stables
Désavantages	– Sensibilité moins importante – Variabilité dans l'efficacité d'incorporation des nucléotides marqués – Contrôle difficile du marquage des sondes – Quantification difficile

Le choix de la méthode de marquage des sondes dépend des exigences expérimentales en matière de sensibilité et de résolution. Ainsi, il faudra choisir une sonde ^{35}S pour la détection de transcrits peu abondants, mais il sera préférable d'utiliser une sonde marquée par un haptène si l'expérimentateur souhaite une résolution à l'échelle cellulaire ou s'il considère des raisons pratiques et de sécurité.

II.3. Considérations techniques pour la conception de la sonde

L'HIS est considérée comme une méthode sensible. Les limites de détection sont estimées comme comprises entre 5 à 50 molécules d'ARNm. Des paramètres de base, qui peuvent affecter la cinétique d'hybridation et/ou les appariements non spécifiques entre séquences, sont à prendre en compte lors de la conception d'une sonde 100% homologue à la séquence cible. Ils sont les suivants (Leitch *et al.* , 1994) :

- La proportion de la sonde en guanine et cytosine (%GC)

Les paires GC sont plus stables que les paires A-T/U. En effet, les bases G et C sont liées par 3 liaisons hydrogène quand les bases A et T/U ne sont liées que par deux. Pour cette raison, une sonde avec un contenu élevé en bases G et C est plus stable qu'une sonde dans laquelle les bases A et T prédominent et il faudra plus d'énergie pour séparer les deux brins de l'hybride. Il existe une relation linéaire entre la stabilité des hybrides d'acides nucléiques et le ratio AT:GC.

Ainsi, au moment de la conception de la sonde, on essaiera autant que possible de trouver un compromis respectant un pourcentage optimal de GC. Par exemple, dans le cas des oligonucléotides, un contenu en GC aux alentours de 50% permet à la sonde de former des hybrides solides tout en gardant le niveau d'appariements non spécifiques minimum.

- La longueur de la sonde et donc de l'hybride

Considérer la longueur de la sonde est un élément important. En général, les sondes longues permettent l'obtention d'hybrides plus stables et spécifiques. En effet, dans le cas d'un hybride

long, les deux brins sont maintenus ensemble par plus de liaisons hydrogène et en conséquence plus d'énergie est nécessaire pour dénaturer les deux brins.

Cependant, plus la sonde est longue plus le risque d'avoir des appariements non spécifiques augmente.

En conséquence, il faut trouver un compromis entre ces deux facteurs. Ainsi dans le cas des oligonucléotides par exemple, il semble que le compromis soit dans l'utilisation de sondes de longueurs comprises entre 20 et 60 pb.

II.4. Choix raisonné du type de sonde et du type de marquage optimaux

II.4.1. *Type de sonde*

Le choix de la sonde peut être motivé par plusieurs raisons mais dépend principalement de l'acide nucléique cible et du nombre estimé de copies de sa séquence dans le tissu d'intérêt.

La Table 3 présente différents critères pour le choix de la sonde.

Table 3 Critères de choix pour déterminer le type de sondes à utiliser (d'après Morel et Cavalier, 2001)

Critères de choix	Sondes		
	ADN double brin	Oligonucléotide	ARN
Disponibilité	++	+++	+
Conservation	+++	+++	+
Stabilité	+++	+++	+
Activité spécifique	++	+	+++
Manipulation	+++	+++	+
Efficacité	+	++	+++
Contrôles	+	++	+++

Dans notre cas particulier, il s'agit de mettre au point une méthode universelle, systématique, fiable et reproductible. L'HIS est supposée nous permettre de détecter des messagers d'intérêt mis en évidence par microarrays, c'est à dire qu'elle doit nous permettre de localiser l'ARNm d'un gène sur-exprimé ou sous-exprimé dans différentes parties de cerveaux parkinsoniens, essentiellement dans la substance noire. Etant donné que cette étude doit porter sur un vaste nombre de gènes, l'HIS va devoir s'appliquer successivement à plusieurs séquences d'ARN cibles différents, et donc faire appel à plusieurs sondes de séquences différentes.

Il faut donc une méthode simple, rapide et efficace pour obtenir ces sondes. Nous ne souhaitons donc pas avoir recours à des sondes de type ARN car elles nécessitent un investissement coûteux et des connaissances en biologie moléculaire et méthodes de clonage que les membres de l'équipe ne possèdent pas.

Les sondes oligonucléotides répondent donc à nos critères :

- Les oligonucléotides synthétiques sont facilement disponibles.
- N'importe quel ARNm pour lequel le gène a été séquencé peut être sondé, sans avoir recours à des procédures complexes de biologie moléculaire.
- Ces sondes étant de courte longueur, cela signifie que pour des conditions d'hybridation et de lavage de haute stringence, nous pourrions utiliser des températures relativement basses ce qui affecte moins la qualité des coupes de tissus.
- Des contrôles sont facilement réalisables (brin sens, poly dT).
- La petite taille de ces sondes permet une meilleure pénétration des sondes dans les tissus et évite ainsi le recours à des traitements (protéinase K) qui affectent la qualité histologique des coupes.

Il faut cependant souligner et retenir le fait que le principal désavantage de ces sondes est une relative perte de sensibilité par rapport aux sondes ARN.

II.4.2. *Type de marquage*

La méthode d'HIS que nous souhaitons établir est une méthode de réalisation simple, rapide et dans des conditions de sécurité optimales. Pour ces raisons, nous souhaitons éviter le marquage par des isotopes et portons notre choix sur des marquages antigéniques. Nous disposons de sondes marquées par la fluorescéine (FITC) et par la digoxin (DIG), molécule de structure proche de la digoxigénine.

Cette thèse faisant l'objet de la mise au point d'une méthode d'HIS de routine, nous allons voir les différentes étapes de cette technique, dont l'intérêt sera discuté.

III. Les grandes étapes

III.1. Conditions d'hygiène

Le premier pré-requis avant de commencer une série d'expérience d'HIS est d'établir un environnement dépourvu d'ARNases.

Les ARNases sont des enzymes résistantes et ubiquitaires menaçant l'ARN contenu dans les préparations histologiques (www.ambion.com).

Ce sont des enzymes présentes à la fois dans les cellules procaryotes et eucaryotes. Le corps humain utilise les ARNases pour se défendre contre l'attaque par des microorganismes en sécrétant ces enzymes dans les larmes, la salive, le mucus... Cependant, la source primaire d'ARNases dans la plupart des milieux sont les microorganismes (bactéries, levures et spores).

Ainsi, il faut suivre des procédures de laboratoire très strictes lors des expériences pour éviter la contamination des tissus :

- port de gants pendant toute la durée de l'expérience
- utilisation d'embouts et tubes portant la mention « ARNases free », c'est-à-dire qui ont subi des traitements permettant la destruction des ARNases
- stérilisation de toute la verrerie et de tout le matériel possible (récipients en plastique, métal ...) utilisés pendant l'expérience
- utilisation de solutions « ARNases free ». Cela consiste à traiter eau et solutions avec du pyrocarbonate de diéthyle (DEPC). Utilisé à la concentration de 0.1%, le DEPC inhibe les ARNases. Après une incubation à 37°C des solutions traitées avec DEPC pendant deux heures minimum, celles-ci sont autoclavées permettant ainsi la destruction de l'excès de DEPC.

III.2. Préparation des tissus

III.2.1. *Fixation des tissus*

La fixation des tissus est une étape essentielle du succès de l'HIS. Le but de cette étape est d'inhiber le métabolisme cellulaire, d'inactiver les enzymes lysosomiales et les ARNases endogènes tout en conservant la morphologie cellulaire et l'intégrité des acides nucléiques. Cette fixation doit être faite le plus rapidement possible juste après l'extraction de l'organe ou du tissu. Elle peut même être faite *in vivo* (Morel et Cavalier, 2001).

Il existe deux principaux types de fixateurs :

- Fixateurs additifs: ils forment des liaisons covalentes entre les protéines des préparations cellulaires et histologiques.
Exemple : paraformaldéhyde (PFA), glutéraldéhyde.
- Fixateurs dénaturants: ils entraînent l'insolubilisation et l'inactivation des sites enzymatiques tout en préservant les sites antigéniques des modifications de la structure tertiaire des protéines.
Exemple : alcool ou acétone.

III.2.2. *Stockage des tissus*

- Tissu congelé

Le tissu est stocké à -70°C . Il peut également être directement congelé dans de l'azote liquide juste après son extraction puis stocké à -70°C , cela constitue une fixation « physique ».

Les coupes de tissus sont ensuite préparées au microtome, sur tissus indifféremment fixés (avec des fixateurs) ou non (congélation directe après extraction).

- Tissu inclus en paraffine

En intégrant le tissu dans de la paraffine, le matériel biologique passe d'une forme semi-liquide à une forme solide homogène suffisamment dure pour permettre la coupe du tissu tout en préservant sa morphologie. Dans le cas de tissus inclus en paraffine, la phase de fixation doit se faire obligatoirement avant l'inclusion.

III.3. Hybridation

C'est l'étape pendant laquelle la sonde est mise en contact avec le tissu, permettant ainsi l'hybridation de la sonde aux ARNm cibles.

Pour assister et contrôler la formation d'hybrides stables et spécifiques avec l'ARNm cible, la sonde est diluée et appliquée aux coupes par l'intermédiaire d'une solution d'hybridation.

Cette solution inclut des composants variés qui contrôlent la température de fusion (T_M) des séquences duplex.

- T_M

T_M est la température pour laquelle 50% de la population d'hybrides formés se dissocient en simples brins.

La température à laquelle la phase d'hybridation est conduite est calculée à partir de la T_M de la sonde utilisée. Il a été prouvé que l'hybridation doit être réalisée à une température inférieure de 20 à 25°C à celle de la T_M pour être dans des conditions optimales de formation d'hybrides stables. La

T_M est calculée à partir de la formule établie par Young (1992). Cette formule tient compte de la longueur de la sonde (L), du pourcentage de bases G et C ($GC\%$), du pourcentage de formamide ($F\%$) et de la concentration (M) de cations monovalents présents dans la solution d'hybridation.

$$T_M = 81.5 + 16.6 \ln(M) + 0.41(GC\%) - 0.61(F\%) - 500/(L)$$

- Hybridation

La phase d'hybridation au sens stricte consiste donc à la mise en contact des sondes diluées dans la solution d'hybridation avec les ARNm cibles présents dans les coupes. La durée de cette phase est variable et peut durer de 5-6 heures jusqu'à 40 heures en fonction de la sonde utilisée. Cependant, en général, quand il n'existe pas de protocole précis pour une sonde donnée, cette phase est souvent conduite pendant toute une nuit pour des raisons pratiques (environ 18-20h).

Le succès et le taux d'hybridation dépendent de nombreux facteurs comme la concentration de la sonde, les composants de la solution d'hybridation ainsi que la température et la durée de la réaction d'hybridation.

- La solution d'hybridation

Au même titre que la longueur de la sonde et son contenu en bases GC, la composition de la solution d'hybridation contribue à l'établissement d'une T_M propre à la sonde, plus spécifiquement sa concentration en formamide et en cations monovalents. Le formamide agit comme un agent déstabilisateur d'hélice, qui, en abaissant la température à laquelle les conditions d'appariement sont optimales, permet d'améliorer la préservation du tissu. La stringence est aussi ajustée par la disponibilité des cations monovalents fournis par le sodium présent dans le chlorure de sodium et le citrate de sodium. Ces deux sels sont réunis dans la solution « standard sodium citrate » (SSC). Il existe une relation inversée entre la concentration en cations de SSC et les conditions de stringence : quand SSC est utilisée à forte concentration, les conditions de stringence sont faibles, alors que dans le cas où SSC est utilisée à faible concentration, seules les séquences de parfaite homologie se lient.

Egalement incluses à la solution d'hybridation, on trouve des molécules macroanioniques (ici de l'ADN de sperme de saumon), du Dextran sulfate, de la solution de Denhardt's et de l'ARNt de levure. Leur concentration absolue n'a qu'une faible influence sur la T_M .

Le Dextran sulfate peut multiplier le rapport d'hybridation par 3. Il agit par exclusion de volume d'eau en formant une matrice dans la solution d'hybridation qui concentre la sonde sans affecter la stringence. La solution de Denhardt's agit comme un bloquant des sites non spécifiques, réduisant ainsi le bruit de fond ou « background ». Enfin, l'ADN de sperme de saumon et l'ARNt de levure sont inclus pour inhiber la liaison des sondes à des sites non spécifiques et ainsi augmenter leur spécificité.

III.4. Lavages post-hybridation

La spécificité et la stabilité de l'appariement de deux molécules d'acides nucléiques dépendent de leur degré de complémentarité.

Le but de cette étape est d'éliminer toute hybridation non spécifique produisant un bruit de fond et masquant les hybridations spécifiques et de réduire ainsi le rapport signal/bruit de fond.

Dans ce but on effectue une succession de lavages à stringence croissante, de telle sorte que seuls les hybrides spécifiques, qui sont les plus stables, persistent. Le choix de la stringence de ces lavages est critique. Il s'agit en effet d'éliminer uniquement les hybrides non spécifiques. La stringence dépend à la fois de la concentration en sels et de la température à laquelle les lavages sont effectués. Comme pour l'étape d'hybridation, on peut calculer la température optimale de lavage en utilisant la formule donnée ci-dessus. Il est alors conseillé de laver 15 à 20°C en dessous de la température calculée. On peut noter que la stringence des solutions de lavage sera toujours supérieure à celle de l'étape d'hybridation (Morel et Cavalier, 2001).

III.5. Etape de révélation

Il existe de multiples méthodes de révélation qui dépendent du marquage des hybrides explicités plus haut.

Quelle que soit la nature du marquage, l'étape de révélation implique deux paramètres essentiels : la sensibilité et la résolution. Il y a trois approches possibles pour révéler les hybrides : l'autoradiographie, la fluorescence et l'immunocytochimie.

Cette étape est détaillée dans la partie méthode.

III.6. Visualisation

Les lames sont observées au microscope optique.

III.7. Contrôles

Il existe de nombreux contrôles que l'on peut effectuer à toutes les étapes. Nous en suggérons ici quelques-uns. Les contrôles utilisés pour ce protocole d'HIS sont expliqués dans la partie méthode :

- Sondes :
 - Recherche de séquences homologues dans une banque de gènes (recherche BLAST) pour éviter le risque d'une forte homologie avec une séquence existante pouvant causer la formation d'hybrides.

- Hybridation avec des sondes « sens » (possibles pour les oligonucléotides et les sondes ARN).
- Hybridation et lavages
 - Hybridation avec absence de sondes.
 - Variation sur la stringence des conditions d'hybridation et de lavage.
- Tissu
 - Hybridation positive sur tissus ou cellules connus pour exprimer l'acide nucléique cible.
 - Hybridation négative sur tissus ou cellules connus pour ne pas exprimer l'acide nucléique cible.

Chapitre deuxième

MATERIELS ET METHODES

Dans ce chapitre sont présentés le choix du matériel et la mise en oeuvre du protocole expérimental pour conduire ces expériences.

I. Hybridation *in situ*

I.1. Les sondes : GFAP et β -actine

I.1.1. *GFAP*

a. Choix du messenger cible

Comme il a été expliqué plus haut, il s'agit de la mise au point d'une méthode d'HIS universelle, simple et reproductible.

En effet, les résultats des microarrays mettent en avant le rôle d'un grand nombre de gènes d'intérêt dans la maladie de Parkinson. Idéalement, nous souhaitons un back-mapping systématique de l'ensemble des gènes dans les tissus parkinsoniens par HIS. Ainsi, il faut une méthode permettant la production rapide et simple d'une grande diversité de sondes. Les oligonucléotides sont les sondes qui répondent à ces critères.

Pour mettre cette méthode au point et l'extrapoler ensuite à l'étude des gènes d'intérêt impliqués dans la maladie de Parkinson, on utilise en premier lieu une sonde contrôle positive ; c'est-à-dire une sonde qui va s'hybrider avec un ARNm connu pour être exprimé dans le tissu étudié.

L'organe étudié ici est le cerveau humain. Pour des raisons évidentes, la méthode est initialement mise au point sur des cerveaux de rats. En effet, les cerveaux parkinsoniens sont précieux et rares et les phases de mise au point sont généralement grandes consommatrices de tissus. La sonde contrôle positive doit donc cibler un ARN messenger connu pour être exprimé dans le cerveau de rat.

C'est le cas de la Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP). La GFAP est la protéine majeure des filaments intermédiaires présents dans les astrocytes matures du système nerveux central. Elle y est exprimée en abondance (Malhotra *et al.* , 1990). De plus, la surexpression de GFAP est une des caractéristiques majeures de la réaction astrocytaire suite à une lésion du système nerveux central (Gomes *et al.* , 1999). Enfin, la quantité de protéines GFAP présentes dans les astrocytes et détectées par immunocytochimie dépend en premier lieu de la quantité d'ARN messagers (Kitamura *et al.* , 1987). Ceci nous permet donc de supposer qu'il y a un niveau élevé d'ARNm de GFAP et que ceux-ci sont détectables par des oligonucléotides dans notre méthode d'HIS.

b. Design de la sonde Greenstar par Genedetect

Les sondes oligonucléotides antisens et sens spécifiques d'ARN messagers de GFAP de rat sont synthétisées par la compagnie GeneDetect (Nouvelle Zélande). Elles sont livrées sous le nom de sondes GreenStarTM. La séquence utilisée pour cette synthèse a été choisie par GeneDetect dans la littérature où son efficacité a été démontrée (Hinks et Franklin, 1999). Pour la conception des sondes, la compagnie effectue également une recherche BLAST dans le génome de rat (annexe A) et vérifie ainsi la spécificité de la séquence et l'absence d'homologie avec d'autres ARNm.

La sonde antisens (AS) est longue de 45 paires de base (pb) et présente la séquence suivante :

5'-CAGCTCCCGAAGTTCTGCCTGGTAAACGTCAGCCAGTTTGGTGGG-3'

La sonde sens est longue de 45 pb et présente la séquence suivante :

3'-GTCGAGGGCTTCAAGACGGACCATTTGCAGTCGGTCAAACCACCC-5'

La sonde sens correspond donc à une séquence antiparallèle de la séquence AS complémentaire des ARNm cibles. Elle est essentielle dans les étapes de contrôle: elle permet un *contrôle négatif*. En effet, son hybridation sur des tissus cibles ne doit pas donner de signal. Le cas échéant, cela indique que les hybrides formés avec la sonde sens sont le résultat d'une hybridation par encombrement spatial et non par complémentarité des séquences avec établissement de liaisons hydrogène. Si l'hybridation avec la sonde sens donne un signal, on conclue alors à la formation d'hybrides non spécifiques pour une partie des hybrides formés entre la sonde AS et les ARNm cibles.

Il est également livré une sonde poly dT. Sa séquence est constituée de 48 thymidines. Elle permet un *contrôle positif*. Cet oligonucléotide se lie aux parties terminales des ARNm. En effet, tous les ARNm possèdent une partie terminale constituée d'une succession d'adénosines encore appelée queue "poly A". Cette sonde permet ainsi de contrôler la qualité du tissu en s'assurant de la présence d'ARNm.

c. Marquage des sondes

Au moment de commencer ce projet en février 2003, étaient disponibles des sondes oligonucléotides GFAP marquées par la fluorescéine (FITC) pour une visualisation directe par microscopie à fluorescence. Ces sondes avaient été acquises pour un projet entrepris en février 2002. Les résultats de ce projet ayant été négatifs, il a été décidé d'utiliser une méthode de détection indirecte avec FITC comme molécule antigénique.

Plus tard au cours du projet, il a également été décidé de se procurer de nouvelles sondes marquées à la digoxigénine, cette dernière molécule étant connue pour être plus sensible que FITC (Morel et Cavalier, 2001).

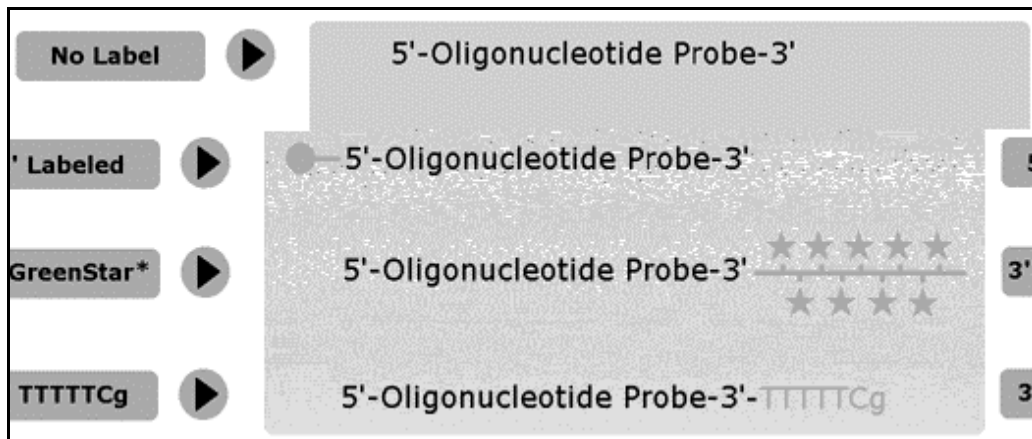
Nous disposons donc de deux types de marquage pour les sondes GFAP : FITC (fluorescéine) et DIG (digoxin, proposé par Genedetect, est un dérivé de la digoxigénine permettant d'utiliser les mêmes méthodes de détection que celles utilisées pour la digoxigénine).

Le marquage consiste à attacher par liaison covalente une structure antigénique en position 3' (méthode 3' Greenstar). Cette structure incorpore une succession de molécules (Figure 14), soit FITC, soit DIG, espacées de manière optimale pour permettre une détection des sondes la plus sensible possible par les méthodes standard ([www. genedetect. com](http://www.genedetect.com)).

Figure 14 Différentes méthodes de marquage

(D'après [www. genedetect. com](http://www.genedetect.com))

No Label : absence de marquage ; Labelled : marqué ; Probe : sonde.



Pour chaque type de marquage (DIG et FITC) nous avons à disposition:

- 5 µg de sondes GFAP antisens lyophilisées
- 1µg de sondes GFAP sens lyophilisées
- 1µg de sondes poly dT lyophilisées.

Les sondes sont diluées dans de l'eau DEPC de telle sorte que la concentration finale pour chacun des lots est de 10ng/µl.

Les sondes sens et antisens ont un contenu en bases G et C de 58% et leur température de fusion est de 94°C.

I.1.2. *β-actine*

La β -actine est une protéine très conservée, exprimée de manière ubiquitaire dans toutes les cellules eucaryotes comme composant du cytosquelette et comme médiateur de la motilité intracellulaire.

Les sondes oligonucléotides antisens et sens spécifiques d'ARN messagers de β -actine sont synthétisées par la compagnie GeneDetect (Nouvelle Zélande). Ces sondes sont proposées par Genedetect comme sondes contrôle positives pour tous les tissus, dans toutes les espèces.

Ces sondes ont été acquises au cours du projet.

La séquence utilisée pour cette sonde a été choisie par GeneDetect dans la littérature où son efficacité a été démontrée (Wullner, 1994).

La sonde antisens est longue de 48 pb et présente la séquence suivante :

5'-GCCGATCCACACGGAGTACTTGCGCTCAGGAGGAGCAATGATCTTGAT-3'

La sonde sens est longue de 48 pb et présente la séquence suivante :

3'-CGGCTAGGTGTGCCTCATGAACGCGAGTCCTCCTCGTTACTAGAACTA-5'

Les sondes sont marquées par DIG avec la méthode 3' Greenstar.

Nous disposons de :

- 5 µg de sondes β -actine antisens lyophilisées
- 1µg de sondes β -actine sens lyophilisées.

Les sondes sont diluées dans de l'eau DEPC de telle sorte que la concentration finale pour chacun des lots est de 10ng/µl.

I.2. La cible : Animaux et tissus

I.2.1. *Les animaux*

Les rats utilisés pour cette expérience sont des mâles Sprague-Dawley (Harlan, UK) de 250g ($\pm$ 25g).

Les rats sont tués par décapitation à la guillotine. Le cerveau est prélevé immédiatement et est placé dans de l'azote liquide pour une congélation rapide puis stocké dans un congélateur à -80°C .

I.2.2. *Tissus cibles*

Les tissus disponibles sont le striatum et le noyau facial. Ils sont tous les deux disponibles congelés. Il est judicieux de mettre au point la méthode d'HIS sur tissu congelé car c'est sous cette forme que les tissus parkinsoniens seront disponibles (les expériences de microarrays nécessitent des tissus congelés).

a. Striatum

Le striatum, disponible alors au moment du projet, est le nom donné à une aire profonde du cerveau formée par deux noyaux: le noyau caudé et le putamen (Figure 15, Figure 16 et Figure 17). Ces deux noyaux font partie des cinq noyaux qui composent les noyaux gris de la base (les 3 autres étant le globus pallidus, les noyaux sous-thalamiques et la substance noire).

Le striatum est impliqué dans le contrôle du mouvement, de l'équilibre et de la marche.

Figure 15 Reconstruction tridimensionnelle du striatum dans un encéphale humain translucide (D'après Nolte, 2002)
Head : tête.

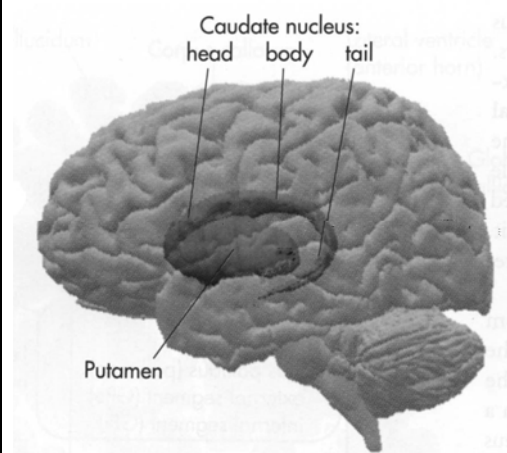


Figure 16 Section parasagittale de l'encéphale humain montrant le striatum (D'après Nolte, 2002).

Cell bridges : ponts cellulaires ; Posterior limb : membre postérieur.

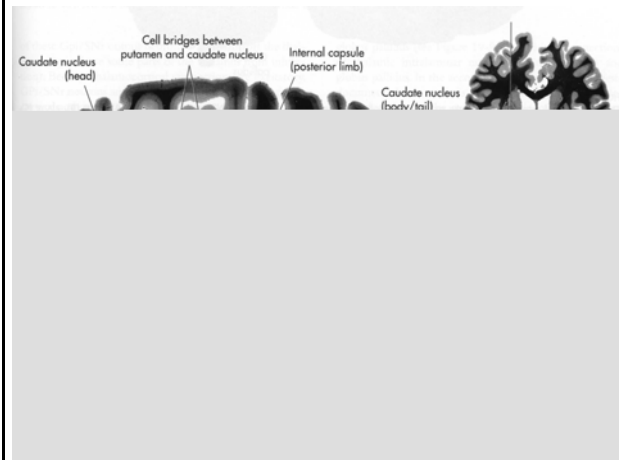
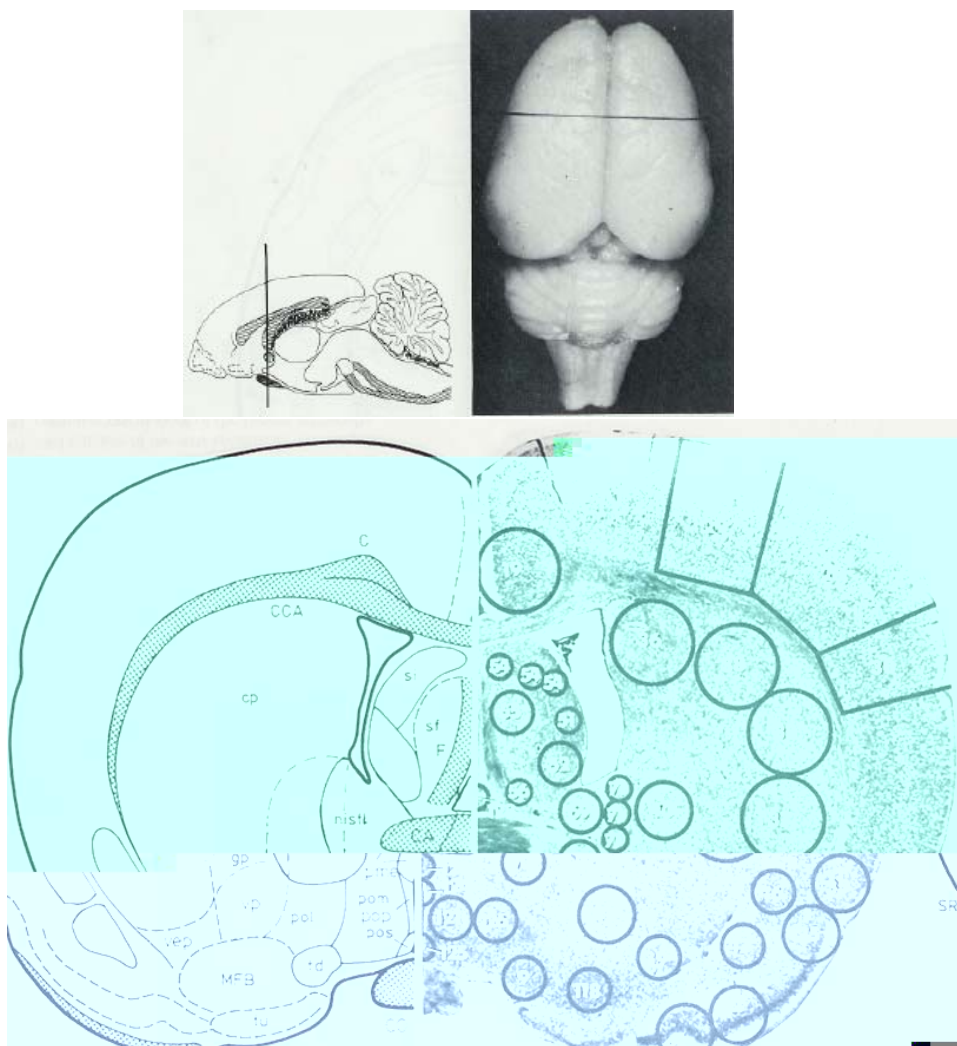


Figure 17 Coupe transversale d'encéphale de rat faisant apparaître le striatum = noyau caudé (36, 37) et putamen (38) (D'après Palkovits et Brownstein, 1998)



b. Le noyau du nerf facial

Le noyau du nerf facial est localisé dans le tronc cérébral. Il représente un lien crucial entre le cerveau et la moelle épinière (Figure 18, Figure 19 et Figure 20).

Nous disposons de cerveaux de rats ayant subi une axotomie d'un des nerfs faciaux 4 jours avant leur sacrifice.

Des résultats de microarrays non publiés du groupe de recherche du Pr MB Graeber (laboratoire de neuropathologie, Imperial College, London) montrent que l'axotomie du nerf facial change le niveau d'expression de nombreux gènes dans le noyau du nerf facial correspondant. Parmi ces gènes, il apparaît que le gène GFAP est sur-exprimé. Ainsi, nous supposons obtenir un signal plus intense dans le noyau facial dont le nerf correspondant a subi une axotomie que dans le noyau facial opposé dont le nerf a été laissé intact et qui sert donc de contrôle.

Figure 18 Localisation du noyau facial dans le cerveau humain
(D'après: <ftp://ftp.cc.ic.ac.uk/pub/depts/neuropat/Inaug/InaugMBG.pdf>)

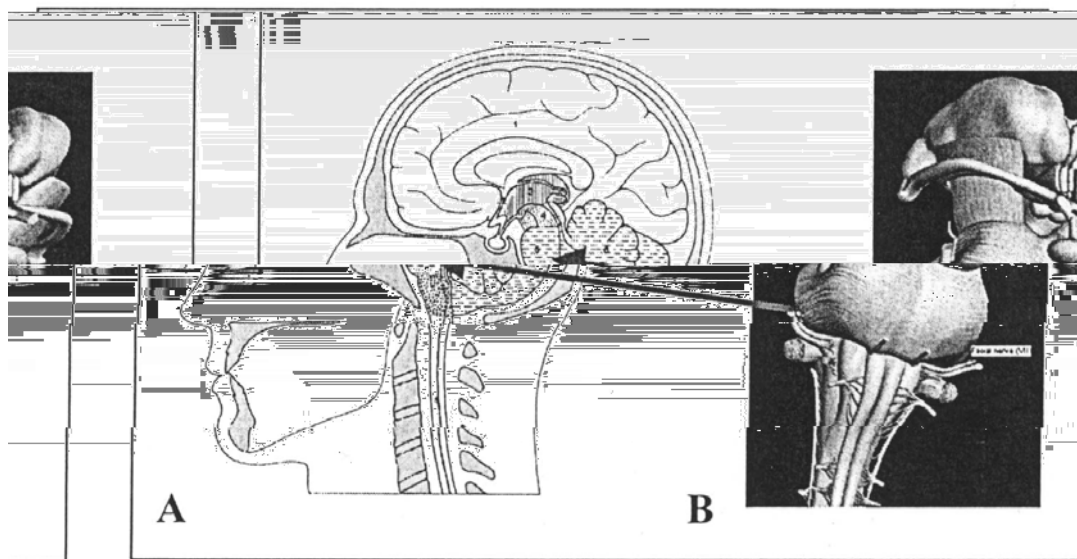


Figure 19 Coupe transversale d'encéphale de rat faisant apparaître le noyau du nerf facial (243)
(D'après Palkovits et Brownstein, 1998).

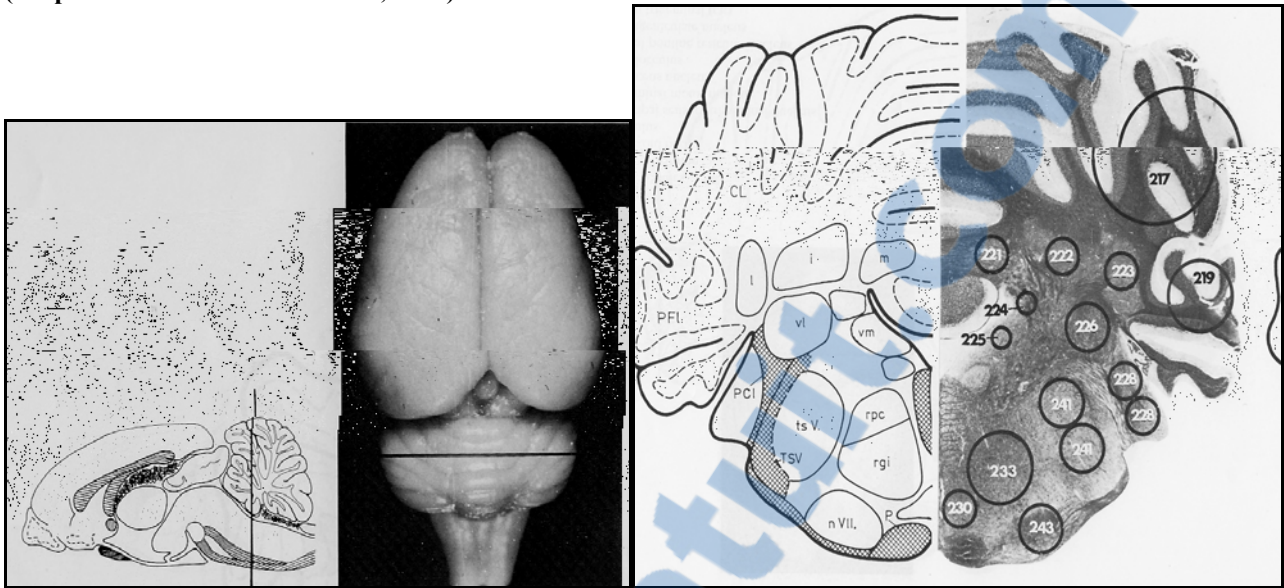
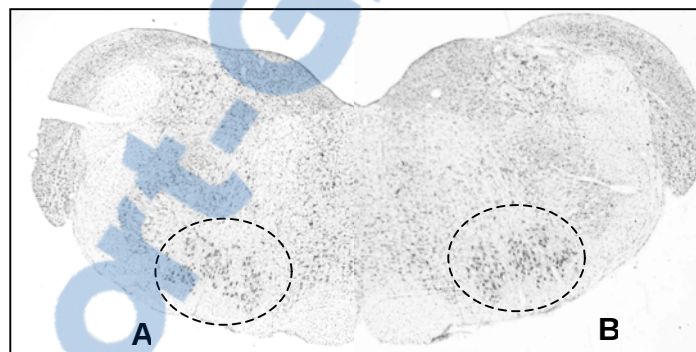


Figure 20 Noyaux des nerfs faciaux de rats adultes 9 jours après une transection du nerf facial



Les cercle pointillés indiquent la localisation du noyau contrôle (A) et du noyau ayant subi la transection (B) colorés par du Crésyl Fast Violet (coloration des neurones).

I.3. Protocole d'hybridation *in situ* (annexe B)

Pour toutes les étapes d'HIS, le matériel utilisé est stérilisé. Toutes les solutions sont faites avec de l'eau DEPC puis traitées par DEPC.

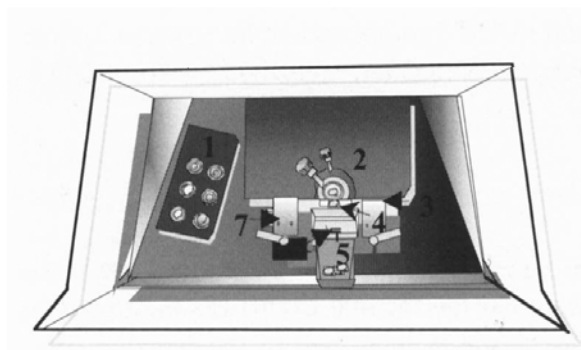
I.3.1. Préparation des coupes de tissu

Des coupes de 12µm d'épaisseur de différents cerveaux de rats (stockés à -80°C) sont réalisées dans des régions contenant le striatum et le noyau facial au moyen d'un cryostat (Figure 21).

Les températures de la chambre et du spécimen au moment de la coupe sont respectivement de -26°C et -18°C. Tout le matériel utilisé lors de la coupe (lame, guide plastique, pinces...) est nettoyé avec la solution RNase Zap (SIGMA) qui permet l'élimination de toutes les ARNases potentiellement présentes et risquant de détériorer la qualité des tissus.

Les coupes de tissus sont montées sur des lames Superfrost Plus slides (BDH), puis laissées à l'air libre 15 à 20 minutes pour permettre leur séchage et une adhérence optimale à la lame. Les coupes de tissu sont stockées au congélateur à -80°C.

Figure 21 Cryostat
(D'après Morel et Cavalier, 2001)



- 1 = zone de stockage des échantillons (mécanisme de congélation rapide)
- 2 = axe de support des échantillons
- 3 = lame
- 4 = coupe
- 5 = plateau de réception des débris de coupe
- 6 = système de blocage
- 7 = système de maintien de la lame

I.3.2. Prétraitement des coupes de tissu

a. Fixation

Les coupes sont placées dans une jarre de Coplin dès leur sortie du congélateur et sont fixées par immersion pendant 10 min dans du paraformaldéhyde (PFA) 4% (dans une solution phosphate à 0.1M et pH7, 4) préparé le jour même et à 4°C.

Il faut impérativement éviter de laisser les coupes revenir à température ambiante (TA) avant leur immersion.

b. Lavages et étape de déshydratation

Les coupes sont ensuite rincées dans une solution molaire saline de phosphate pendant 3x5 min puis déshydratées pendant 10 min dans de l'éthanol 100%.

Les coupes sont ensuite séchées à l'air libre pendant environ une demi-heure jusqu'à l'étape d'hybridation.

1.3.3. Hybridation

Les coupes sont placées dans une chambre d'hybridation humide. La chambre d'hybridation correspond à une boîte en plastique qui se ferme hermétiquement et dans laquelle on place un morceau de papier buvard imbibé de solution SSC.

Sur chaque coupe de tissu, on dépose environ 150µl de solution d'hybridation dans laquelle la sonde est diluée (voir annexe B pour la composition de la solution d'hybridation). La concentration finale est de 200ng de sondes par mL de solution d'hybridation (concentration déterminée à la suite de plusieurs expériences).

Les lames sont recouvertes de parafilm pour éviter leur dessèchement et sont incubées pendant 18 heures à 37°C (la température varie selon les expériences).

1.3.4. Lavages des lames

A la fin de l'étape d'hybridation, le parafilm est retiré ainsi que l'excès de solution d'hybridation.

Les coupes de tissu sont ensuite placées dans une jarre Coplin et subissent les lavages suivants:

Rinçage rapide	1xSSC à TA
2 x 15 min	1xSSC à 55 °C dans un bain-marie agitateur
2 x 15 min	0.5xSSC à 55 °C dans un bain-marie agitateur
1 x 10 min	0.5xSSC à TA

Les facteurs 1x et 0. 5x indiquent la concentration de la solution. Comme il a été expliqué plus haut, plus la concentration est faible plus la stringence est importante. Nous effectuons donc ici des lavages de stringence croissante.

Toutes les solutions sont faites le jour même de leur utilisation.

Les coupes restent dans la dernière solution jusqu'à l'étape suivante.

1.3.5. *Détection et visualisation des hybrides*

La détection des hybrides est faite de manière indirecte. Les hybrides dont les sondes sont marquées par la DIG sont détectés grâce à l'utilisation d'anticorps de mouton anti-digoxigénine conjugués à l'enzyme alcaline phosphatase (Anti-digoxigénine-AP Fab fragments; Roche, Cat#1093274). Ceux dont les sondes sont marquées par FITC sont détectés par un anticorps de chèvre anti-FITC conjugué à l'alcaline phosphatase (MB-2100 Vector laboratories).

Les étapes de détection sont les suivantes:

- 1- Rinçage des coupes 3x5 minutes (min) dans une jarre de Coplin contenant une solution saline Tris-HCl (TBS).
- 2- Immersion des coupes pendant 30 min dans une solution bloquante faite de TBS + 0.1% Triton X-100 + 1% de sérum normal de mouton ou de chèvre en fonction du type de marquage des sondes.
- 3- Les coupes sont ensuite retirées de la solution bloquante et essuyées. Un trait au pap pen est appliqué tout autour de la coupe, ce qui permet d'éviter les fuites de solution d'anticorps. Les coupes sont ensuite recouvertes d'environ 200µl de solution contenant les anticorps adéquats à la dilution de 1:200. Les coupes sont ainsi laissées pendant 4 heures à température ambiante.
- 4- Rinçage des coupes 3x5 min dans du TBS.
- 5- Immersion des coupes dans une solution de NBT/BCIP 1 mM lévamisole (Nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) préparée avec les NBT/BCIP Ready to use tablets de chez Roche. Les coupes sont immergées dans une jarre de Coplin fermée de manière étanche et laissée à l'abri de la lumière pendant 16 heures à TA.
La réaction de l'AP avec les deux substrats NBT et BCIP donne un précipité de coloration bleue/violette.
- 6- La réaction est stoppée en rinçant les coupes 3x5 min dans de l'eau du robinet à TA puis en les immergeant brièvement (quelques secondes) dans de l'eau distillée.
Juste après l'étape 6, certaines coupes sont immergées pendant 2 min dans une solution d'hématoxyline de Mayer pour colorer les noyaux puis subissent à nouveau l'étape 6.
- 7- Les coupes sont ensuite laissées à l'air libre pour sécher puis montées entre lame et lamelle avec un liquide de montage soluble (Vectamount de chez Vector).

Les lames sont ensuite observées au microscope optique avec différents objectifs.

I.3.6. Contrôles

Ces étapes sont cruciales pour pouvoir exploiter les résultats obtenus avec la sonde antisens.

Comme il a été vu plus haut, il est livré deux sondes contrôles : poly dT et sens.

a. Les sondes poly dT

Les sondes poly dT détectent les queues poly A des ARNm totaux.

Si un signal très faible est obtenu lors de l'utilisation de cette sonde, il est fort possible que les ARNm du tissu soit détériorés.

Avec cette sonde, l'étape d'hybridation doit être réalisée à température ambiante (température optimale à 13.5°C) et les lavages post-hybridation sont réalisés à 15-20°C au-dessus de la température d'hybridation. Enfin, la solution d'hybridation ne doit pas contenir de poly A.

b. Liaisons spécifiques versus non spécifiques.

On peut estimer le pourcentage de liaisons non spécifiques en hybridant le tissu avec les sondes antisens et sens en parallèle.

La sonde antisens va détecter à la fois les ARNm cibles et les ARNm non spécifiques auxquels elle peut se lier en raison de ses propriétés chimiques plutôt que de sa séquence.

La sonde sens donne une estimation quantitative des liaisons non spécifiques seulement dues aux propriétés chimiques de la sonde.

La sonde sens subit les mêmes conditions d'hybridation et de lavage que la sonde antisens.

II. Immunocytochimie

Nous avons souhaité au cours des expériences vérifier la présence de la protéine GFAP.

Pour deux coupes, l'une de striatum, l'autre de noyau facial, nous avons réalisé une expérience d'immunocytochimie avec des anticorps anti-GFAP.

La manipulation a été réalisée par un membre du laboratoire expérimenté pour cette manipulation sur les mêmes lots de coupes de tissus que ceux utilisés pour l'HIS

Le détail des anticorps et du protocole utilisés se trouve en annexe C.

Chapitre troisième

RESULTATS

Après avoir exposé la méthode expérimentale, ce chapitre a pour objectif de présenter les résultats obtenus.

I. Hybridation *in situ*

Le but de ce projet est de mettre au point une méthode d'HIS. En conséquence, pour chaque nouvelle expérience, de nombreux paramètres du protocole sont changés afin d'affiner la méthode et d'améliorer les résultats obtenus.

Pour cette raison, il semble judicieux d'exposer les résultats chronologiquement pour chaque série d'expériences.

Il a été réalisé 10 expériences d'HIS. Les résultats sont donnés pour chaque expérience numérotée de 1 à 10.

Numéro des HIS	Caractéristiques de l'expérience	Lecture des lames au microscope optique	Interprétation	Etape expérimentale suivante
HIS 1	• Sonde GFAP antisens FITC • 200ng/μL • Striatum • Immersion dans la solution NBT/BCIP : Lot A: 5h et lot B: 14h. • Hypothèse : obtenir une coloration bleue/violette périnucléaire dans les astrocytes.	• Neurones légèrement colorés en violet (Photo 1). • Coloration rose léger de la coupe entière. • Pas de différence de coloration entre lots A et B.	• Pas d'hybridation des sondes à la cible : les neurones sont légèrement colorés pas les astrocytes : problème de spécificité de liaison des sondes. • Pas de signal significatif. • Bruit de fond très élevé. • Absence de différence entre les lots A et B = durée de l'étape de détection non responsable de l'intensité du bruit de fond.	• Durée de l'étape de détection conservée autour de 11h pour raison de commodité. • Utilisation de la sonde poly dT : vérification de la qualité du tissu en ARNm obtention d'une image du type de coloration attendue dans le cas d'un signal positif.
HIS 2	• Sonde contrôle poly dT FITC • 200ng/μL • Striatum • Lot A: Conditions normales. • Lot B: Pas d'anticorps anti-FITC dans l'étape de détection. • Lot C: Pas de sonde pendant l'étape d'hybridation. • Lot D : Pas d'étape de détection indirecte avec l'AC anti-FITC mais détection directe par microscopie à immunofluorescence.	• Lot A: nombreuses et intenses tâches violettes distribuées de manière homogène sur toute la coupe. (Photo 2). • Lots B et C: coloration diffuse rose pâle sur toute la coupe, pas de coloration spécifique (Photo 3). • Lot D: Rares tâches fluorescentes distribuées sur l'ensemble de la coupe.	• Lot A : Signal positif : contrôle positif efficace. Hybridation réussie, qualité du tissu en ARNm conservée, protocole et solutions efficaces pour hybridation. • Lots B et C: Pas de signal, contrôles négatifs efficaces. Mise en évidence d'un léger bruit de fond du respectivement aux étapes de détection avec la solution NBT/BCIP et avec l'anticorps anti-FITC. • Lot D: Signal très faible et de densité très inférieure à celle du lot A. Méthode de détection directe très peu sensible par rapport à la méthode indirecte pour des mêmes conditions d'expérience.	But: obtenir un signal avec les sondes antisens GFAP FITC: • en diminuant la stringence des expériences pour aider à la formation des hybrides • en jouant sur les concentrations conseillées par GeneDetect dans son protocole: 1000ng/mL.
HIS 3	• Sondes GFAP antisens et sens FITC • 1000ng/mL • Striatum • Hybridations à 37°C et 30°C.	• Légère coloration rose diffuse de toutes les coupes et coloration plus foncée (violet) des neurones par rapport au reste du tissu (Photo 4 et Photo 5). • Test à l'aveugle : Classement des coupes en fonction de l'apparente spécificité de leur coloration (de la plus spécifique à la moins spécifique) : GFAP AS ^{37°C} < GFAP sens ^{37°C} < GFAP AS ^{30°C} < GFAP sens ^{30°C}.	• Pas de signal significatif : sondes non présentes ou non révélées ou bien : • Légère coloration des neurones (bruit de fond) due à l'hybridation non spécifique des sondes. • Légère coloration des neurones plus intense que dans la première ISH : peut être due à l'utilisation d'une concentration plus élevée (1000ng/mL contre 200ng/mL). • Classement à l'aveugle logique pour chaque température d'hybridation.	• Hybridation non spécifique des sondes d'où le bruit de fond observé. Malgré l'absence de signal, il semble judicieux d'augmenter la stringence pour connaître la part de bruit de fond que l'on peut

Numéro des HIS	Caractéristiques de l'expérience	Lecture des lames au microscope optique	Interprétation	Etape expérimentale suivante
HIS 4	• Sonde GFAP antisens FITC • 200ng/mL • Striatum • Hybridation à 37°C et 42°C.	• Légère coloration rose diffuse sur la totalité de la coupe, pour l'ensemble des lames. • Sur une coupe : deux tâches très délimitées et intenses qui pourraient être spécifiques d'ARNm GFAP. • Test à l'aveugle : il semble que la coloration des coupes hybridées à 42°C présente une coloration plus spécifique qu'à 37°C.	• Toujours bruit de fond très élevé. • Nécessaire de confirmer ou d'infirmer la présence potentielle d'hybrides GFAP en essayant de reproduire la même expérience.	• Expérience répétée dans les mêmes conditions. • Expérience identique effectuée sur des coupes incluant les noyaux du nerf facial provenant de rats ayant été sacrifiés 4 jours après avoir subi une axotomie du nerf facial. Le noyau de nerf facial contrôle (c'est-à-dire celui dont le nerf correspondant n'a pas été axotomisé) est repéré grâce à une ponction dans le cervelet du côté correspondant.
HIS 5	• Sonde GFAP antisens FITC • 200ng/mL • Striatums et noyaux de nerf facial de rats, 4 jours après l'axotomie du nerf. • Hybridation à 42°C.	• Légère coloration rose diffuse sur l'ensemble des coupes de tissus. • Pas de différence de coloration entre le côté lésé et le côté sain sur les coupes de noyau de nerf facial.	• Pas de signal. Deux possibilités : -Les coupes n'incluent pas le noyau du nerf facial. -Les conditions d'hybridation sont trop stringentes pour le noyau du nerf facial par rapport au striatum.	• Prochaine hybridation à 37°C sur des coupes de noyau de nerf facial. • Etant donné la difficulté à obtenir un signal, se pose la question de la qualité des sondes achetées il y a deux ans. Malgré la notice du fournisseur qui assure de la stabilité des sondes jusqu'à 3 ans si conservées à -20°C, il est décidé d'acquérir de nouvelles sondes.
HIS 6	• Sonde GFAP antisens FITC • 200ng/mL • Noyaux de nerf facial de rats, 4 jours après l'axotomie du nerf. • Hybridation à 37°C.	• Coloration diffuse rose pâle sur l'ensemble des coupes.	• Pas de signal. • Toujours bruit de fond très élevé.	• De nouvelles sondes marquées par FITC et DIG sont commandées. D'après la littérature DIG semble utilisé plus communément et semble être plus spécifique que FITC.
HIS 7	HIS 7 non interprétable due à des erreurs au cours de la manipulation.			

Numéro des HIS	Caractéristiques de l'expérience	Lecture des lames au microscope optique	Interprétation	Etape expérimentale suivante
HIS 8	- Hybridation avec des sondes soit marquées par FITC soit par DIG. Les conditions sont les suivantes pour les deux types de sonde : - Sondes GFAP antisens et sens - Sonde poly dT 200ng/mL - Striatum - Hybridation à 37°C et lavages post-hybridation à TA (24°C). -Pour chaque type de sonde (DIG ou FITC), l'une des coupes hybridées avec la sonde antisens GFAP subit une coloration à l'hématoxiline de Mayer. -Utilisation de différentes dilutions d'anticorps et de temps d'incubation des anticorps. -Coupes contrôles sans sonde ou sans anticorps.	<u>Sondes DIG</u> (Photo 6, Photo 7, Photo 8 et Photo 9) - Coupe hybridée avec poly dT : tâches violettes nombreuses et denses réparties sur l'ensemble de la coupe. - Coupes hybridées avec la sonde antisens : points violets bien délimités d'intensité moyenne dont la localisation peut être astrocytaire. - Sur la coupe traitée à l'hématoxiline de Mayer, les points violets sont en région périnucléaires. - Coupes hybridées avec la sonde sens : faible coloration rose diffuse sur l'ensemble de la coupe et quelques points violets bien définis. - Coupes sans anticorps ou sans sonde : faible coloration rose diffuse sur l'ensemble de la coupe. - Pas de différence significative dans le type et l'intensité de la coloration pour les lames où la dilution en anticorps et le temps d'incubation de la solution anticorps varient. <u>Sondes FITC</u> - Le résultat est similaire à celui obtenu pour les HIS précédentes.	- Signal avec la sonde poly dT donc contrôle positif : le tissu contient donc des ARNm. - Signal obtenu avec la sonde antisens. - Très léger signal avec la sonde sens. - Ensemble des résultats positif : il y a un signal, il semble spécifique. Cependant, une partie encore du signal peut être attribuée à des hybrides non spécifiques au vu des résultats donnés par les coupes hybridées avec la sonde sens. - Températures de lavage (TA) non stringentes : on peut supposer que le signal présent est non spécifique et dû à des hybrides non spécifiques non lavés pendant les étapes de lavages.	- Reproduction stricte des mêmes conditions sur des coupes de noyaux de nerf facial. - Puis nous augmenterons la stringence des lavages.

Numéro des HIS	Caractéristiques de l'expérience	Lecture des lames au microscope optique	Interprétation	Etape expérimentale suivante
HIS 9	Hybridation avec des sondes marquées FITC et DIG • Sondes GFAP antisens et sens • Sonde poly dT • 200ng/mL • Noyaux de nerf facial de rats, 4 jours après l'axotomie du nerf. • Hybridation à 37°C; lavages post-hybridation à TA (24°C).	<u>Sondes DIG</u> (Photo 10, Photo 11 et Photo 12) • Coupe hybridée avec poly dT : nombreuses et denses tâches violettes réparties sur l'ensemble de la coupe. • Coupes hybridées avec la sonde antisens : points violets bien délimités d'intensité moyenne, avec quelques tâches non spécifiques. La différence entre le côté sain et lésé est très faible, cependant il semble qu'il y ait peu de neurones dans chaque noyau, ce qui laisse supposer que la coupe ne représente pas la totalité du noyau et/ou que celui-ci n'est pas inclus dans la coupe. • Coupes hybridées avec la sonde sens : faible coloration rose diffuse sur l'ensemble de la coupe et quelques points violets bien définis, moins nombreux que sur la coupe hybridée avec la sonde antisens. <u>Sondes FITC</u> • Pas de signal en dehors de celui obtenu avec la sonde poly dT.	• Signal avec la sonde poly dT donc contrôle positif : le tissu contient des ARNm • Signal d'intensité moyenne avec la sonde antisens. • Très léger signal avec la sonde sens donc quelques hybridations non spécifiques. • Pas de différence significative entre le noyau sain et le noyau lésé car il semble que les coupes aient été réalisées en dehors du noyau du nerf facial. • Ensemble des résultats positif : il y a un signal, il semble spécifique, cependant une partie encore du signal peut être attribuée à des hybrides non spécifiques. • Températures de lavage (TA) non stringentes : on peut supposer que le signal présent est non spécifique.	• Augmentation de la stringence des lavages (30°C et 37°C°). • Obtenir des coupes de la meilleure qualité possible dans lesquelles nous avons la totalité du noyau du nerf facial.
HIS 10	• Sondes GFAP antisens et sens DIG • 200ng/mL • Noyaux de nerf facial de rats, 4 jours après l'axotomie du nerf. • Hybridation à 37°C. • Lavages à 37°C et 42°C.	• Pour l'ensemble des coupes : les neurones sont colorés. Il y a moins de neurones du côté lésé que du côté contrôle. • La coloration est plus intense avec les sondes antisens que les sondes sens. (Photo 13, Photo 14 et Photo 15)	• Les coupes contiennent le noyau du nerf facial. • Même si non spécifique, il y a eu hybridation, et un marquage plus intense du côté contrôle ou les ARNm sont plus nombreux; donc il y a eu hybridation à des ARNm. • Plus de tâches colorées sur les coupes hybridées avec la sonde antisens qu'avec la sonde sens: il y a une différence de liaison et de cible spécifique entre ces deux sondes. • Mais , ce sont les neurones qui sont colorés alors que ce sont les astrocytes qui sont la cible. Soit les conditions d'hybridation sont mauvaises soit la sonde est non spécifique.	• Commande d'une sonde contrôle : β-actine pour contrôler la qualité de notre protocole.

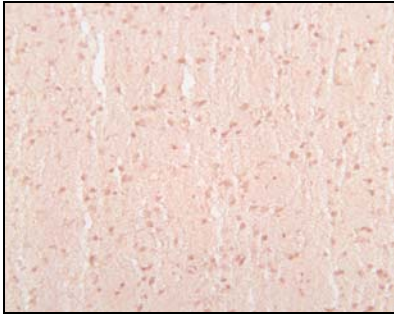


Photo 1 Striatum-Sonde GFPA antisens-FITC

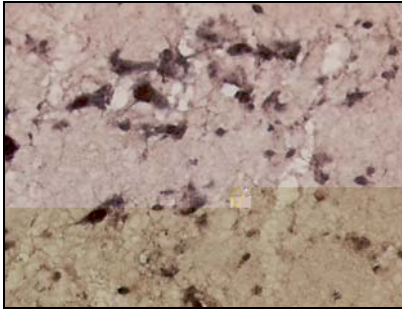


Photo 2 Striatum-Sonde poly dT-FITC

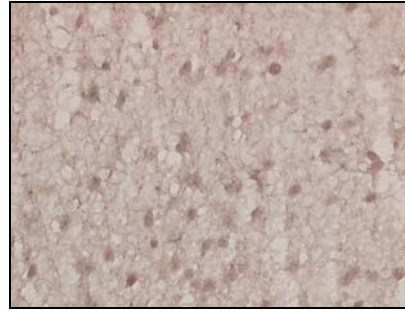


Photo 3 Striatum-Sans sonde

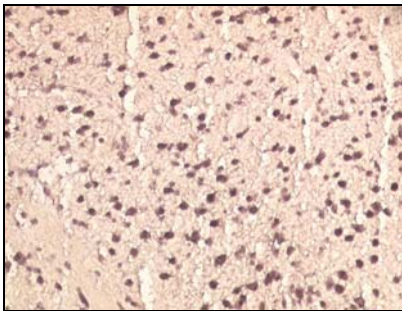


Photo 4 Striatum-Sonde GFAP antisens-FITC-37°C

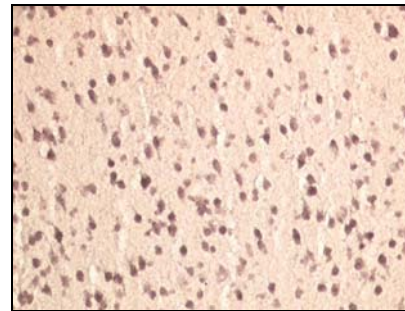


Photo 5 Striatum-Sonde GFAP sens-FITC-37°C-

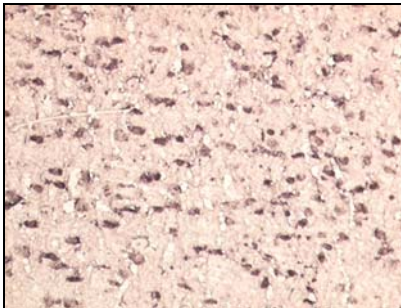


Photo 6 Striatum-Sonde poly dT-DIG

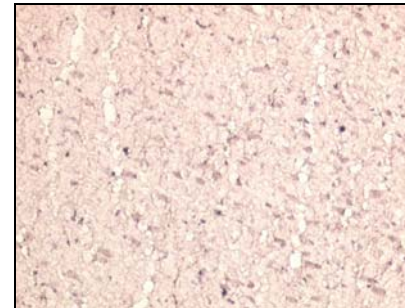


Photo 7 Striatum-Sonde GFAP antisens DIG + Haematoxilin Mayer's

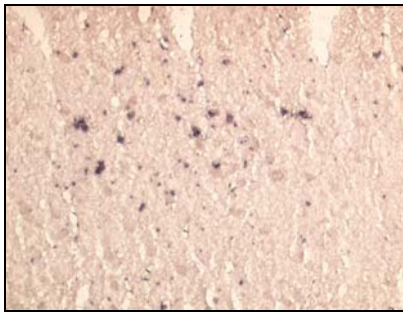


Photo 8 Striatum-Sonde GFAP antisens-DIG



Photo 9 Striatum-Sonde GFAP sens-DIG

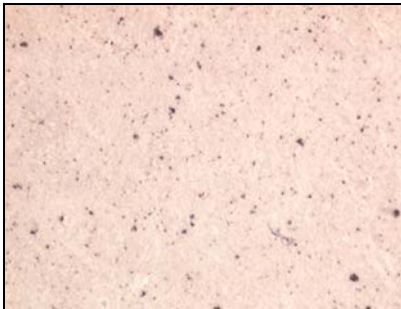


Photo 10 Noyau facial-Sonde GFAP antisens-DIG



Photo 11 Noyau facial-Sonde GFAP sens-DIG

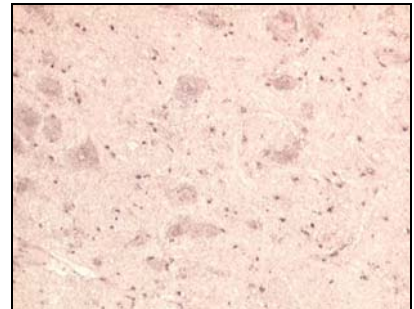


Photo 12 Noyau facial-Sonde poly dT-DIG

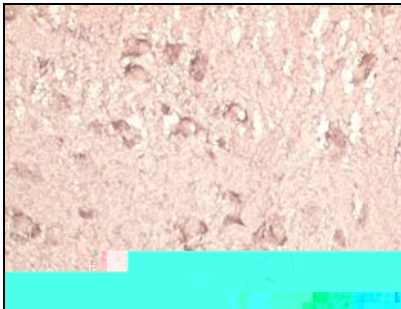


Photo 13 Noyau facial-Sonde GFAP antisens-DIG-37°C

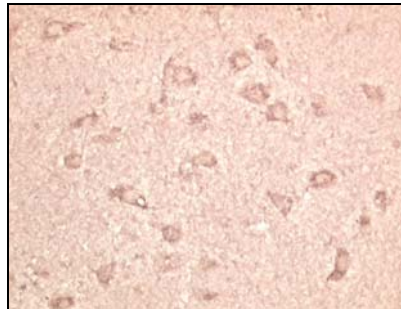


Photo 14 Noyau facial-Sonde GFAP sens-DIG-37°C

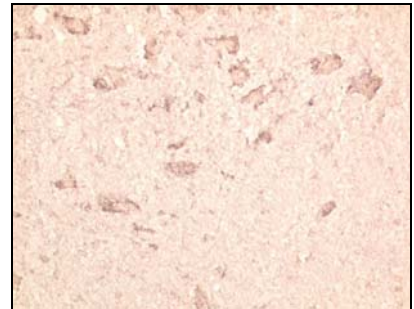


Photo 15 Noyau facial-Sonde GFAP antisens-DIG-42°C

II. Immunocytochimie

L'ensemble des coupes d'immunocytochimie révèle la présence de nombreuses protéines GFAP dans les astrocytes (Photo 16).



Photo 16 Immunocytochimie-Protéine GFAP

Chapitre quatrième

DISCUSSION

I. Bilan des expériences

Au vu des résultats avec la sonde GFAP, nous n'obtenons pas de signal (HIS 1) ou alors un signal non spécifique. En effet, dans le cas où nous obtenons un signal, ce dernier n'est pas dirigé vers notre cible, les astrocytes, mais vers les neurones (HIS 3). Ce signal non spécifique peut alors être attribué au bruit de fond créé par la forte concentration en sondes (1000ng/mL) et ne serait alors qu'une amplification du phénomène de bruit de fond de l'HIS 1. D'autre part, quand nous suspectons un signal spécifique (HIS 4), il est impossible de reproduire les mêmes résultats (HIS 5) ce qui infirme l'hypothèse d'un signal dû à des hybrides GFAP.

II. Comparaison des résultats avec la littérature

Pour pouvoir comparer le plus exactement possible nos résultats avec ceux de la littérature, il convient de comparer nos résultats avec ceux obtenus par une méthode très similaire.

Les grandes caractéristiques de notre expérience sont les suivantes :

- Tissus utilisés : cerveaux de rat, plus précisément striatums congelés.
- Sondes oligonucléotides de 45 mer.
- Marquage non radioactif des sondes par FITC ou DIG en 3'.
- Cible : ARNm de GFAP.

L'utilisation d'oligonucléotides marqués non radioactivement, bien qu'en expansion, n'est pas encore une utilisation courante, car si la spécificité de cette méthode est excellente, sa sensibilité n'égale pas encore celle obtenue à l'aide d'oligonucléotides marqués par des résidus radioactifs.

En conséquence, il a été impossible de comparer les résultats obtenus ici avec d'autres obtenus dans des conditions strictement identiques. Cependant, certaines études sont comparables dans les grandes lignes.

De plus, il est important de souligner la difficulté de mise au point d'une méthode d'HIS. Il n'est souvent pas suffisant d'appliquer un protocole pré-établi pour assurer le succès de l'hybridation. Dans la plupart des cas, chacun des paramètres du protocole doit être révisé dans le contexte précis de l'expérience menée.

Ainsi, dans une étude destinée à tester une approche non radioactive pour connaître la distribution des cellules exprimant l'acétylcholine dans le cerveau (Mis *et al.* , 1999), il a été utilisé deux types de sondes sur des striatums congelés de rats : une sonde ARN de 339 pb préparée par RT-PCR et marquée par la DIG et une sonde oligonucléotide de 64 mer marquée par la DIG. Les striatums sont disponibles congelés. Nous nous trouvons donc dans des conditions très similaires aux nôtres, cible mise à part. Les résultats obtenus sont positifs avec la sonde ARNm, et même plus spécifiques que ceux obtenus par marquage radioactif et publiés dans la littérature. Cependant, les sondes oligonucléotides n'ont pas permis la localisation des ARNm d'acétylcholine et ne présentent qu'un marquage non spécifique des coupes. Aucune explication n'a pu être donnée pour ce résultat négatif. Ceci illustre une des limites de l'utilisation des sondes oligonucléotides non radioactives : une sensibilité insuffisante par rapport à des sondes ARN marquées non radioactivement.

Cependant, Lazarov *et al.* (1998) a utilisé avec succès des sondes oligonucléotides de 45 mer sur cerveaux de rats (disponibles congelés) pour la localisation d'ARNm des récepteurs D1 à la dopamine. Ces résultats positifs sont obtenus suite à des lavages post-hybridation à 40°C (pour des concentrations SSC différentes), c'est-à-dire à la même température que celle utilisée pour l'étape d'hybridation. Ainsi, même si les conditions de lavage ne sont pas plus stringentes que celles utilisées pour l'hybridation, le signal obtenu est spécifique.

Dans les HIS 8 et 9, nous utilisons des températures de lavage encore moins stringentes, et nous obtenons un signal. Cependant ce signal n'est pas spécifique car on obtient une coloration des neurones et non des astrocytes.

En outre, quand nous effectuons des lavages à 55°C, nous n'obtenons pas de signal. Ceci confirme plusieurs points : d'une part notre séquence ne semble pas être spécifique de notre cible, et d'autre part, comme il est montré dans la publication de Lazarov *et al.*, il peut sembler judicieux d'essayer d'obtenir un signal en utilisant des lavages moins stringents, tout en cherchant à obtenir un rapport bruit de fond/signal acceptable. Il semble alors que des lavages peu stringents ne soient compromettant ni pour le rapport signal/bruit de fond, ni pour la spécificité du signal et la validation des résultats.

III. Critique de la méthode

III.1. Absence de signal

Pour essayer de comprendre l'origine de cette absence totale de signal malgré les nombreuses variations de conditions et de matériels, nous allons passer en revue l'ensemble des facteurs influençant les résultats de l'HIS. Nous nous interrogeons d'abord sur la qualité des solutions, des tissus et du protocole, puis sur la qualité et la spécificité des sondes.

III.1.1. Hypothèse 1 : Médiocre qualité des solutions et des tissus

Pour s'assurer au maximum de l'absence d'ARNases lors des expériences et ainsi de la qualité des tissus en ARN, les solutions initialement préparées au laboratoire (SSC, eau DEPC) ont ensuite été achetées auprès du laboratoire SIGMA.

D'autre part, les HIS réalisées avec la sonde poly dT donnent un signal intense (HIS 2, 8 et 9) et ceci permet de conclure à la présence d'ARNm dans les tissus et donc par extension de notre cible: l'ARNm de GFAP. Nous écartons l'hypothèse 1.

III.1.2. *Hypothèse 2 : Accès à la cible difficile.*

Les tissus sont fixés grâce à du PFA qui établit des liaisons covalentes entre les protéines. Ainsi, le PFA assure une bonne conservation de la morphologie des tissus et de leur qualité en ARN mais peut rendre difficile la pénétration des sondes dans le tissu et ainsi l'accès à leurs cibles. Dans le cas des oligonucléotides, ces sondes sont tellement courtes que leur pénétration dans le tissu ne pose aucun problème. Pour cette raison, il n'a pas été réalisé de digestion des tissus avec la protéinase K. Cette digestion aurait pu être envisagée pour éliminer les complexes protéo-nucléiques et ainsi faciliter l'accès aux ARN. L'hypothèse 2 est peu probable mais ne peut être rejetée.

III.1.3. *Hypothèse 3: Médiocres conditions d'hybridation*

Les conditions de stringence de l'HIS sont essentielles pour le succès et la validité de l'HIS. L'un des paramètres les plus critiques dans le succès de l'HIS est la température d'hybridation. En effet, elle varie d'une sonde à l'autre en fonction des propriétés de la sonde et des conditions d'expérimentation.

La température optimale d'hybridation est de 20 à 25 °C de moins que la T_M mentionnée plus haut.

$$T_M = 81.5 + 16.6 \ln(M) + 0.41(GC\%) - 0.61(F\%) - 500/(L)$$

Dans notre cas T_M est égale à :

$$T_M = 81.5 + 16.6 \ln(0.78) + 0.41(58) - 0.61(50) - 500/(48)$$

$$T_M = 81.5 - 4.12 + 23.78 - 30.5 - 10.41$$

$$T_M = 60.19^\circ\text{C}$$

Cela situe donc la température idéale d'hybridation entre 35.19°C et 40.19°C. En hybridant à la température de 37°C, nous sommes dans des conditions d'hybridation optimales. Nous écartons l'hypothèse 3.

III.1.4. *Hypothèse 4: Concentration en sonde insuffisante*

Dans l'HIS 3, la concentration en sonde est élevée à 1000ng/mL, ce qui correspond à la limite supérieure de la gamme de concentrations conseillées par GeneDetect. A la concentration de 1000ng/mL, il n'apparaît pas de signal seulement un bruit de fond plus intense. Nous écartons donc l'hypothèse 4.

III.1.5. *Hypothèse 5: Sensibilité de la méthode de détection*

L'une des limites principales à l'utilisation d'oligonucléotides non radioactifs est leur faible sensibilité.

D'après les HIS réalisées avec les sondes poly dT, la méthode de détection semble suffisamment sensible car nous obtenons un signal. Cependant, dans ce cas, la cible correspond à l'ensemble des ARNm du tissu. Le nombre de copies est donc particulièrement élevé, plus élevé que le nombre de copies d'ARNm GFAP. La sensibilité de la méthode de détection dans ce contexte n'est donc pas vraiment révélatrice de la sensibilité générale de la méthode lors de la localisation d'un faible nombre d'hybrides.

Cependant, l'ARNm GFAP est connu pour être exprimé en grande quantité dans le tissu nerveux central et même sur-exprimé dans le noyau d'un nerf ayant subi une axotomie (Graeber et Kreutzberg, 1986). Il semble donc que le nombre de copies soit moyen à élevé. Dans le but de confirmer la présence abondante en GFAP dans nos tissus, nous réalisons une détection de GFAP par immunocytochimie. Les résultats sont positifs et confirment la présence abondante de la protéine. Même s'il faut prendre en compte le décalage possible entre la quantité en ARNm et en protéine, il est possible d'admettre que nos tissus renferment un niveau moyen d'ARNm GFAP potentiellement détectable.

Même si le nombre de copies en ARNm GFAP semble suffisant pour être détecté par notre méthode, il n'est pas impossible d'exclure l'hypothèse 5.

Enfin, d'après les résultats des coupes hybridées avec la sonde poly dT lors de l'HIS 8, le marquage DIG donne un signal plus intense qu'avec la FITC.

III.1.6. *Hypothèse 6 : Absence de spécificité de la sonde*

Au vu des premiers résultats, la spécificité de la sonde a été vite soupçonnée. S'ajoutait à ça le fait que les sondes étaient stockées depuis plus de deux ans alors que la limite de stabilité est de 3 ans.

Il a donc été décidé d'acquérir de nouvelles sondes.

Malgré l'absence de signal net, il semble qu'il y ait une coloration non négligeable des neurones, ceci laissant penser que les sondes se lient de manière non spécifique à des ARNm neuronaux.

La séquence utilisée pour la synthèse des sondes GFAP a été prélevée dans la littérature (Hinks et Franklin, 1999) par Genedetect. Genedetect ne teste pas la séquence de la sonde dans ses laboratoires avant sa synthèse mais effectue seulement une recherche BLAST pour vérifier l'absence d'homologie de cette sonde avec le reste du génome de rat.

L'hypothèse 6 peut donc être retenue.

III.2. Bruit de fond

Un bruit de fond uniforme, constant et soutenu est dans la plupart des cas dû à la non spécificité des liaisons des sondes. Ceci rejoint l'hypothèse que la séquence de la sonde ne cible pas les ARNm GFAP.

Le bruit de fond peut également être dû à la non efficacité des étapes conçues pour bloquer les sites non spécifiques avant la détection par les anticorps. Ceci peut être amélioré en augmentant la concentration en sérum dans la solution bloquante.

IV. Perspectives

Dans le but d'obtenir une méthode efficace, il faut éprouver nos hypothèses.

IV.1. Qualité de la méthode

Après enquête auprès du personnel scientifique de Genedetect, il a été établi que les sondes ne sont pas testées dans les laboratoires de la compagnie. Les chercheurs de Genedetect s'appuient sur les résultats publiés dans la littérature, vérifient la séquence par une recherche BLAST et synthétisent les oligonucléotides. A aucun moment, les sondes ne sont testées *in situ*.

Ainsi, il semble intéressant de tester notre méthode, et en particulier notre méthode de détection, avec une sonde contrôle utilisée en routine par le laboratoire Genedetect pour valider ses protocoles. Dans cet optique, la sonde β -actine a été achetée auprès de Genedetect. β -actine est une protéine exprimée de manière ubiquitaire dans toutes les cellules eucaryotes comme composant du cytosquelette. La sonde β -actine est donc une sonde idéale comme contrôle positif et est vendue en tant que telle pour contrôler tous les tissus, dans toutes les espèces.

Le manque de temps pour mettre au point une expérience avec la sonde β -actine n'a pas permis d'obtenir des résultats. Cependant on peut formuler les hypothèses suivantes.

- Dans l'hypothèse, assez improbable, où la détection de β -actine est négative, cela indique que l'un des paramètres de la méthode ne permet pas l'hybridation des sondes à la cible ou que les hybrides formés ne sont pas détectés. L'éventuelle négativité des résultats avec la sonde β -actine n'est pas en contradiction avec la positivité des résultats obtenus avec la sonde poly dT, cette dernière détectant tous les ARNm du tissu ne rend pas compte de la sensibilité du protocole. Dans ce cas, il conviendrait donc d'optimiser la méthode pour obtenir le signal attendu. Il est en effet plus facile de mettre au point la méthode avec β -actine qui est un messager ubiquitaire et donc plus abondant que GFAP.
- Dans le cas où la détection de β -actine est positive, cela confirme que la méthode utilisée permet la détection des ARNm. Il reste donc deux hypothèses pour expliquer la non détection des ARNm GFAP avec la même méthode :
 1. La méthode de détection n'est pas assez sensible pour la détection des ARNm GFAP moins abondants que les ARNm β -actine.
 2. L'hybridation des sondes GFAP n'est pas possible car la séquence de la sonde ne permet pas son hybridation à la cible.

Il convient donc de discuter ces deux nouvelles hypothèses.

IV.2. Sensibilité de la méthode :

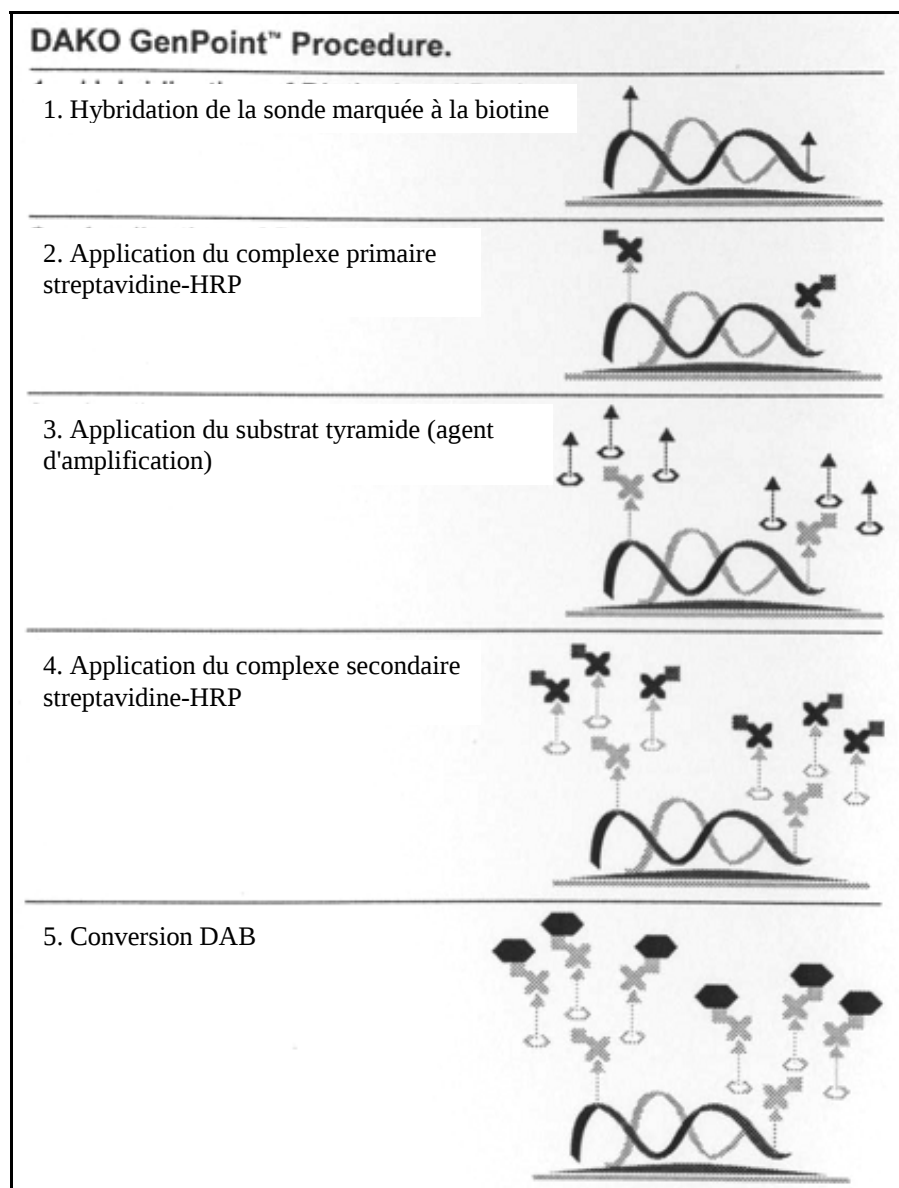
Pour augmenter les chances de détecter les hybrides formés, on peut remplacer la dernière étape NBT-BCIP par la méthode appelée "Tyramide Signal Amplification" (Figure 22). Cette méthode de détection repose sur l'activité catalytique de l'enzyme peroxydase de raifort (PR) pour générer un marquage haute densité de la cible. Elle permet, comme son nom l'indique, d'augmenter la sensibilité de la détection en ajoutant une étape supplémentaire d'amplification du signal par dépôt de nombreux résidus tyramides. Cette méthode de détection est plus sensible que les protocoles classique d'HIS et permet d'obtenir un bien meilleur rapport signal/bruit de fond (Schad *et al.* , 2003). C'est donc un outil particulièrement intéressant dans le cas de la détection d'un nombre faible d'hybrides. Son principe (Figure 18) repose sur une double (minimum) amplification du signal :

1. Hybridation avec les sondes marquées par DIG.
2. Application de l'anticorps anti-DIG conjugué à l'enzyme peroxydase de raifort (PR). Liaison de l'anticorps anti-DIG à l'haptène DIG.



3. Etape d'amplification du signal : application du substrat tyramide-biotine, agent amplificateur. Oxydation du substrat tyramide-biotine par PR. Cette réaction engendre le dépôt de nombreux groupements biotine au niveau du site d'hybridation.
4. Application de la streptavidine, conjuguée à PR, qui se lie aux résidus biotine.
5. Développement du signal par ajout de diaminobenzidine (DAB). Le substrat DAB est oxydé par l'enzyme peroxydase de raifort et produit un précipité marron au niveau du site d'hybridation.

Figure 22 Principe du système de détection "TSA"
(D'après DAKO GenPoint)



L'étape 3 peut être répétée plusieurs fois pour optimiser le phénomène d'amplification avant de développer le signal (étape 5).

IV.3. Synthèse d'une nouvelle sonde

S'il s'avère que la méthode de détection n'est pas responsable de la difficulté d'obtenir un signal, il faut envisager l'hypothèse 6 : la séquence de la sonde n'est pas spécifique des ARNm GFAP. En effet, Genedetect n'a pas testé la sonde dans ses laboratoires. Il est donc tout à fait cohérent comme dernière hypothèse de mettre en doute la validité de la séquence de la sonde GFAP.

On doit alors reproduire les expériences d'HIS avec une nouvelle sonde de séquence différente. La détermination d'une séquence adéquate et spécifique des ARNm GFAP peut être faite à partir du logiciel Oligo 6 (Oligo, EU.) Ce logiciel est déjà utilisé au laboratoire pour la conception d'amorces spécifiques utilisées pour les PCR et permet également la détermination d'une séquence d'oligonucléotides spécifiques de l'ARNm cible.

Seulement après l'obtention de résultats positifs avec une nouvelle sonde GFAP, utilisée ici comme contrôle, on pourra valider et affiner cette méthode par la détection d'une autre cible. Par exemple, une cible dont le nombre de copies d'ARNm est plus faible et dont la localisation est limitée à une région précise du cerveau (ex: tyrosine hydroxylase). Ce n'est qu'à la suite de ces deux étapes que la méthode sera extrapolée à des tissus humains et appliquée à la localisation d'ARNm d'intérêt dans la maladie de Parkinson.

IV.4. Validation des résultats des microarrays

Dans notre projet global, la technique d'HIS est un outil essentiel. En effet, après avoir déterminé un pool de gènes d'intérêt par microarrays impliqués dans des voies clefs du développement de la maladie de Parkinson, il s'avère très important de pouvoir localiser le lieu d'expression de ces gènes. L'HIS va ainsi permettre d'identifier les types cellulaires impliqués et associés à la sur-expression ou la sous-expression de ces gènes d'intérêt.

Malgré l'échec de l'HIS jusqu'à présent comme méthode de validation des résultats par localisation de l'expression des gènes, il reste néanmoins indispensable de valider les résultats obtenus par les analyses microarrays. En effet, les microarrays permettent une mesure et une visualisation rapide de l'expression différentielle entre les génomes à l'échelle du génome entier (www.transcriptome.ens.fr). Il est ensuite nécessaire de valider le profil d'expression des gènes candidats retenus à la suite des microarrays à l'échelle cellulaire.

A l'heure actuelle, la réaction d'amplification en chaîne par la polymérase (PCR) en temps réel est devenue la méthode de choix pour la quantification d'ARNm et pour la validation des

résultats d'analyses de microarrays. Elle permet une analyse rapide de l'expression des gènes à partir de quantités initiales faibles de séquences cibles (Peirson *et al.*, 2003).

Dans notre cas, il sera nécessaire d'ajouter une étape supplémentaire et de faire une RT-PCR, c'est-à-dire de passer d'un support ARN à ADN grâce à l'enzyme Reverse Transcriptase (RT), avant de pouvoir effectuer la PCR en temps réel.

Chaque gène candidat, c'est-à-dire identifié comme gène potentiellement impliqué dans la pathologie de MP à la suite des résultats des microarrays, subit une PCR en temps réel pour permettre de valider si la relative expression observée dans les microarrays est fiable et retrouvée par des expériences de PCR.

Ainsi, même si la PCR en temps réel trouve sa place dans le protocole de validation comme outil de quantification des transcrits, celle-ci ne remplace pas la nécessité de préciser les types cellulaires concernés. Le succès de la mise au point de la méthode d'HIS devient alors capital pour appuyer ces résultats par la localisation *in situ* des gènes d'intérêt.

CONCLUSION

La mise au point de cette méthode d'hybridation *in situ*, inscrite dans un projet global dont le but est de déterminer les gènes aux rôles critiques dans la maladie de Parkinson, est une étape essentielle pour la localisation de ces gènes.

La technique d'HIS, bien qu'étant en constante évolution et progression, reste toujours une méthode très délicate. En outre, l'établissement d'une nouvelle méthode est toujours un processus long et fastidieux au vu des nombreux paramètres en jeu et de la singularité de chacune des sondes.

Dans notre cas, nous n'avons pas réussi à obtenir des résultats satisfaisants et l'établissement de la méthode reste toujours en cours. Cependant, au vu des résultats et conclusions, il semble très probable que cette méthode soit validée rapidement. Une fois mise au point sur cerveaux de rats, cette méthode devra rapidement être extrapolée à des tissus humains pour être ainsi utilisable dans la localisation des gènes identifiés comme fondamentaux dans le développement de la maladie de Parkinson.

La mise en évidence de ces gènes permettra une meilleure compréhension de l'implication des facteurs génétiques dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson et ainsi une meilleure approche thérapeutique.

ANNEXES

ANNEXE A

Résultat de la recherche BLAST pour la séquence de la sonde GFAP antisens

BLAST result:

ANNEXE B

Protocole d'hybridation *in situ*

IN SITU HYBRIDISATION PROTOCOL
using DIGOXIN (DIG)-labelled OLIGONUCLEOTIDES PROBES

Introduction: Probe Labelling

▪ Probes synthesised by GeneDetect, New Zealand:

- Anti-sense and sense oligonucleotides sequences specific for rat GFAP (Glial Fibrillary Acidic protein expressed in all brain cells)
- Poly dT (for tissue's control)

▪ Probe concentration available:

- Antisense 10ng/μL (enough antisense for 20mL hybridisation buffer)
- Sense 10ng/μL
- Poly dT 10ng/μL (warning: change temperature of hybridisation and post-hybridisation washes, don't add poly A in the hybridisation buffer)

▪ Probe's length: 45bp

▪ % GC content: 58%

▪ Melting Temperature: 94°C

▪ Probes are labelled with multiple molecules of DIGOXIN attached to the 3' end of the probe with DIG- GreenStar™.

Subbing slides:

For this protocol, slides were cut on Superfrost slides from BDH, already coated.

Preparation of Tissue Sections: Sectioning and Prehybridisation treatments

Available: frozen rat brains: facial nuclei and striatum.

Fresh tissue should be rapidly removed from the animal and placed on aluminium foil. Snap freeze the tissue by immediately placing it into a -70°C freezer.

Cut cryostat sections (usually 12 micrometers for brain) onto Superfrost Plus slides (BDH). Make sure you wipe the blade as well as the plastic guide or any material with ethanol 70% made in DEPC water or RNase Zap from SIGMA. Air-dry sections once cut for 15 to 20 minutes at RT. Do not leave sections an excessive time at room temperature, not more than twenty minutes.

Store sections at 4°C during the day. Alternatively for long-term storage, store fresh frozen tissue or sections at -70 °C.

ISH steps

Pretreatments of slides

If tissues are unfixed, remove your slides containing the tissue sections from the -70°C freezer and **immediately place sections into cold (4°C) 4% paraformaldehyde 0.1M phosphate buffer pH7.4.**

Fix for 10 min.

Dip the sections in the solution straight away after getting them from the freezer; DO NOT let your tissue come to room temperature/defrost before fixing.

PFA should be made up within the last 7 days and stored at 4°C.

Wash and dehydration step

3 x 5 min	1M PBS
1 x 5 min	100% EtOH

Use DEPC treated PB and DEPC water to make up all of the above solutions.

Air dry slides

At this point, tissue RNA is reasonably safe from RNAases and the following steps only require that sterile, autoclaved solutions be used. DEPC-treatment of solutions is not required but use of autoclaved dH₂O and glassware

Hybridisation (optimised for 34mer oligonucleotides – 18 G & C content)

-Bring hybridisation buffer to 37° C. Hybridisation buffer can be kept about 6 weeks at -20°C.

-Add the probes to the HB:

Vortex the solutions containing the probes for few seconds as the probes might precipitate and then centrifuge if drops of probes are spread in the container.

Resuspend probe in (?) mL hybridisation buffer:

The optimal amount of probe needed is usually within the range 100-1000ng/mL of hybridisation buffer with 200ng/mL a good starting concentration.

Once the probes are added, mix well by hand to ensure even probe dispersal and vortex as well.

-Hybridisation of tissue section with probe:

On the air-dried slides, carefully overlay each tissue section with well-mixed hybridisation buffer containing probe.

Apply about 100-120 µl of hybridisation buffer per slide, depending on the space between each section (20 slides can be made with the 2mL buffer).

Cover sections with a piece of Parafilm (manipulate with tweezers and scissors wiped with RNAase Zap from SIGMA); make sure you don't get any air bubbles trapped between the sections and the Parafilm.

Incubate your slides in a sealed hybridisation chamber at 37°C overnight (about 18 hours) by putting the lid on the container and carefully placing it in an oven set at 37°C. Plastic Tupperware containers can be used as good ISH chambers: lay a wet tissue at the bottom of the box, then place a plastic board on top of it on which you put your sections. Dampen the tissue with 4xSSC and make sure there's no "free liquid" left in the box.

Warning: keep your slides level, avoid thus to let hybridisation buffer running off the section and tissue sections dry overnight and to have high background staining.

Post Hybridisation Washes

At the end of hybridisation, remove the Parafilm from sections using forceps/tweezers before tipping off the hybridisation buffer and putting the slides in washing solutions.

Wash:

Quick wash	1xSSC RT in a Coplin jar
2 x 15 min	1xSSC at ? °C in a square glassware with plastic rack
2 x 15 min	0. 5xSSC at ? °C in a square glassware with plastic rack
1 x 10 min	0. 5xSSC at RT in a Coplin jar

Slides remain in the last wash solution until the next step.

NB: SSC solutions should be made fresh on the day of use, practically, they can be made the day before.

Detection:

Indirect detection is made using a sheep Anti-Digoxigénine Fab Fragments antibody conjugated to the enzyme alkaline phosphatase (Anti-Digoxigénine-AP Fab fragments; Roche, Cat#1093274) for moderately expressed mRNAs.

We then use the NBT/BCIP Ready to use tablets (1 697 471 from Roche).

1. Wash sections 3 x 5 min in TBS in a Coplin Jar.

(TBS should be made on the day of use.)

2. OPTIONNAL: Cover sections for 30 min with blocking solution (TBS + 0. 1% Triton X-100 + 1% normal sheep serum).

Hint: Small antibody aggregates in the Anti-DIG-AP may lead to higher background staining. It is therefore suggested that the vial be centrifuged for 5 min at 13,000 rpm before its first use. Thereafter, it is sufficient to centrifuge for 1 min directly before dilution.

3. Pour off blocking solution; wipe the back and the sides of the sections to make sure the antibody won't be diluted.

Apply pap pen around the sections to prevent leakage of the AB solution, make sure the slide is dry when applying pap pen.

Apply 220µL of the AB solution per slide and incubate for 4 hr minimum at room temperature with Anti-Digoxigénine Fab Fragments antibody diluted in TBS + 0. 1% Triton X-100 + 1% normal goat serum.

NB: 1:200 initial recommended dilution according to Greenstar.

The AB should be left in the solution at RT for 30 minutes before dropping it on the slides (to avoid non specific binding).

Put the slides flat in a plastic box, make sure it is very flat and it has a small air volume to avoid the slides to dry out and get lots of background.

4. Wash sections 3x5 min in TBS in a Coplin Jar

Remove the pap pen marks with a tissue

5. Dissolve 3 NBT/BCIP ready to use tablet from Roche in 30mL of dH₂O to make 30 mL of staining solution.

6. OPTIONNAL: Add 10µL of stock 1M levamisole solution per 10 mL staining solution (1 mM levamisole). For convenience prepare a 1M stock solution in dH₂O which will be stable at 4°C for several weeks.

7. Incubate sections in a vertical position in a Coplin jar with the staining solution.

Seal the jar airtight with adhesive tape or parafilm to prevent non-specific oxidation of the substrate and precipitate formation.

Cover with aluminium foil because the reactions must occur in the dark. A blue precipitate will form. The development time will depend on numerous factors but it is usually between several minutes for high abundance to several hours or even overnight for low-level mRNAs.

So far, 6 hours seem to be enough but not feasible with the experiment timetable.

8. Stop the reactions by rinsing the slides several times in tap water 3x5 min at RT.

9. Finally rinse in dH₂O (dip them briefly)

10. Let the slides air-dry

11. Mount slides with water-soluble mounting medium: *VecatMount* (do not use xylene-based mounting medium) or optionally counter stain the sections.

Following dehydration and clearing of the tissue section on a slide, dispense a small amount of *VectaMount* on or adjacent to the section using a plastic dropper. As the coverslip applied, the medium will disperse over the entire coverslipped area.

Allow the preparation to dry. This may take one to several hours, depending on the temperature, humidity, type of clearing agent used, and amount of mounting medium applied. Incubating the slide in 60°C to 75°C oven for 15 to 30 minutes can accelerate drying. Allow the slides to cool before storage.

Controls

1. Controls for tissue mRNA quality and the efficacy of your protocol

If controls are negative on fresh tissues, this suggests a problem with technique or protocol.

2. Poly dT probes

Poly dT detects total mRNA poly A tails. If a very weak signal is obtained using this probe it is likely due to the tissue RNA being degraded.

3. Determine that the probe is only binding to RNA

Using RNAases treatment of sections before labelled antisense probe hybridised.

4. Specific versus non-specific binding

A- Hybridisation of the tissue with both labelled sense and antisense probes in parallel

The antisense probe detects both the target mRNA and any non-specific targets it can bind to due to the chemical properties of the probe (but not due to the probe's sequence).

The sense control probe gives a measure of non-specific probe binding only due to the chemical properties of the probe.

B- Competition studies

Competition studies with labelled probes and excess of unlabeled probes can also help distinguish between specific versus non-specific binding.

APPENDIX: BUFFERS AND OTHER SOLUTIONS

All glassware, plasticware, pipette tips etc., should be autoclaved.

If the purchases of salts, buffers and the like are made from suppliers, use Molecular Biology grade products.

1. Hybridisation buffer (prepare in 50mL Falcon tube with screw cap, store at -20°C).

To make 20 mL.

4 mL	20xSSC	
10 mL	Deionised formamide	50%
4 g	50% Dextran sulphate (Pharmacia Biotech 17-0340-01)	10%

Add these all together then heat it up at 65°C in the oven for about 1 hour, shaking the buffer regularly allowing the Dextran Sulphate to dissolve.

Then add aliquots of the following (stored at -20°C) once the buffer has cooled down.

0. 2mL	50 x Denhardt's solution (Sigma stock 50 x D2532)
0. 5 mL	Poly A ⁺ (Sigma P-9403); 10mg/mL stock
0. 5 mL	Sheared salmon sperm DNA, 10mg/mL. (Boehringer)
0. 5 mL	tRNA (Sigma) 10mg/mL
2 mL	DTT (of 1 M stock solution)

Mix VERY well before use, vortex if possible.

The hybridisation buffer can be pre-made and stored long-term at -20°C .

All other chemicals are stored as stock solutions in the -20°C freezer, except for the 20xSSC.

2. Phosphate buffered saline (PBS) 10X (stock solution-shelf)

To make PBS (10X)

For 1 litre: in one litre DEPC water add:

90g	NaCl
1. 65g	Potassium dihydrogen orthophosphate
19. 527	Disodium hydrogen orthophosphate dodecahydrate

Check pH is 7. 4 and adjust with strong NaOH. Add 1mL of DEPC and autoclave overnight.

3. Standard saline citrate (SSC) (stock solution – shelf)

To make 20xSSC, add

175.3g	NaCl
88.2g	Tri-sodium citrate

in 800 mL of DEPC water and pH to 7 with 10% HCl. Then make up to final volume with DEPC water.

Add 1mL of DEPC and autoclave overnight.

For this run of experiments, we are also using 20xSSC made by Fluka

4. Deionised formamide (stock solution-fridge)

Add one litre of formamide (Sigma F7503) to 100 g of mixed bed resin TMD-8 (Sigma M8157).

Filter in a sterile funnel with a paper filter and aliquot at 25 mL (to be stored at -20°C). Can be kept in the fridge for 2 weeks.

In this experiment, the deionised formamide used in the HB has been bought from SIGMA

5. Tris-buffered saline TBS (make fresh)

To make 500 mL of TBS,

In a 500 mL autoclaved becher, pour about 400 mL of autoclaved Purite water, place on a stir plate with a magnetic flea, and add then;

- 7.88g of Tris-HCL (100mM Tris HCL)

- 4.38g of NaCl 9150mM NaCl)

Adjust to pH 7.5 with 2M NaOH. Pour in 500mL volumetric flask and make up volume to 500mL.

6. Blocking solution (make fresh)

To make about 25 mL of blocking solution (volume of Coplin Jar),

Pour in a universal,

- 19.975 mL of TBS

- 5 mL of normal sheep serum (20% normal goat serum) 0.1% Triton X-100

- 25microL of Triton-X-100 (0.1% Triton X-100)

This last chemical can precipitate; so make sure you shake the solution to dissolve it.

7. Antibody binding solution (make fresh)

Anti-Digoxigénine Fab Fragments antibody diluted (1:200) in TBS + 0.1% Triton X-100 + 1% normal goat serum.

To make about 3 mL (enough for 10 slides), in bijoux, add in the following order:

- 2.955 mL of TBS
- 15 µL of antibody
- 30 µL of goat serum
- 3 µL of Triton-X-100

8. Staining solution (make fresh).

Dissolve one NBT/BCIP ready to use tablet from Roche in 10 mL of dH₂O

Add 10 µL of stock 1M levamisole solution per 10 mL staining solution. Keep this solution in the dark if not use straight away.

9. Ethanol (70-80-95%) (Stock solution-shelf)

Use pure ethanol and DEPC water to make them.

10. Paraformaldehyde 4% in PB (make fresh)

It should be made fresh on the day of hybridisation. All the following work should be proceeded under the fumehood.

To make 200mL of PF

Pour 100mL (measured in measuring cylinder) of DEPC water in a 200 mL autoclaved becher,

- Add 8g of PF (kept in the fridge), use an autoclaved spatula.
- Heat the solution to 50°C. When this temperature is reached, add few drops of 2M NaOH to make the solution as clear as water.
- Heat up to 60°C
- Remove from the hotplate.
- Add 100 mL of 0.1M PB
- Filter in an autoclaved funnel
- Cool on ice. When it has reached RT, check and adjust pH if needed between 7.2/7.4
- Store in the fridge until used

11. 1xPBS

1xPBS should be made fresh on the day of use with 10xPBS and DEPC water.

12. SSC solutions

All the SSC solutions for the post-hybridisation washes should be made freshly (day before is OK) with Purite water and 20xSSC.

13. DEPC water

Take the desired amount of Purite water and autoclave it overnight.

Work under the fumehood; add 1mL of DEPC per litre of autoclaved Purite water. Use a measuring cylinder to get the 1mL. Shake the bottle vigorously to ensure the DEPC mixes thoroughly. The water is then placed in the incubator at 37°C for 4 hours before autoclaving overnight.

We are using manufactured DEPC water from Fluka as well.

14. Denhardt's solution

Make aliquots of 450 µL of the solution in Eppendorf tubes. Aliquots should be stored at -20°C.

15. Sodium Acetate (0.01M)

Add 82mg of sodium acetate to 100mL of DEPC water. Allow to dissolve, then pH to 5.2 using 10% HCl. DEPC then autoclave.

16. DTT

Dissolve DTT (154.2 mg/mL) in 0.01M sodium acetate (pH 5.2). In 5 mL of sodium acetate, add 771mg of DTT. Filter the solution through sterile 0.2µm filter using a sterile syringe. Store in 20 µL aliquots at -20°C.

17. Salmon sperm DNA

Dissolve 50mg of DNA in 5mL DEPC water. Shear DNA by pulling it through a 19 gauge needle 40-50 times. Boil for ten minutes and then store in 1 mL aliquots at -20°C. The aliquots should be boiled for 5-10 min directly before use

18. Yeast RNA

Store as 105 µL aliquots of 50mg/mL at -20°C.

ANNEXE C

Protocole d'immunocytochimie

UK PARKINSON'S DISEASE SOCIETY TISSUE BANK AT IMPERIAL COLLEGE LONDON

Standard Operating Procedure for Immunohistochemistry: Indirect Immunoperoxidase Method for Frozen Sections

Personal Protective Equipment

Wear lab coat and gloves at all times.

Method

1. For frozen sections, dip the slides in Ethanol 100% for 5 to 10 min at 4°C.
2. *Block* endogenous peroxidase activity in hydrogen peroxide/methanol (3mL 30% H_2O_2 in 300mL methanol; 30 minutes).
3. *Prepare* any solutions or reagents required for the pre-treatment step. See data sheet or Table 1.
4. *Dilute* primary antibody (mouse monoclonal anti GFAP antibody (SIGMA)) to working dilution with primary diluent (dilution of 1:1000). (If necessary, add normal serum from the appropriate species – in a 1:1 ratio with the antibody stock solution – to preabsorb the tissue and reduce background staining.)
5. *Wash* sections in tap water (3 x 5 minutes).
6. *Prepare* moist incubation chamber.
7. Wash in PBS (2 x 2 minutes, moving).
8. Dip in 10% horse serum in PBS for 10 min at RT
9. *Dry* around sections and back of slides. Apply *pap pen* around the sections to prevent leakage of the antibody solution. Place slides in a moist incubation chamber.
10. *Incubate* with primary antibody (*overnight at 4°C*). (Use the minimum amount of antibody solution necessary to completely cover the section. This is generally between 100 and 200µl, but for smaller sections 50µl may be sufficient.) Take care not to let the sections dry out.
11. Wash in PBS (3 x 5 minutes).
12. Prepare secondary antibody (horse anti- mouse antibody) working solution (1:100 dilution with secondary diluent – see solutions section for composition).
13. *Incubate* with the appropriate biotinylated secondary antibody (*room temperature, 1 hour*).
For mouse monoclonal primary antibody use horse anti-mouse secondary.

14. *Prepare* third layer complex as follows:

- a. Make up at least 30 minutes before use
- b. Add Vectastain Elite reagents A and B to tertiary diluent (this is the same as the secondary diluent – see solutions section for composition).
- c. The final concentration is 1:200 with respect to each of the 2 reagents. (For example, add 5µl of A and B to 990µl tertiary diluent to make up 1mL of the complex.)
- d. Mix well and allow to stand on the bench for at least 30 minutes.

15. Wash sections in PBS (3 x 5 minutes)

16. Incubate with third layer complex (room temperature, 45 minutes to 1 hour)

17. Wash in PBS (3 x 5 minutes)

18. Prepare 3,3'-diaminobenzidine (DAB) solution: add 1 aliquot DAB and 16 drops hydrogen peroxide to 400mL PBS.

19. Incubate slides with DAB solution to visualise the antibody complexes (5 minutes). (Transfer waste DAB to the appropriate container for disposal.)

20. Wash in running water.

21. Lightly counterstain with haematoxylin (a few seconds, differentiate in 1% acid alcohol).

22. Dehydrate slides by serial passage through 70% IMS (briefly) followed by 2 changes of 100% IMS and 2 changes of Xylene.

23. Mount slides using DPX mountant.

Pretreatments:

Formic Acid

1. Immerse slides in 80% formic acid solution (8 minutes).
2. Wash in running water.

High Temperature Antigen Unmasking

1. Use only slide racks and containers suitable for microwaving (plastic, not glass or metal).
2. Immerse sections in the relevant unmasking solution (e. g. , EDTA or citrate buffer – check for the antibody in question).
3. Microwave sections (medium (40%), 10 minutes, followed by medium high (70%), 10 minutes).
4. Remove from microwave and place in a sink of cold water to cool the solution and slides down (at least 20 minutes).

Protease K Treatment

Incubate slides with 100µg/mL protease K in Tris-HCl or PBS (10 minutes; 37°C).

Solutions

Citrate buffer

2. 1g sodium citrate

1l distilled H₂O

pH 6

DAB

1. *Stock solution:*

5g DAB powder

200mL distilled H₂O

Store 4mL aliquots of this solution at –20°C.

Always prepare in the fume hood and wear PPE – see risk assessment.

2. *Working solution:*

1 aliquot of DAB

400mL PBS

16 drops 30% H₂O₂

Diluent: primary antibody

490mL PBS

1.5mL Triton X-100

1.5g sodium azide

10mL normal animal serum from secondary antibody host (horse serum for monoclonal antibody; goat serum for polyclonal antibody)

Store at 4°C (should keep for some time)

Diluent: secondary antibody

500mL PBS

1.5mL Triton-X-100

Diluent: tertiary complex

500mL

1.5mL Triton-X-100

EDTA

0.3722g EDTA

1L distilled H₂O

pH 8

Protease K solution

Protease K (100µg/mL; Roche Molecular Biochemicals)

50mM Tris-HCl buffer (pH 7. 4) containing 5mM EDTA

Table 1: Specificities, dilutions and pretreatments for selected primary antibodies

Antibody	Specificity	Type	Dilution	Pretreatment
NCL-ASYN	h α -syn	mouse mAb	1:20 to 1:40	HT Ag-unmasking with EDTA
NCL-tau-2	hTau	mouse mAb	1:50 to 1:100	HT Ag-unmasking with EDTA
NCL-B-Amyloid	h β -amyloid	mouse mAb	1:50	Formic acid
NCL-UBIQm	hUbiquitin	mouse mAb	1:25 to 1:50	None
LB509	h α -syn	mouse mAb	1:500	HT Ag-unmasking with EDTA <i>or</i> citrate
SYN303	ox α -syn	mouse mAb	1:250	Formic acid, protease K or HT Ag-unmasking with citrate.
SYN514	ox α -syn	mouse mAb	?	Formic acid, protease K or HT Ag-unmasking with citrate.
PHF-6	PHFtau	mouse mAb	1:2000 to 1:20000	None
PHF-1	PHFtau	mouse mAb	1:500 to 1:2000	Formic acid
nSyn14	n α -syn	mouse mAb	?	?
nSyn808	n α -syn	mouse mAb	?	?
CR3/43	hHLA-DP, DQ, DR	mouse mAb	1:50 to 1:100	HT Ag-unmasking with citrate <i>or</i> EDTA

ABREVIATIONS

6-OHDA	6-hydroxydopamine
A	Adénosine
α Sn	α -synucléine
A2a	Récepteur spécifique de l'adénosine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNmt	Acide désoxyribonucléique mitochondrial
AP	Alcaline phosphatase
AR-JP	Parkinsonisme juvénile autosomique récessif
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AS	Antisens
ATP	Adénosine triphosphate
C	Cytidine
°C	Degré(s) Celsius
CL	Corps de Lewy
COMT	Catéchol-o-méthyl transférase
CSN	Cellules souches neuronales
DAB	Diaminobenzidine
DAT	Transporteur de la dopamine
DEPC	Pyrocarbonate de diéthyle
DIG	Digoxigénine
DOPA	Désoxyphénylalanine
DTT	Dichloro-diphényl-trichloroéthane
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
G	Guanosine
GFAP	Glial Fibrillary Acid Protein
GPO	Glutathion peroxidase
GR	Glutathion réductase
GSSG	Glutathion oxydé
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HCl	Acide chlorhydrique

HIS	Hybridation <i>in situ</i>
IgG	Immunoglobuline G
K	Potassium
L-DOPA	Lévopoda
M	Mole
MAO-B	Monoamine oxydase B
min	Minute(s)
mL	Millilitre
MP	La Maladie de Parkinson
MPP ⁺	1-méthyl-4-phénylpyridinium
MPTP	1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
Na	Sodium
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucleotide
NBT/BCIP	Nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
ng	Nanogramme(s)
nm	Nanomètre(s)
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
pb	Paire de Base
PDS	Parkinson Disease Society
PFA	Paraformaldéhyde
PR	Peroxidase de raifort
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SN	Substance noire
SNc	Partie compacte de la substance noire
SNr	Partie réticulaire de la substance noire
SOD	Superoxide dismutase
SSC	Solution saline de citrate
SUP	Système de l'ubiquitine-protéasome
T	Thymidine
TA	Température ambiante
TBS	Tris-buffered saline
U	Uracile
UCH-L1	Ubiquitine carboxy-terminal hydrolase L1
µm	Micromètre

BIBLIOGRAPHIE

- 1-Ambion. *Ambion The RNA company* [en ligne], Mise à jour le 18 Août 2003 [http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_180.html], (consulté le 18 Août 2003).
- 2-BETARBET R, SHERER TB, MACKENZIE G, GARCIA-OSUNA M, PANOVA AV, GREENAMYRE JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* , 2000, **3**, 1301-1306.
- 3-BETARBET R, SHERER TB, DI MONTE DA, GREENAMYRE JT. Mechanistic Approaches to Parkinson's Disease Pathogenesis. *Brain Pathol.* , 2002, **12**, 499-510.
- 4-BOWERS WJ, MAGUIRE-ZEISS KA, HARVEY BK, FEDEROFF HJ. Gene therapeutic approaches to the treatment of Parkinson's disease. *Clin. Neurosci. Res.* , 2001, **1**, 483-495.
- 5-CAMBIER J, MASSON M, DEHEN H. *Abrégés de Neurologie*. 10^{ème} ed. Paris: Masson, 2000, 112p.
- 6-CIECHANOVER A. The ubiquitin-proteasome pathway : on protein death and cell life. *EMBO J.* , 1998, **17**, 7151-7160.
- 7-DEV KK, VAN DER PUTTEN H, SOMMER B, ROVELLI G. Part I: parkin-associated proteins and Parkinson's disease. *Neuropharmacology.* , 2002, **45**, 1-13.
- 8-DEV KK, HOFELE K, BARBIERI S, BUCHMAN VL, VAN DER PUTTEN H. Part II: α -synuclein and its molecular pathophysiological role in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology.* , 2002, **45**, 14-44.
- 9-DICKSON DW. Neuropathology of parkinsonian disorders In: JANKOVIC JJ, TOLOSA E, editors. *Parkinson's Disease & Movement Disorders*. 4th ed. Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkins, 2002, 256-269.
- 10-ENS. *ENS transcriptome platform web site* [en ligne], Mise à jour le 30 mai 2003 [<http://www.transcriptome.ens.fr/sgdb/presentation/principe.php>], (consulté le 2 novembre 2003).
- 11-ESCOUROLLE R, POIRIER J. *Manuel élémentaire de neuropathologie*. 1^{ère} ed. Masson: Paris, 1977, 432p.
- 12-FORNAI F, LENZI P, GESI M, FERRUCCI M, LAZZERI G, NATALE G, RUGGIER PAPARELLI A. Recent knowledge on molecular components of Lewy bodies discloses future therapeutic strategies in Parkinson's disease. *Curr. Drug Target CNS Neurol. Disord.* , 2003, **2**, 149-152.
- 13-GASSER T. Genetics of Parkinson's disease. *J. Neurol.* , 2001, **248**, 833-840.
- 14-GASSER T. Genetics of Parkinsonism. In: JANKOVIC JJ, TOLOSA E, editors. *Parkinson's Disease & Movement Disorders*. 4th ed. Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkins, 2002, 566-575.

- 15-Genedetect. *Genedetect. com* [en ligne], Mise à jour le 1er février 2003 [http://www.genedetect.com/Merchant2/merchant.mv?Screen=CTGY&Store_Code=GL&Category_Code=Oligos#Labeling1], (consulté le 18 février 2003).
- 16-GOMES FC, PAULIN D, MOURA NETO V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocytes differentiation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* , 1999, **32**(5), 619-31.
- 17-GRAEBER MB, KREUTZBERG GW. Astrocytes increase in glial fibrillary acidic protein during retrograde changes of facial motor neurones. *J. Neurocytol.* , 1986, **15**, 363-373.
- 18-GRAEBER MB, GRASBON-FRODL E, ABELL-ALEFF P, KOSEL S. Nigral neurons are likely to die of a mechanism other than classical apoptosis in Parkinson's disease. *Parkinsonism. Relat. Disord.* , 1999, **5**, 187-192.
- 19-GRITTI A, PARATI EA, COVA L, FROLICHSTHAL P, GALLI R, WANKE E, FARAVELLI L, MORASSUTTI DJ, ROISEN F, NICKEL DD, VESCOVI AL. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J. Neurosci.* , 1996, **16**, 1091-1100.
- 20-GUTTMAN M, KISH SJ, FURUKAWA Y. Current concepts in the diagnosis and management of Parkinson disease. *CMA*, 2003, **168**(3), 293-301.
- 21-HARDY J, COOKSON MR, SINGLETON A. Genes and parkinsonism. *Lancet Neurol.* , 2003, **2**, 221-228.
- 22-HINKS GL, FRANKLIN JM. Distinctive patterns of PDGF-A, FGF-2, IGF-I and TGF- β 1 Gene expression during remyelination of experimentally-induced spinal cord demyelination. *Mol. Cell. Neurosci.* , 1999, **14**, 153-168.
- 23-HOBSON DE. Clinical Manifestations of Parkinson's Disease and Parkinsonism. *Can. J. Neurol. Sci.* , 2003, **30**, Suppl. 1, S2-S9.
- 24-HOFLER H, MUELLER J, WERNER M. Principles of *in situ* hybridisation. In: POLAK JM, McGEE JO'D, editors. *In situ Hybridisation Principles and Practise*. 2nd ed. Oxford : Oxford Medical Publications, 1990, 1-19.
- 25-HUANG Z, FUENTE-FERNANDEZ R, STOESSL AJ. Etiology of Parkinson's Disease. *Can. J. Neurol. Sci.* , 2003, **30**, Suppl. 1, S10-S18.
- 26-JANKOVIC JJ. Therapeutic strategies in Parkinson's disease. In: JANKOVIC JJ, TOLOSA E, editors. *Parkinson's Disease & Movement Disorders*. 4th ed. Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkins, 2002, 116-151.
- 27-JENNER P. Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Ann. Neurol.* , 2003, **53**, Suppl. 3, S26-S38.
- 28-JOHE KK, HAZEL TG, MULLER T, DUGICH-DJORDJEVIC MM, MCKAY RD. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev.* , 1996, **10**, 3129-3140.

- 29-KITAMURA T, NAKANISHI K, WATANABE S, ENDO Y, FUJITA S. GFA-protein gene expression on the astroglia in cow and rat brains. *Brain Res.* , 1987, **423**, 189-195.
- 30-KOSEL S, HOFHAUS G, MAASSEN A, VIEREGGE P, GRAEBER MB. Role of Mitochondria in Parkinson Disease. *Biol. Chem.* , 1999, **380**, 865-870.
- 31-KRAUSS JK, GROSSMAN RG. Surgery for Parkinson's disease and hyperkinetic movement disorders. In: JANKOVIC JJ, TOLOSA E, editors. *Parkinson's Disease & Movement Disorders*. 4th ed. Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkins, 2002, 640-662.
- 32-Laboratoire de Cytogénétique et Génétique Moléculaire Humaine et laboratoire SESEP. Site du laboratoire de Cytogénétique et Génétique Moléculaire Humaine et laboratoire SESEP [en ligne], Mise à jour le 18 novembre 2003 [<http://www.sesep.uvsq.fr/formation/PCR.html>], (consulté le 2 novembre 2003).
- 33-LAI BCL, MARION SA, TESCHKE K, TSUI JKC. Occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease. *Parkinsonism. Relat. Disord.* , 2001, **8**, 297-309.
- 34-LANSBURY PT, BRICE A. Genetics of Parkinson's disease and biochemical studies of implicated gene products. *Curr. Opin. Cell. Biol.* , 2002, **14**, 653-660.
- 35-LAZAROV NE, SCHMIDT U, WANNER I, PILGRIM C. Mapping of D1 dopamine receptor mRNA by non-radioactive *in situ* hybridisation. *Histochem. Cell. Biol.* , 1998, **109**, 271-279.
- 36-LAZZARINI AM, MYERS RH, ZIMMERMAN TR, MARK MH, GOLBE LI, SAGE JI, JOHNSON WG, DUVOISIN RC. A clinical genetic study of Parkinson's disease: evidence for dominant transmission. *Neurology.* , 1994, **44**, 499-506.
- 37-LEITCH AR, SCHWARZACHER D, JACKSON D, LEITCH IJ. *In situ Hybridisation : A Practical Guide*. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited, 1994, 122p.
- 38-LEROY E *et al.* The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature*, 1998, **395**, 451-452.
- 39-McNAUGHT KS, OLANOW WC, HALLIWELL B, ISACSON O, JENNER P. Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* , 2001, **2**, 589-594.
- 40-MALHOTRA SK, SCHNITKA TK, ELBRINK J. Reactive astrocytes: a review. *J Cytobios.* , 1990, **61**, 133-160.
- 41-MARTIN WR, WIELER M. Treatment of Parkinson's disease. *Can. J. Neurol. Sci.* , 2003, **30**, Suppl 1, S27-S33.
- 42-Memorial University of Newfoundland. Site de Memorial University of Newfoundland [en ligne], Mise à jour le 18 octobre 2003 [http://www.mun.ca/biology/scarr/Principle_of_RT-PCR.html], (consulté le 2 novembre 2003).
- 43-MIS K, ZAJC-KREFT K, GRUBIC Z. Localization of cells expressing AChE mRNA in rat striatum using nonradioactive *in situ* hybridisation. *Chem. Biol. Interact.* , 1999, 119-120, 327-331.

- 44-MOREL G, CAVALIER A. *In situ Hybridisation in Light Microscopy*. Boca Raton, London, New York Washington, D. C. : CRC Press LLC, 2001, 327p.
- 45-MYTILINEOU C, COHEN G. Deprenyl protects dopamine neurons from the neurotoxic effect of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion. *J. Neurochem.* , 1985, **45**, 1951-1953.
- 46-NOLTE J. *The Human Brain: An Introduction to Its Functional Anatomy*. 5th ed. St Louis : Mosby, 2002, 650p.
- 47-ORTH M, SCHAPIRA AHV. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease. *Neurochem. Int.* , 2002, **40**, 533-541.
- 48-PALKOVITS M, BROWNSTEIN MJ. *Maps and guide to microdissection of the rat brain*. New York: Elsevier, 1988, 223p.
- 49-PARKINSON STUDY GROUP. Dopamine transporter brain imaging to assess the effects of pramipexole vs levopoda on Parkinson disease progression. *JAMA*, 2002, **287**, 1653-1661.
- 50-PEIRSON S, BUTLER JN, FOSTER RG. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res.* , 2003, **31**, e73.
- 51-PRITCHARD TC, ALLOWAY KD. *Neurosciences médicales : les bases neuroanatomiques et neurophysiologiques*. Paris : De Boeck Université, 2002, 526p.
- 52-RATTRAY M, MICHAEL GJ. Oligonucleotides probes for *in situ* hybridisation In: WILKINSON DG editor. *The theory and practise of In situ Hybridisation: A Practical Approach*, 2nd ed. Oxford, Oxford University Press, 1998, 23-67.
- 53-SCHAD A, FAHIMI HD, VOLKL A, BAUMGART E. Expression of catalase mRNA and protein in adult rat brain: detection by nonradioactive *in situ* hybridisation with signal amplification by catalyzed reporter deposition (ISH-CARD) and immunohistochemistry (IHC)/immunofluorescence (IF). *J. Histochem. Cytochem.* , 2003, **51**(6),751-60.
- 54-SCHAPIRA AH, COOPER JM, DEXTER D, CLARK JB, JENNER P, MARSDEN CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* , 1989, **54**, 823-827.
- 55-SHASTRY BS. Parkinson disease: etiology, pathogenesis and future of gene therapy. *Neurosci. Res.* , 2001, **41**, 5-12.
- 56-SPEEL E J. "Robert Feulgen Prize Lecture 1999" Detection and amplification systems for sensitive -target DNA and RNA *in situ* hybridisation: looking inside cells with a spectrum of colors. *Histochem. Cell. Biol.* , 1999, **112**, 89-1, multiple 13.
- 57-STORCH A, SCHWARZ J. Neural stem cells and Parkinson's disease. *J. Neurol.* , 2002, **249**, III/30-III/32.
- 58-TANNER CM, GOLDMAN SM, WEBSTER ROSS G. Etiology of Parkinson's Disease In: JANKOVIC JJ, TOLOSA E, editors. *Parkinson's Disease & Movement Disorders*. 4th ed. Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkins, 2002, 90-103.

- 59-TANNER CM, OTTMAN R, GOLDMAN SM, ELLENBERG J, CHAN P, MAYEUX R, LANGSTON JW. Parkinson disease in twins: an etiologic study. *JAMA.* , 1999, **281**, 341-346.
- 60-TERENGGHI G, FALLON RA. Techniques and Applications of *In Situ* Hybridisation. In: UNDERWOOD JCE, editor. *Current topics in pathology*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1990, 289-337.
- 61-UVESKY VN, LI J, FINK AL. Pesticides directly accelerate the rate of alpha-synuclein fibril formation: a possible factor in Parkinson's disease. *FEBS Lett.* , 2001, **500**, 105-8.
- 62-VAN DEN EEDEN S *et al.* Incidence of Parkinson's Disease: Variation by Age, Gender, and Race/Ethnicity. *Am. J. Epidemiol.* , 2002, **157**, 1015-1022.
- 63-WHONE AL, REMY P, DAVIS MR *et al.* The REAL PET- study: slower progression in early Parkinson's disease treated with ropinirole compared with l-dopa. *Neurology.* , 2002, **58**, A82-A83.
- 64-WULLNER U *et al.* Glutamate receptor expression in rat striatum: Effect of deafferentation. *Brain Res.* , 1994, **647**, 209-219.
- 65-WULLNER U, KLOCKGETHER T. Inflammation in Parkinson's Disease. *J. Neurol.* , 2003, **250**, I/35-I/38.
- 66-YOUNG AB, PENNEY JB. Biochemical and functional organization of the basal ganglia In: JANKOVIC JJ, TOLOSA E, editors. *Parkinson's Disease & Movement Disorders*. 4th ed. Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkins, 2002, 90-103.

LOCALISATION CELLULAIRE PAR HYBRIDATION *IN SITU* DE MESSAGERS D'INTERET IDENTIFIES PAR MICROARRAYS SUR CERVEAUX D'INDIVIDUS PARKINSONIENS

NOM : GANICHAUD

Prénom : Hélène

RESUME :

La maladie de Parkinson est une des affections neurodégénératives les plus communes. Il s'agit d'un trouble progressif et chronique qui touche les capacités motrices et cognitives. Elle résulte de l'interaction entre une prédisposition génétique et des facteurs environnementaux. Afin de mieux comprendre l'influence génétique dans la maladie de Parkinson, le groupe de neuropathologie de l'hôpital Charing Cross à l'Imperial College (Londres) essaie de déterminer le profil d'expression génétique des cellules atteintes au moyen de microarrays (ou puces ADN) sur cerveaux humains d'individus parkinsoniens. Dans un deuxième temps, il est nécessaire de localiser l'expression cellulaire des gènes identifiés par microarrays par hybridation *in situ*. L'objet de ce travail est la mise au point de cette méthode afin qu'elle soit disponible pour valider et utiliser les résultats de microarrays après leur analyse. La mise au point est réalisée sur cerveaux de rats avec les sondes oligonucléotides GFAP et bêta-actine marquées à la digoxigénine.

La première partie de ce travail expose les connaissances actuelles sur la maladie de Parkinson ainsi que le travail de recherche du groupe. La deuxième partie relate la mise au point de la méthode d'hybridation *in situ*. Devant l'impossibilité d'obtenir des résultats positifs avec cette méthode, ce travail expose les perspectives à envisager pour obtenir une méthode d'hybridation *in situ* performante ainsi que les méthodes alternatives pour valider les résultats des microarrays.

Mots clés : Maladie de Parkinson, hybridation *in situ*, oligonucléotide, GFAP, digoxigénine, cerveau de rat, étude expérimentale.

JURY :

Président: Pr

Directeur: Dr TIRET

Assesseur: Pr BOSSE

Adresse de l'auteur :

Flat 11

1 Millennium Square

SE1 2PW LONDRES/ RU

CELLULAR BACK MAPPING OF MESSAGES OF INTEREST IDENTIFIED BY MICROARRAYS ON PARKINSONIAN BRAINS USING *IN SITU* HYBRIDISATION

LASTNAME: GANICHAUD

First name: Hélène

SUMMARY:

Parkinson's disease is one of the most common neurodegenerative disorders. It is a progressive and chronic disorder affecting cognitive and motor activities. The aetiology of Parkinson's disease is both environmental and genetic. So that one can better understand the genetic influence in Parkinson disease, the research group of Neuropathology at Charing Cross Hospital, Imperial College, is running some microarrays on parkinsonian brains to define the genetic profile of the affected cells and tissues. Later on, it is necessary to define where the genes identified by microarrays are expressed in the cell. This is possible using *in situ* hybridisation. The aim of this work is to set up an *in situ* hybridisation method so that it is available to validate the microarrays' results once analysed. The settings are performed on rat brains with digoxigenin labelled GFAP and beta-actin oligonucleotides probes.

The first part of this work gives an update on Parkinson's disease as well as an insight on the neuropathology group's research. In the second part, we explain how to set up the *in situ* hybridisation's method. According to the fact that it was impossible to obtain positive results, we also consider how to get a working method as well as alternative ways of validating the microarrays' results.

Key words : Parkinson's disease, *in situ* hybridisation, oligonucleotide, GFAP, digoxigenin, rat brain, experimental study.

JURY:

President: Pr

Director: Dr TIRET

Assessor: Pr BOSSE

Author's address :

Flat 11

1 Millennium Square
SE1 2PW LONDRES/RU

quare
DRES/RU

Rapport-gratuit.com

LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

