



HAL
open science

Mécanismes cellulaires calcium-dépendants impliqués dans la vulnérabilité neuronale et essais sur l'isradipine dans la maladie de Parkinson

Estelle Darricau

► **To cite this version:**

Estelle Darricau. Mécanismes cellulaires calcium-dépendants impliqués dans la vulnérabilité neuronale et essais sur l'isradipine dans la maladie de Parkinson. Sciences pharmaceutiques. 2018. dumas-01876451

HAL Id: dumas-01876451

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01876451v1>

Submitted on 18 Sep 2018

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

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

Année 2018

Thèse n°73

Thèse pour l'obtention du
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement par

Mme. DARRICAU Estelle
Née le 21/01/1992 à Bayonne (64)

Le 18 juillet 2018

**Mécanismes cellulaires calcium-dépendants
impliqués dans la vulnérabilité neuronale et
essais sur l'isradipine dans la maladie de
Parkinson**

Directeur de thèse

Mme. Anne TAUPIGNON

Jury

M. Jean-François QUIGNARD	Docteur en Pharmacie Professeur des Universités	Président
Mme Margaux RONCIER	Docteur en Pharmacie	Juge
M. Benjamin DEHAY	Chargé de recherche, INSERM Docteur de l'Université de Bordeaux	Juge
Mme Anne TAUPIGNON	Maître de conférences HDR	Directrice

Remerciements

À ma directrice de thèse

Mme TAUPIGNON Anne

Maître de conférences habilitée à diriger des recherches
Docteur de l'Université de Poitiers

Merci d'avoir accepté de me guider dans l'écriture de cette thèse. Vos conseils, votre rigueur et votre intérêt pour mon sujet m'ont été d'une aide précieuse. C'est un honneur pour moi de vous avoir comme directrice de thèse.

À mes juges

Professeur QUIGNARD Jean-François

Docteur en pharmacie
Docteur de l'Université de Bordeaux

Merci de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse

M. DEHAY Benjamin

Chargé de recherche, INSERM
Docteur de l'Université de Bordeaux

Merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury et de l'intérêt que vous avez porté à ma thèse.

Mme RONCIER Margaux

Docteur en pharmacie
Pharmacienne assistante de la Grande Pharmacie de Caudéran

Merci pour ton aide, ta patience et d'avoir participé à ma formation durant mon stage. J'ai beaucoup apprécié de travailler avec toi. Tu es comme un modèle pour moi. Merci encore de faire partie de mon jury.

À Cédric

Merci pour le soutien que tu m'as apporté dans ce travail et au cours de mes études. Tu m'as aidé à ne jamais lâcher et à me battre aussi bien dans le travail que dans le sport. Tu as toujours été là pour moi et je t'en suis énormément reconnaissante.

À Carole

Merci pour ton soutien et ton aide durant toutes ces années de travail. Comme une deuxième maman, tu as toujours fait en sorte que je réussisse. J'ai beaucoup de chance d'avoir une sœur comme toi. Je ne te remercierai jamais assez car sans toi je ne serai pas arrivée jusque-là.

À mes parents

Merci pour l'éducation que vous m'avez donné et les valeurs que vous m'avez transmises. Si j'en suis là, c'est en grande partie grâce à vous.

Merci à toi maman, de veiller toujours sur moi et de m'avoir aidé durant mes études et dans ma thèse.

Merci à toi papa de m'avoir transmis le goût du travail et de l'effort. Tu m'as appris à ne jamais baisser les bras et ne jamais renoncer.

À Laura, Mélissa, Estelle, Imane

Merci de votre soutien depuis le début. J'ai beaucoup de chance d'avoir des amies comme vous, toujours là dans les bons comme dans les mauvais moments.

À Imane, Charlotte, Laetitia, Mona...

Merci de votre aide et de tous ces bons moments passés à la fac en votre compagnie !

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	9
I. Intérêts et limites des traitements actuels disponibles dans la MP	11
A. Thérapies médicamenteuses.....	11
1. La lévodopa	11
2. Les agonistes dopaminergiques	14
a) Les alcaloïdes de l'ergot de seigle ou "ergopeptines" : bromocriptine, cabergoline, lisuride et pergolide	15
b) Les agonistes non dérivés de l'ergot de seigle : apomorphine, ropinirole, pramipexole, pibédil et rotigotine	15
3. La Sélégiline	16
4. Inhibiteurs des COMT	17
5. Médicaments antiparkinsoniens non dopaminergiques	18
a) Les anticholinergiques	18
b) L'amantadine	18
B. Thérapies non médicamenteuses.....	19
1. Procédures chirurgicales	19
2. Autres	20
II. Impact et propagation de l'α-synucléine	21
A. Existence de différentes souches et caractéristiques structurales en lien avec leur neurotoxicité	21
B. Synucléinopathies et dysproteostases : rôle pathogène de la mutation et de l'agrégation de l' α -synucléine	25
1. Lien entre synucléinopathies et voie d'autophagie.....	25
a) Le système macroautophagie-lysosome.....	26
b) L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (Chaperone Mediated Autophagy, CMA)	26
2. Lien entre synucléinopathies et stress du RE	28
3. Lien entre synucléinopathies et perturbations de la fonction mitochondriale.	29
C. Hypothèse de Braak : propagation rétrograde de l' α -synucléine et modèle « Prion like ».....	31
D. Limites du modèle "Prion like"	35
1. Critère de diagnostic inadapté	36
2. Absence de distribution au hasard.....	36
3. Absence de propagation au "plus proche voisin"	37
4. Absence de propagation liée à la « connectivité synaptique »	38
III. Vulnérabilité neuronale calcium-dépendante des neurones dopaminergiques de la SNc	40
A. Mort sélective des neurones dopaminergiques de la SNc	40
1. Rappel sur la physiopathologie des ganglions de la base.....	40
2. Comparaison de la mort des neurones dopaminergiques de la SNc et de l'ATV	43
3. Hypothèses de mort sélective	45
B. Implication des facteurs intrinsèques dans la vulnérabilité sélective des neurones dopaminergiques de la SNc.....	46
1. Champ axonal étendu.....	46
2. Activité pacemaker autonome dépendante des canaux calciques voltage-dépendants de type L (LCCVD)	49
a) Caractéristiques structurales des LCCVD	50
b) Expression spécifique des LCCVD des neurones dopaminergiques de la SNc	51
c) Activité des LCCVD	51
d) Ségrégation fonctionnelle entre les canaux Ca _v 1.2 et Ca _v 1.3	52
C. Mise en jeu du Ca ²⁺ et dysfonction mitochondriale	52

1. Coût énergétique élevé	53
2. Stress oxydant mitochondrial	54
3. Schéma récapitulatif.....	56
a) Charge de Ca ²⁺ et / ou dysfonction mitochondriale (rouge)	57
b) Dysfonctionnement protéostatique (violet)	58
IV. Utilisation de bloqueurs des canaux calciques type L DHP : essais sur l'isradipine	59
A. Choix de l'isradipine	59
B. Essai pré-clinique de l'isradipine sur l'animal	64
C. Essai de phase II sur l'isradipine STEADY-PD II.....	69
1. Description de l'essai de phase II	69
2. Evaluation de la tolérance	71
3. Evaluation de la sécurité	72
4. Evaluation de l'efficacité	72
a) Test Anova : Comparaison entre les 3 bras de traitements actifs (Annexe 4)	73
b) Test de comparaison de l'efficacité des traitements avec le placebo (Annexe 4)	73
c) Comparaison des valeurs UPDRS totales des 4 bras à la 12 ^{ème} semaine et entre la 52 ^{ème} et 54 ^{ème} semaine	74
D. Essai de phase 3 en cours STEADY- PD III	75
1. Description de l'essai III	75
2. Résultat principal.....	77
3. Résultats secondaires	79
CONCLUSION.....	81
BIBLIOGRAPHIE	82

Liste des abréviations

- ATV : Aire Tegmentale Ventrale
- BHE : Barrière Hémato-Encéphalique
- DA : Dopamine
- DAT : Transporteur à Dopamine
- DHP : Dihydropyridine
- DMV : Noyau Moteur dorsal du Vague
- GPe : Globus Pallidus Externe
- GPi : Globus Pallidus Interne
- HVA : Haut seuil d'Activation
- ICOMT : Inhibiteurs des Catéchol-O-Méthyl-Transférase
- IMAOB : Inhibiteur de la Monoamine Oxydase B
- LB : Corps de Lewy
- LC : Locus Coeruleus
- LP : Pathologie de Lewy
- LCCVD : Canaux Calciques Voltage-Dépendants de type L
- MCJ : Maladie de Creutzfeldt-Jakob
- MCU : Unipore du Calcium Mitochondrial
- MP : Maladie de Parkinson
- MPP : 1-Méthyl-4-PhénylPyridinium
- PPN : Noyau Pédonculopontin
- RE : Réticulum Endoplasmique
- ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène
- SNc : Substance Noire Compacte
- SNC : Système Nerveux Central
- SNr : Substance Noire Réticulée
- STN : Noyau Sous Thalamique
- TH : Tyrosine Hydroxylase

INTRODUCTION

La maladie de Parkinson (MP) est un trouble neurologique neurodégénératif caractérisé par une akinésie, une rigidité et un tremblement au repos. Elle s'accompagne de déficits fonctionnels non moteurs tels que des dysfonctions neurovégétatives et sensorimotrices, un déclin cognitif, des dépressions et des troubles du sommeil. La MP atteint jusqu'à 1% des personnes de plus de 60 ans et 2% des personnes de plus de 80 ans. Des formes plus rares de la maladie surviennent avant l'âge de 50 ans et ne représentent que 10% des cas. Les effets dévastateurs de la maladie associés à l'augmentation de l'espérance de vie, sur les personnes atteintes et les aidants, signifient que la MP devient un fardeau croissant pour les ressources de santé.

Les traitements pharmacologiques actuels symptomatiques sont nombreux et ne ralentissent ni inversent la progression de la maladie. Ils ont des efficacités, des profils de sécurité et des indications différentes.

La baisse de la dopamine striatale joue un rôle clé dans la pathogenèse des symptômes moteurs. La plupart des traitements sont basés sur une stratégie de remplacement de la dopamine ou la stimulation des récepteurs à dopamine. Les symptômes moteurs résultent principalement de la mort des neurones dopaminergiques de la SNc qui innervent les ganglions de la base. Les traitements non dopaminergiques et les procédures chirurgicales sont eux, utilisés de manière plus restreinte.

Malheureusement, ces traitements actuels sont souvent associés à des effets indésirables moteurs et psychiatriques invalidants handicapants qui limitent leurs utilisations.

Des études récentes ont soutenu que les agrégats protéiques intracellulaires d' α -synucléine, couramment retrouvés dans le cerveau des patients atteints de la MP, sont à l'origine de la LP et se propageraient de façon rétrograde à travers des réseaux neuronaux couplés synaptiquement. Le mauvais repliement de cette protéine pourrait être à l'origine de nombreuses perturbations moléculaires et cellulaires avec pour conséquence une vulnérabilité neuronale.

Cependant, des facteurs cellulaires autonomes seraient susceptibles de jouer un rôle non négligeable dans la détermination du profil de MP mais, plus important encore, dans le profil de la perte neuronale.

Des études électrophysiologiques, épidémiologiques et neuropathologiques ont impliqué les canaux calciques de sous-type CaV1.3 dans la pathogenèse des troubles parkinsoniens. Certains médicaments de type dihydropyridine, inhibiteurs des canaux calciques, se sont avérés capables de ralentir la progression de la MP chez l'homme.

Cette thèse débutera, dans un premier temps, en rappelant les limites des traitements actuels de la MP. Ensuite, dans un second temps, elle s'intéressera à la protéine α -synucléine, à son mauvais repliement et sa propagation à travers le réseau neuronal. Dans une troisième partie, elle montrera le rôle des facteurs cellulaires autonomes et l'implication des canaux calciques dans la vulnérabilité sélective de certains groupes de neurones : l'ensemble de ces facteurs pourrait gouverner non seulement la propagation de la pathologie α -synucléine mais aussi la mort neuronale. Enfin, la quatrième partie présentera l'intérêt de l'utilisation de l'isradipine, molécule potentiellement neuroprotectrice, comme futur traitement de la MP.

I. Intérêts et limites des traitements actuels disponibles dans la MP

Il n'existe actuellement aucun traitement curatif de la MP. Les médicaments utilisés visent seulement à compenser le déficit en dopamine. Ces traitements symptomatiques reposent sur la connaissance du métabolisme de la dopamine et de son mode d'action au niveau des synapses. L'âge moyen d'initiation d'un traitement antiparkinsonien est de 75 ans.

La lévodopa, précurseur de la dopamine, reste le principal médicament utilisé car il est le plus actif. Celui-ci est majoritairement prescrit chez les patients âgés de plus de 70 ans. A côté de la lévodopa, des agonistes de la dopamine miment l'effet de la dopamine sur les récepteurs. Ils sont surtout prescrits chez des sujets jeunes de moins de 60 ans. Des inhibiteurs des enzymes interviennent dans le catabolisme de la dopamine afin de prolonger son effet.

La lévodopa et les agonistes dopaminergiques représentent plus de 80% des prescriptions des patients parkinsoniens. Leur association avec d'autres médicaments antiparkinsoniens est retrouvée dans 20% des cas.

A. Thérapies médicamenteuses

Ce chapitre s'appuie sur les références (1) à (5).

Les thérapies médicamenteuses actuellement disponibles comprennent la lévodopa, les agonistes de la dopamine, les inhibiteurs de la monoamine oxydase B (IMAOB), les inhibiteurs des catéchol-o-méthyltransférase (ICOMT), les anticholinergiques et l'amantadine.

1. La lévodopa

La découverte de la lévodopa constitue une étape majeure en neuropharmacologie moderne. La lévodopa est le traitement de référence dans la MP en raison de son efficacité impressionnante sur les symptômes moteurs et de son prix relativement peu élevé (1). En

comparaison avec d'autres médicaments antiparkinsoniens tels que les agonistes de la dopamine, elle reste plus efficace et moins chère. Son principal avantage est son effet « réussi » au cours des premières années de traitement : période connue sous le nom de L-DOPA "honeymoon.". Aussi, la lévodopa reste le seul médicament rapporté pour améliorer l'espérance de vie d'environ 5 ans, bien que le taux de mortalité reste plus élevé chez les patients parkinsoniens que dans la population générale.

La lévodopa est le précurseur de la dopamine. Elle traverse la BHE pour être captée par les neurones dopaminergiques puis transformée en dopamine (2). Ce mécanisme est possible tant qu'il y a suffisamment de neurones dopaminergiques nigrostriés pour assurer la capacité de synthèse, de stockage et de relargage de la dopamine chez le patient parkinsonien. Elle est souvent associée à un inhibiteur de la dopa-décarboxylase : benserazide ou carbidopa, ne passant pas la BHE (3). En effet, la majorité de la lévodopa n'arrive pas dans les noyaux gris centraux car elle est décarboxylée à la périphérie au niveau de la paroi de l'estomac par la dopa décarboxylase périphérique puis transformée en noradrénaline par la dopamine B hydroxylase. Cette dernière transformation est à l'origine de certains effets secondaires périphériques de la lévodopa. La dopamine provoque des nausées et vomissements par stimulation des récepteurs dopaminergiques de la paroi de l'estomac et de la zone « gâchette du vomissement » située dans le plancher du 4ème ventricule (*area postrema*) ainsi que des hypotensions orthostatiques par stimulation des récepteurs dopaminergiques vasculaires (vasodilatation) et rénaux. Grâce aux inhibiteurs de la dopa-décarboxylase, la destruction de la lévodopa est réduite à la périphérie. Ainsi, il y a moins de dopamine périphérique donc moins d'effets secondaires périphériques et plus de lévodopa qui passe la BHE. La biodisponibilité globale de la lévodopa est donc augmentée et sa demi-vie d'élimination est de 3h.

Cependant, au long court, la lévodopa ne résout pas tous les problèmes rencontrés chez les patients et possède de nombreux effets indésirables :

➤ Effets indésirables centraux dopaminergiques

❖ Moteurs

Les complications motrices comprennent essentiellement les fluctuations motrices et les mouvements anormaux involontaires appelés dyskinésies. Elles sont fréquentes et touchent environ 80% des patients parkinsoniens après 5 à 10 ans de traitement. Elles constituent une source de gêne considérable.

Les fluctuations motrices sont liées à la perte progressive des neurones nigrostriataux entraînant une diminution des capacités de stockage de la dopamine ne permettant plus de compenser les variations des concentrations plasmatiques de lévodopa. Les effets thérapeutiques deviennent donc très dépendants des concentrations plasmatiques et de la pharmacocinétique de la lévodopa expliquant la survenue des akinésies de fin de dose. Dans certains cas, à un stade encore plus évolué, des modifications de la sensibilité des récepteurs dopaminergiques post-synaptiques (stimulations pulsatiles anormales et intermittentes des récepteurs dopaminergiques) sont à l'origine de fluctuations beaucoup plus brutales et imprévisibles. Le patient passe alors brutalement d'un effet de déblocage (phase ON) à un effet de blocage (phase OFF). Cet effet indésirable est encore appelé effet ON-OFF.

Les dyskinésies, suivant la prise de lévodopa, traduisent une hypersensibilité des récepteurs dopaminergiques et une augmentation du nombre de récepteurs. Ces mouvements peuvent survenir soit au « milieu de dose » (mouvements pseudochoréiques des extrémités) au cours des périodes de déblocage quand les taux de lévodopa dépassent un certain seuil.

Les dyskinésies de début et fin de dose restent encore mal expliquées. Elles seraient dues probablement à la pulsativité anormale de la stimulation dopaminergique induite par la lévodopa qui dérègle les réponses au niveau du striatum et déséquilibre l'ensemble des relais moteurs situés en aval (2).

La prise en charge de ces complications comprend la fragmentation des doses, l'utilisation d'une forme à libération prolongée, l'association à un agoniste dopaminergique ou l'association d'un traitement adjuvant : IMAO-B ou ICOMT pour les akinésies de fin de dose et l'amantadine pour les dyskinésies. L'utilisation d'un agoniste dopaminergique lors de

l'initiation du traitement antiparkinsonien permet de retarder l'apparition des complications motrices.

Plusieurs caractéristiques motrices y compris la parole, la démarche, la posture et l'équilibre ne répondent généralement pas à la lévodopa et tendent à se détériorer au fil du temps malgré une dopathérapie optimale.

Au long court, la lévodopa tend à aggraver les symptômes non moteurs parkinsoniens tels que les hallucinations, les troubles cognitifs et les hypotensions orthostatiques. Elle peut induire des effets indésirables dopaminergiques "type A » prévisibles.

❖ Les effets psychiatriques

La lévodopa provoque parfois de véritables psychoses avec hallucinations visuelles et/ou auditives qui seraient la conséquence d'une stimulation excessive des récepteurs dopaminergiques mésocorticolimbiques et/ou d'une hyperactivité sérotoninergique (interaction dopamine-sérotonine). Ces effets psychiatriques s'observent plus fréquemment chez le sujet âgé, en mauvaise santé et « polymédiqué ». Des troubles du comportement de type addiction aux jeux, achats compulsifs, *punding* (comportements répétitifs sans but) et une hypersexualité sont également observés.

Ainsi, la lévodopa n'arrête pas la progression de la MP. Au cours des stades les plus avancés de la maladie elle n'améliore pas beaucoup les symptômes moteurs et non moteurs handicapants. Des effets secondaires gênants sont souvent associés à la thérapie par lévodopa.

2. Les agonistes dopaminergiques

Au cours des premiers stades de la maladie, les agonistes de la dopamine sont efficaces pour contrôler les symptômes moteurs du parkinsonisme. Ils sont cependant moins efficaces que la lévodopa et sont relativement chers, en particulier les plus récents (1).

Tous les agonistes dopaminergiques stimulent les récepteurs D2, initialement considérés comme étant seuls impliqués dans les effets moteurs de la dopamine. On distingue deux classes parmi eux (4):

a) Les alcaloïdes de l'ergot de seigle ou "ergopeptines" :
bromocriptine, cabergoline, lisuride et pergolide

Ils sont les plus anciens et possèdent, outre des propriétés d'agonistes dopaminergiques, des propriétés alpha - adrénérgiques ou sérotoninergiques.

Des effets indésirables liés à leur structure chimique : oedèmes des membres inférieurs, syndrome de Raynaud, rares observations de fibroses (pulmonaires ou rétropéritonéales) ont été rapportés.

b) Les agonistes non dérivés de l'ergot de seigle :
apomorphine, ropinirole, pramipexole, piribédil et rotigotine

Ce sont des composés plus récents, synthétiques, plus spécifiques des récepteurs D2, présentant moins d'effets indésirables.

Le principal avantage des agonistes dopaminergiques, dans le traitement actuel de la MP, est leur efficacité dans le traitement et la prévention des complications motrices. Les fluctuations motrices et les dyskinésies surviennent rarement au cours d'un traitement de première intention par les agonistes dopaminergiques seuls. Au stade précoce de la MP, les agonistes dopaminergiques contrôlent efficacement les symptômes moteurs et surtout, réduisent de moitié le risque de complications motrices (2). Cet effet clinique a été récemment confirmé par une étude d'imagerie fonctionnelle (la tomographie par Emission de Positrons (TEP)). Elle marque les terminaisons dopaminergiques de la voie nigrostriée grâce à un radiotracer (18 Fluoro dopa) et montre une progression plus lente de la maladie chez les patients parkinsoniens traités par ropinirole par rapport aux patients traités par lévodopa (5).

Les agonistes dopaminergiques ont donc un intérêt quant à leur potentielle propriété neuroprotectrice. C'est chez les patients non exposés auparavant à la lévodopa que les agonistes dopaminergiques semblent avoir le plus grand effet.

L'ajout d'un agoniste à la lévodopa, chez les patients qui connaissent déjà des fluctuations motrices, réduit le temps passé dans la condition "off". Ceci est cependant généralement réalisé en contrepartie de plus de dyskinésies.

Tous les agonistes dopaminergiques provoquent des effets indésirables dopaminergiques du même type que ceux décrits pour la lévodopa. Des troubles digestifs (nausées, vomissements) sont liés à la stimulation des récepteurs D2 de l'*area postrema*. Ils apparaissent généralement en début de traitement lors de la progression posologique. Le risque de troubles psychiatriques paraît plus important avec les agonistes qu'avec la lévodopa (délires, agitations, hallucinations etc.). Dans les essais contrôlés randomisés, les hallucinations sont un problème particulier en raison d'une stimulation excessive des récepteurs dopaminergiques méso-corticolimbiques et/ ou d'une hyperactivité sérotoninergique. Ces complications concernent majoritairement le sujet âgé, détérioré et polymédiqué.

3. La Sélégiline

La sélégiline est actuellement le seul inhibiteur spécifique de la monoamine-oxydase de type B disponible sur le marché. Elle agit en inhibant la recapture des catécholamines. Son intérêt dans la MP réside dans la possibilité de renforcer l'action de la lévodopa en augmentant et en prolongeant les taux plasmatiques de dopamine. Son impact actuel sur les besoins thérapeutiques des patients parkinsoniens est modeste et son efficacité reste modérée en monothérapie. Son indication réside dans l'amélioration des fluctuations motrices en complément de la lévodopa (2). Elle améliore les symptômes moteurs parkinsoniens et retarde de plusieurs mois le besoin en traitement par la lévodopa. Près de 3% des prescriptions associent la sélégiline à la lévodopa.

Cependant il est peu probable que cette stratégie ait un impact sur l'évolution ultérieure du parkinsonisme, en particulier en ce qui concerne les complications motrices et la progression

de la maladie. Elle n'a pas d'impact sur les caractéristiques motrices et non motrices lévodopa-résistantes.

4. Inhibiteurs des COMT

Les inhibiteurs des COMT : entacapone et tolcapone, agissent en diminuant le métabolisme périphérique de la lévodopa pour prolonger sa demi-vie d'élimination. Les ICOMT améliorent la disponibilité de la drogue au niveau du cerveau. Ils n'ont pas d'effets symptomatiques en monothérapie et sont prescrits en association avec la lévodopa pour permettre de prolonger sa durée d'action (2).

Cliniquement, des essais en double aveugle ont montré que les ICOMT, en association à la lévodopa, renforcent les fonctions motrices puisqu'ils augmentent les phases ON et réduisent les phases OFF. On s'intéresse donc à la possibilité d'utiliser un ICOMT dès le début de la thérapie lévodopa pour réduire le risque de développer des complications motrices.

Aucune étude n'a démontré l'impact des ICOMT sur les caractéristiques non motrices, la progression de la maladie ou la mortalité dans la MP (1).

Tout comme les agonistes dopaminergiques récents, l'entacapone reste un traitement coûteux.

Les effets indésirables sont comparables à ceux de la lévodopa. Associés aux ICOMT, ils sont majorés (à l'exception des fluctuations motrices). La tolcapone a été retirée du marché en France en 1998 en raison d'hépatites fulminantes et de rhabdomyolyses. Elle a été réintroduite en 2005 (6). Il a été rapporté des élévations des enzymes musculaires et des troubles digestifs : certains patients occasionnels ne tolèrent pas le médicament en raison d'effets indésirables de type B tels que les diarrhées.

5. Médicaments antiparkinsoniens non dopaminergiques

a) Les anticholinergiques

Ils sont au nombre de trois : trihexyphénydile, bipéridène et tropatépine et sont parmi les médicaments antiparkinsoniens les plus anciens et les moins chers (1).

Les anticholinergiques seuls ou en association sont prescrits chez environ 12 % de la population parkinsonienne.

Le déficit dopaminergique lève l'inhibition au niveau des neurones cholinergiques : il en résulte une hyperactivité cholinergique striatale. Les antagonistes muscariniques diminuent la transmission cholinergique en agissant au niveau de la synapse des interneurons cholinergiques striataux (2). Ils ont des effets symptomatiques légers sur la triade motrice, en particulier les tremblements.

Les effets indésirables des anticholinergiques découlent directement du blocage des récepteurs cholinergiques périphériques (sécheresses buccales, constipations, dysuries, mydriases et troubles de l'accommodation) et centraux (confusions, délires, hallucinations et troubles mnésiques, notamment chez le sujet âgé). Les effets secondaires les plus fréquents étant les confusions et les hallucinations.

Il n'y a actuellement aucune donnée disponible sur l'effet des anticholinergiques sur les fluctuations motrices, la progression de la maladie et la mortalité.

b) L'amantadine

C'est un autre médicament antiparkinsonien, ancien et bon marché, ayant un effet modeste sur les caractéristiques motrices parkinsoniennes. Son mécanisme d'action n'a pas été clairement élucidé mais il est reconnu pour être un faible antagoniste du glutamate bloquant les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA). Il a eu un regain d'intérêt dans la prise en charge des patients en raison de son effet antidyskinésique lié à ses propriétés d'antagoniste NMDA (2). L'amantadine exerce un effet antiparkinsonien modéré sur l'akinésie et l'hypertonie de la MP.

Les effets indésirables les plus souvent rencontrés sont les confusions, les hallucinations visuelles et les agitations. Ils sont liés aux propriétés dopaminergiques et anticholinergiques du médicament. Une hypotension orthostatique, des oedèmes et un livedo des membres inférieurs surviennent plus rarement. Certains troubles digestifs sont également observés.

Il n'y a aucune donnée sur les effets de l'amantadine concernant la prévention des complications motrices et la mortalité.

B. Thérapies non médicamenteuses

Ce chapitre s'appuie sur les références (1), (7) et (8).

1. Procédures chirurgicales

Les interventions chirurgicales telles que la pallidotomie, ou, plus spécifiquement la stimulation cérébrale profonde du globus pallidus interne (GPi) ou noyau sous-thalamique (STN)), sont réalisées sur 5 à 10 % des patients parkinsoniens, atteints d'une invalidité grave, ne pouvant pas être contrôlés de manière satisfaisante avec les médicaments disponibles (7).

La stimulation cérébrale profonde bilatérale du STN ou du GPi a été étudiée et démontre des améliorations dans la fonction motrice pendant les périodes OFF et des complications motrices réduites (1).

Cependant, des effets secondaires potentiellement importants ont été rapportés chez 2 à 5% des patients : effets liés à la procédure chirurgicale, aux défauts mécaniques, aux risques infectieux et à la stimulation elle-même. La stimulation cérébrale profonde nécessite une expertise en diagnostic, imagerie, chirurgie stéréotaxique, neurophysiologie, enregistrement de microélectrodes et gestion postopératoire du système de stimulation, limitant ainsi son application généralisée. Ses exigences et son coût élevé ont empêché de nombreux centres médicaux de mettre en œuvre un programme chirurgical et par conséquent de nombreux patients se voient refuser l'accès à cette procédure. Elle est réservée aux patients jeunes, qui ne répondent pas aux traitements médicamenteux.

Aucune procédure chirurgicale n'a démontré d'avantages supérieurs à ceux de la lévodopa. Au contraire, c'est dans le traitement des complications motrices liées à la lévodopa que les procédures chirurgicales se sont avérées utiles.

Si les traitements pharmacologiques modernes pouvaient réduire la fréquence et la gravité des complications motrices, les besoins actuels en procédures chirurgicales avec les risques et les coûts qui en découlent seraient nettement diminués.

2. Autres

Ils incluent la thérapie physique, l'ergothérapie, l'orthophonie, les exercices, l'éducation diététique et le soutien psychologique à la fois pour le patient et le soignant (8). La gestion complète du patient comprend l'attention à chacun de ces facteurs. Cependant, aucune étude n'a démontré que l'un de ces traitements a un effet spécifique sur les signes ou les symptômes de la MP.

Les taux de patients ayant un recours aux soins d'auxiliaires médicaux sont d'environ 55 % pour les soins infirmiers, 45 % pour les soins de kinésithérapie et 3 % pour les soins d'orthophonie.

Au final, la lévodopa et les autres médicaments dopaminergiques améliorent considérablement les symptômes moteurs et la qualité de vie des patients atteints de la MP au cours des premiers stades de la maladie. Cependant, après quelques années de thérapies dopaminergiques, les patients deviennent de plus en plus handicapés malgré une combinaison de traitements antiparkinsoniens disponibles. Tôt ou tard, ils souffrent de symptômes moteurs «dopa-résistants» et de signes non moteurs «dopa-résistants». Aucune des thérapies antiparkinsoniennes actuellement disponible, seule ou associée à d'autres interventions, n'offre une stratégie entièrement satisfaisante pour gérer les patients atteints de la MP sur le long terme.

La thérapie antiparkinsonienne actuelle ne peut donc pas être considérée comme idéale en ce qui concerne l'efficacité et la sécurité. Il reste le besoin d'un traitement symptomatique efficace, sûr, bon marché et neuroprotecteur pour faire face à des besoins médicaux non satisfaits dans la gestion de la MP.

II. Impact et propagation de l' α -synucléine

Les agrégats protéiques intracellulaires d' α -synucléine, appelés LB (Lewy Bodies) et la mort neuronale, sont couramment observés dans le cerveau des patients atteints de la MP clinique. Il est largement admis que la LP (pathologie de Lewy) apparaît tôt dans la maladie et se propage, entraînant un dysfonctionnement et la mort neuronale.

En 1997, la mutation ponctuelle du gène α -synucléine, responsable de certaines formes héréditaires de la MP a été découverte. L' α -synucléine est une petite protéine de 140 acides aminés, présente au niveau du compartiment présynaptique. Elle permet la formation du complexe SNARE (soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor), à l'origine du contrôle de la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique des terminaisons nerveuses (9). L' α -synucléine permet donc la dynamique des vésicules, le trafic et la libération des neurotransmetteurs dans le cerveau normal.

En condition physiologique, l' α -synucléine existe sous différents états conformationnels : oligomères, rubans et fibrilles. Ces différences d'assemblages de la protéine forment des "souches" possédant des caractéristiques structurales différentes. L'existence de plusieurs souches explique les différents tableaux cliniques retrouvés dans les maladies neurodégénératives et notamment la MP.

Son rôle pathogène dans la MP est dû à un gain de fonction. En effet, son agrégation, précédant la mort neuronale, est nécessaire à son caractère pathogène. De plus, les mutations du gène α -synucléine accélèrent l'agrégation de la protéine α -synucléine menant à l'apparition précoce de la MP.

A. Existence de différentes souches et caractéristiques structurales en lien avec leur neurotoxicité

Ce chapitre s'appuie sur les références (10) et (11).

L'administration chez l'animal de souches de protéine α -synucléine est à l'origine de synucleinopathies. Les caractéristiques moléculaires des dépôts d' α -synucléine entraînent

des phénotypes pathologiques distincts comme la MP, la démence à corps de Lewy, l'atrophie du système nerveux etc. Plus généralement, ces agrégats de protéines « mal repliés » sont caractéristiques des maladies neurodégénératives. Cependant, il existe des différences dans les composants protéiques et les régions cérébrales affectées. Par exemple : les dépôts gliaux d' α -synucléine filamenteuse sont retrouvés dans l'atrophie du système nerveux alors que des inclusions neuronales d' α -synucléine sont retrouvées dans la MP et la démence à corps de Lewy.

Une étude a permis de démontrer les différences pathologiques observées *in vivo* après inoculation chez le rat des différents assemblages d' α -synucléine (11). Une comparaison, entre les propriétés des oligomères d' α -synucléine et 2 souches "fibrilles" et "rubans", a été réalisée pour évaluer leur impact neurotoxique. Cette comparaison a été réalisée en l'absence et en présence de la surexpression de l' α -synucléine médiée par un virus recombinant adéno-associé (rAAV-mediated human α -synucléine).

Quatre mois après l'injection des formes rubans et fibrilles d' α -synucléine, au niveau de la SNc, des inclusions à LB se sont formées essentiellement dans les neurones dopaminergiques au sein de la SNc (ceci de façon un peu plus importante pour les rubans). Ces inclusions ont été mises en évidence en raison de la phosphorylation de l' α -synucléine sur la ser 129, ce qui a permis leur visualisation. Aussi, bien que les formes oligomères se soient propagées de manière beaucoup plus importante une fois injectées dans la SNc des rats, elles n'en sont pas pour autant toxiques puisque l'injection d'oligomères n'entraîne pas d'inclusions α -synucléine détectables.

Il est important de noter que l'inoculation seule des différentes souches, n'induit pas de dommages dopaminergiques détectables ni de pertes axonales striatales. Mais, lorsque les AAV sont injectés avec chacune des formes d' α -synucléine, la destruction des neurones dopaminergiques et les déficits moteurs sont accentués. En effet, la figure 1A montre que le nombre de cellules positives à la TH et leur volume diminue en présence de la surexpression de l' α -synucléine. Plus précisément, la figure 1B montre que l'inoculation des souches surexprimées de fibrilles provoque près de 50% de perte cellulaire et 60 % de réduction du volume terminal du nerf dopaminergique striatal. Les oligomères et rubans induisent environ 40% de perte neuronale et 30% de réduction du volume striatal. Ces dommages

sont visibles par la perte de neurones positifs à la tyrosine hydroxylase donc dopaminergiques ou noradrénergiques.

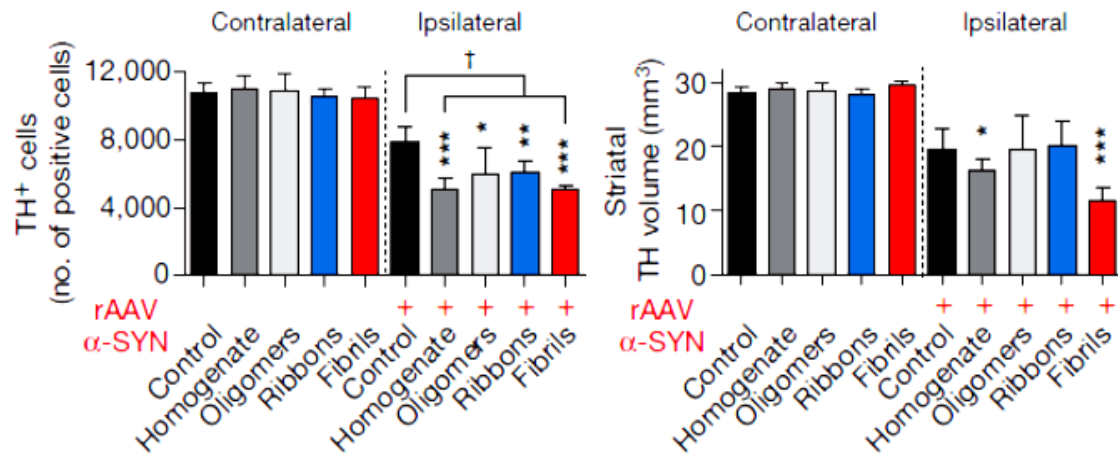


Figure 1A: Nombre de cellules positives à la TH et leur volume en fonction des différentes souches d' α -synucléine inoculées, surexprimées ou non par un virus recombinant adéno-associé (rAAV-mediated human α -synucléin). Extrait la figure 2 de (11).

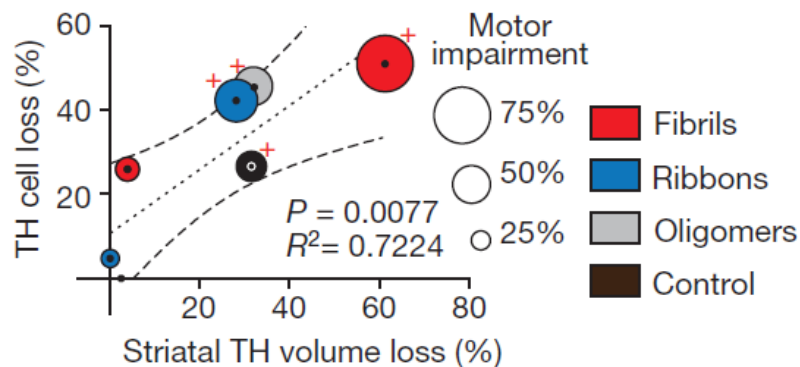


Figure 2B : Effets neurotoxiques induits par les différentes souches d' α -synucléine avec les fibrilles présentant le plus grand potentiel neurotoxique. Les croix rouges indiquent les données obtenues sur une α -synucléine surexprimée par un virus recombinant adéno-associé (rAAV-mediated human α -synucléin). Extrait la figure 2 de (11).

Les résultats montrent que les fibrilles ont imposé la plus grande charge neurotoxique sur la SNc. Elles sont donc la principale souche toxique.

A l'origine, ce processus débute par l'agrégation de monomères dépliés ou mal pliés en dimères. Puis, il se forme des petites espèces oligomères, stabilisées par des interactions en forme de feuillets beta. Ensuite, l'agrégation de l' α -synucléine évolue vers des protofibrilles insolubles de poids moléculaire plus élevé et aboutit à la formation de fibrilles de type amyloïde s'accumulant dans des structures pathologiques telles que les corps de Lewy. Les facteurs favorisant la fibrillation de l' α -synucléine sont le déséquilibre entre son expression et sa dégradation. Plus particulièrement, ces facteurs impliquent le dysfonctionnement du système ubiquitine /protéasome et les voies de dégradation médiées par les protéines chaperonnes. De même, l'altération de la voie d'autophagie médiée par les lysosomes, peut induire une mauvaise élimination de la protéine α -synucléine.

Le mauvais repliement et l'agrégation de l' α -synucléine jouent donc un rôle central dans la mort cellulaire neuronale (10). Ses oligomères et ses protofibrilles sont particulièrement toxiques pour les neurones. Ils peuvent modifier les fonctions cellulaires clés : l'homéostasie mitochondriale et du RE, la fragmentation de l'appareil Golgi et la perméabilisation des membranes. La figure 2 montre les différentes étapes de l'agrégation de l' α -synucléine et ses conséquences.

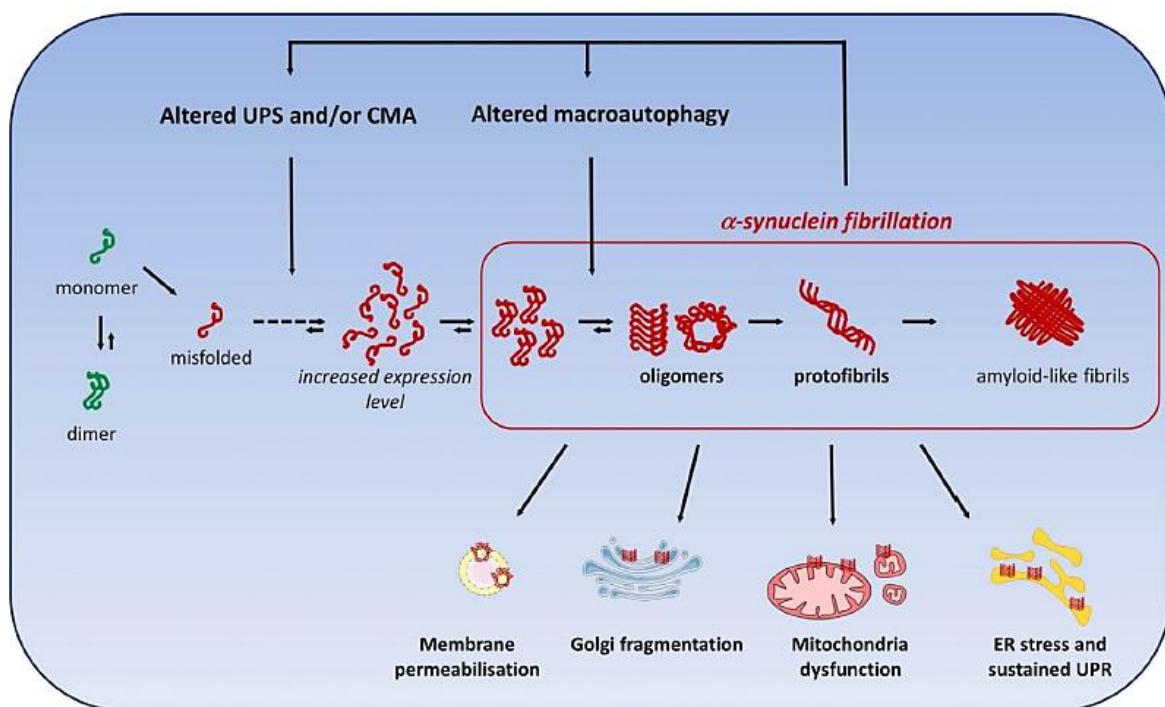


Figure 2 : Causes et conséquences possibles de l'agrégation de l' α -synucléine dans la MP.
Tiré de (10) , figure 1.

B. Synucléinopathies et dysproteostases : rôle pathogène de la mutation et de l'agrégation de l' α -synucléine.

Ce chapitre s'appuie sur les références (10), (12), (13), (14), (15)

1. Lien entre synucleinopathies et voie d'autophagie

L'autophagie est essentielle pour aider à préserver l'équilibre entre augmentation et dégradation du contenu cellulaire et notamment de la protéine α -synucléine.

Il existe à ce jour 3 types de mécanismes d'autophagie (15):

- La microautophagie : les lysosomes envahissent directement le cytoplasme
- la macroautophagie: elle sous-entend la formation d'une structure à double membrane appelée autophagosome. Ces derniers engloutissent la cargaison cytosolique (par exemple : organites, agrégats ou gouttelettes lipidiques, endommagés) avant d'être livrés aux lysosomes pour leur dégradation. Les métabolites qui en résultent sont transportés dans le cytoplasme et utilisés soit pour la synthèse de nouvelles macromolécules ou comme source d'énergie.
- L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (CMA) : elle se caractérise par sa sélectivité quant aux substrats spécifiques (protéines cytosoliques) dégradés. Seules les protéines possédant une séquence consensus de peptide sont dégradées.

2 types de mécanismes d'autophagie sont les plus impliqués dans l'accumulation et le mauvais repliement de l' α -synucléine au cours de la MP (10):

a) Le système macroautophagie-lysosome

Dans les neurones à dopamine des patients parkinsoniens, les marqueurs protéiques des autophagosomes sont augmentés et ceux des lysosomes sont diminués. Ceci suggère que le flux autophagique est profondément perturbé dans la pathogénèse.

Plusieurs gènes impliqués dans la MP sont liés à des dysfonctionnements d'autophagie. En effet, la surexpression de l' α -synucléine provoque une inhibition de l'autophagie. De plus, la mutation de Park-7 aussi appelé DJ-1 est à l'origine d'un stress oxydatif menant à l'accumulation des protéines associées aux microtubules (LC3), constituants majeurs des autophagosomes. En outre, la surexpression de la protéine LRRK2 dans la MP augmente les nombres d'autophagosomes et le pH lysosomal réduisant alors l'activité du lysosome. D'autres facteurs sont impliqués dans l'accumulation d' α -synucléine et notamment la perte de l'enzyme Atg7 dans le cerveau, nécessaire à la formation de l'autophagosome. Cette diminution d'activité enzymatique entraîne la formation d'agrégats de protéines liant l'ubiquitine (K48, p62) suggérant que la voie de l'autophagie-lysosome et celle du protéasome coopèrent pour réduire le fardeau des protéines mal repliées.

b) L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (Chaperone Mediated Autophagy, CMA)

La protéine chaperonne HSC 70 favorise le repliement de l' α -synucléine. Cette chaperonne est la plus abondante dans nos cellules et se lie aux fibres α -synucléine (13). L' α -synucléine est donc un substrat pour les CMA, ce qui suggère un lien possible entre l'altération de l'activité CMA et la MP. La mutation du gène α -synucléine empêche la reconnaissance de la protéine α -synucléine par la protéine chaperonne HSC70. Il en résulte donc une diminution de la formation du complexe HSC70/ α -synucléine et un blocage de sa fixation sur le récepteur LAMP 2A lysosomal. Ainsi, la protéine mal repliée s'accumule, puisqu'elle est incapable d'atteindre la lumière lysosomale pour être dégradée.

Des mutations des gènes codant les protéines du système endosomal / lysosomal, VPS35, l'ATPase de type P de type 5 et la glucocérébrosidase (GBA) ont été découverts dans la MP.

❖ Mutation du gène codant pour VPS35

VPS35 fait partie du rétromère. C'est un complexe protéique, impliqué dans le transport rétrograde des protéines (récepteurs membranaires, transporteurs etc.) des endosomes vers l'appareil de Golgi, pour les sauver du renouvellement induit par les lysosomes. Les neurones dopaminergiques déficients en VPS35 contiennent des endosomes / lysosomes tardifs et présentent une altération de la récupération du récepteur LAMP2A de l'endosome à Golgi. La mutation de ce gène entraîne la perte des neurones dopaminergiques et l'accumulation d' α -synucléine.

❖ Mutation du gène de l'ATP13A2

Ce gène code pour une ATPase localisée dans les compartiments membranaires acides des lysosomes, et fonctionne comme un transporteur de métaux cationiques. La mutation perte de fonction de l'ATP13A2, observée dans la MP, montre une altération du catabolisme lysosomal qui favorise l'accumulation de l' α -synucléine. Cette mutation provoque le syndrome de Kufor-Rakeb, caractérisé par un syndrome parkinsonien précoce, associé à une démence.

❖ Mutation du gène codant pour l'enzyme lysosomale GBA (β -glucosidase acide)

Cette enzyme hydrolyse le glucosylcerebroside (glucosylceramide) en ceramide (cerebroside) et en glucose.

L'accumulation de l' α -synucléine entrave le trafic ER-Golgi de GBA et inhibe directement le GBA lié à la surface de la membrane interne des vésicules lysosomales. Il en résulte ainsi une augmentation de glucosylceramide (GC) non traités, qui s'accumulent dans les lysosomes. Le GC peut favoriser la stabilisation des oligomères solubles d' α -synucléine, conduisant à une boucle de rétroaction positive, favorisant la neurodégénérescence.

Il a été observé des niveaux et une activité des protéines GBA diminuée dans les zones du cerveau où les concentrations d' α -synucléine sont élevées dans la MP débutante. Les mutations des deux allèles de GBA entraînent la maladie de Gaucher (trouble dans lequel

une sévère perte de l'activité GBA conduit à du GC qui s'accumule dans la moelle osseuse, les poumons, la rate, le foie et parfois le cerveau). En outre, les individus portant un seul allèle GBA mutant ne développent pas la maladie de Gaucher, mais ont cinq fois plus de risque de développer la MP.

La figure 3 montre que la perte de DJ-1, déclenchant une dysfonction mitochondriale liée au stress oxydatif, conduit à l'accumulation de la protéine 1 associée aux microtubules (LC3). Ceci suggère que le stress oxydatif représente un déclencheur potentiel de l'autophagie.

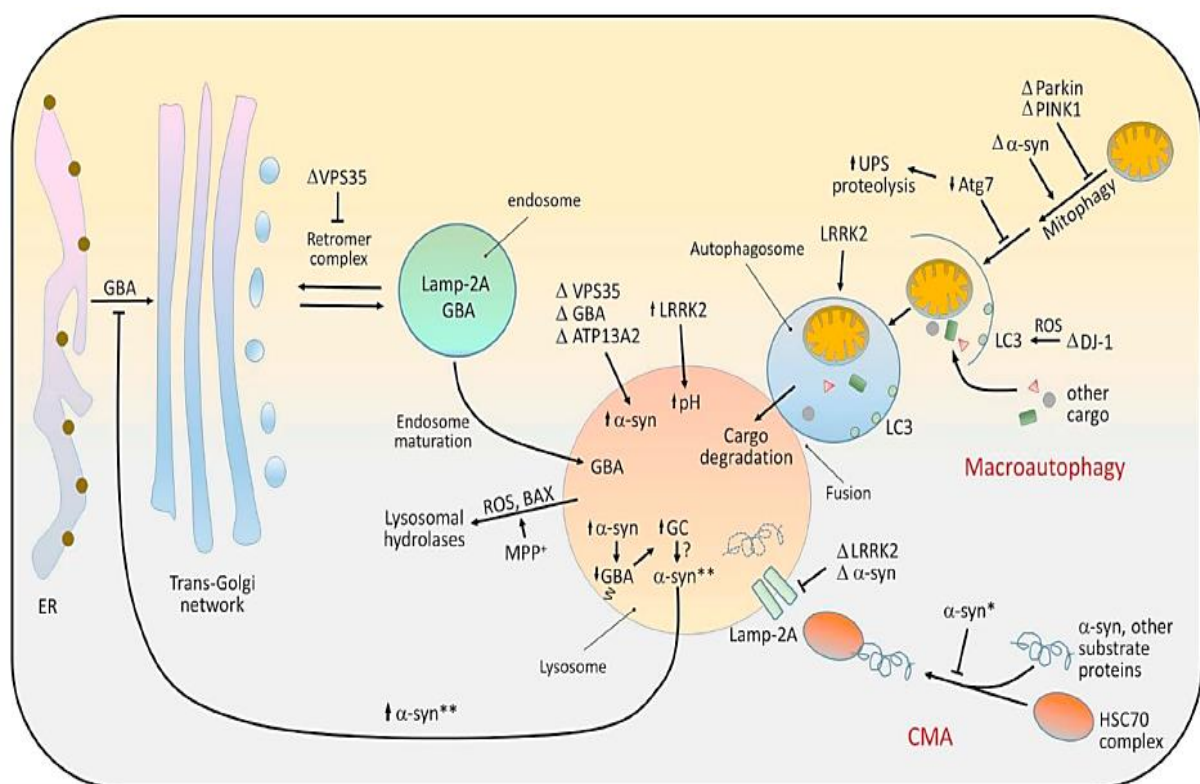


Figure 3 : Dysfonction du système autophagolysosomal dans la MP. Tiré de (10), figure 2.

2. Lien entre synucleinopathies et stress du RE

Le RE est le compartiment par lequel transitent obligatoirement les protéines sécrétées. Les protéines y subissent un contrôle de qualité qui les conduira, soit vers l'appareil de Golgi pour être sécrétées, soit vers la dégradation en cas de mauvaise conformation.

L'accumulation de protéines, dans la lumière du RE, de nature physiologique (cellules sécrétrices) ou physiopathologique (protéines mal repliées) entraîne l'apparition d'une réponse UPR (unfolded protein response). Celle-ci se met en place à partir de l'activation de trois protéines transmembranaires du RE : PERK (PKR-like ER protein kinase), ATF6 (activating transcription factor 6) et IRE-1 (inositol requiring enzyme 1). Elle a pour but d'augmenter les capacités de repliement, de maturation et de dégradation du RE. La réponse UPR est une réponse physiologique qui joue un rôle majeur dans les cellules à forte capacité sécrétrice (12). En effet, en cas de stress du RE (dû à l'accumulation d' α -synucléine mal pliée par exemple), des modifications du processus de pliage, ainsi que l'accumulation de protéines mal repliées/dépliées, apparaissent. En réponse à ces perturbations de l'homéostasie, la réponse UPR se met en place pour restaurer les fonctions cellulaires normales.

Certains résultats ont révélé que le stress du RE et l'engagement de la machine UPR, se produisent au niveau des neurones dopaminergiques de la SNc, des patients atteints de la MP (14).

3. Lien entre synucleinopathies et perturbations de la fonction mitochondriale.

Certaines preuves de l'implication des mitochondries dans la MP reposent sur des observations faites sur des échantillons de tissus de patients parkinsoniens et sur des primates et des rongeurs non humains.

Des mitochondries élargies, avec des crêtes perturbées, ont été observées sur des neurones dopaminergiques dans la SNc des patients atteints de la MP (obtenus à partir de prélèvements d'autopsie). Cela confirme que le contrôle de la qualité mitochondrial est défectueux dans la MP.

Les mitochondries jouent un rôle central puisqu'elles sont associées à de nombreuses fonctions cellulaires et notamment l'apoptose.

Le réseau mitochondrial évolue de façon dynamique, d'états allongés à fragmentés (et vice versa), grâce à une machinerie moléculaire hautement spécialisée. Celle-ci contrôle étroitement les événements de fusion et de fission, qui, respectivement, facilitent la réparation et la dégradation autophagique des organites défectueux, respectivement. Il en découle une distribution appropriée des organites, au niveau des extrémités terminales neuronales, pour permettre l'activité synaptique.

Certains gènes liés à la MP : PINK1, Parkin, ainsi que le gène de l' α -synucléine (SNCA) sont impliqués dans l'homéostasie mitochondriale et contrôlent la qualité et la dynamique mitochondriale. Ces contrôles sont essentiels pour la physiologie et la survie cellulaire. Ils impliquent les mécanismes de prévention, réparation, élimination autophagique des organites dysfonctionnels et endommagés (connus sous le nom de mitophagie) ainsi que la néosynthèse de l'ADN mitochondrial et de protéines, pour la biogenèse des mitochondries. Ces gènes participent donc au maintien fonctionnel et morphologique de la mitochondrie et régulent l'élimination des mitochondries dysfonctionnelles, grâce à la mitophagie.

Lorsque les mitochondries sont endommagées, PINK1 est recruté et s'accumule au niveau de la membrane mitochondriale externe (MME). Il recrute alors à son tour Parkin, une ligase de l'ubiquitine E3 impliquée dans la voie de dégradation du système ubiquitine/protéasome.

La mitochondrie est ensuite fragmentée et dégradée par le système ubiquitine/protéasome et livrée au lysosome pour la dégradation (mitophagie) via les autophagosomes.

De plus, les protéines de la MME (Mfn et Miro), qui participent au transport antérograde des mitochondries le long de l'axone, sont dégradées par des mécanismes dépendant de parkin et du système ubiquitine/protéasome. Leur dégradation empêche donc le transport des mitochondries endommagées vers les terminaisons axonales.

Ainsi, cette voie facilite l'élimination des mitochondries, en permettant leur isolement du réseau mitochondrial filamenteux sain et leur immobilisation dans le compartiment somatique, loin des hauts niveaux d'énergie des terminaisons axonales.

Il en résulte donc que les mutations de Parkin, PINK1 et de l' α -synucléine, retrouvées dans la MP, régulent ce phénomène et conduisent à une baisse de la mitophagie et à l'accumulation de mitochondries dysfonctionnelles.

C. Hypothèse de Braak : propagation rétrograde de l' α -synucléine et modèle « Prion like »

Ce chapitre s'appuie sur les références (11), (16), (17), (18), (19), (20) et (21).

Le repliement et l'agrégation de l' α -synucléine sont au centre de la pathogenèse de la MP. Les LB sont impliqués dans plusieurs maladies neurodégénératives appelées « synucleinopathies » comme la MP, l'atrophie multi-systématisée ou la démence à corps de Lewy. Certaines données impliquent la transmission, de cellule à cellule, de l' α -synucléine mal repliée comme mécanisme pathogène commun aux synucléinopathies (16).

Tout d'abord, Baekelandt et ses collègues ont mis en évidence l'agrégation de l' α -synucléine dans le cerveau de rats inoculés avec des oligomères, rubans et fibrilles d' α -synucléine. Après ensemencement des différents assemblages de la protéine, ils ont évalué leur propagation sur le long terme (11). L'inoculation de 40 mg de rubans et fibrilles d' α -synucléine exogène humaine a été répartie sur 3 sites d'injection dans le striatum du rat, en association avec une surexpression de l' α -synucléine par le virus recombinant adéno-associé (rAAV-mediated human α -synucléine). Après 60 jours, de grandes quantités de rubans et fibrilles ont été détectées au sein de la fraction insoluble de sarkosyl (détergent utilisé pour séparer les protéines solubles des protéines insolubles), le long de la voie striatonigrale. Ainsi, cette expérience suggère que la conformation de l' α -synucléine exogène inoculée semble s'être transmise à l' α -synucléine endogène de l'hôte. Ces protéines exogènes pourraient donc agir comme des « graines », en imprimant leurs structures intrinsèques et en causant des défauts synaptiques.

Ensuite, Baekelandt et ses collègues ont étudié la capacité des différents types d'assemblages d' α -synucléine recombinante à franchir la BHE. Suite à des injections intraveineuses bi-hebdomadaires durant 4 mois d'oligomères, rubans et fibrilles d' α -synucléine chez le rat, ils ont pu constater, par des études en imagerie, que les 3 souches étaient détectables dans le cerveau des animaux, 4 mois après les premières injections. En effet, en couplant les différentes formes d' α -synucléine avec le fluorochrome atto-647, ils ont observé un signal fluorescent au niveau du cerveau. Cela n'a pas été le cas pour les animaux contrôles, injectés avec une solution saline.

Bien que le rendement de fluorescence ait été plus élevé pour les rubans et oligomères, montrant leur franchissement plus aisé de la BHE, l'étendue de la coloration était variable.

La figure 4 montre que la fluorescence était diffuse pour les oligomères, en raison de leur masse moléculaire plus faible. A contrario, le marquage restait localisé pour les rubans et fibrilles dans le centre du système nerveux. L'histologie détaillée a montré une accumulation marquée des fibrilles α -synucléine humaines dans les neurones corticaux et dans la moelle épinière, indiquant que la propagation des fibrilles ne se limite pas à des voies intracérébrales. Il a également été observé une activation microgliale plus prononcée pour les fibrilles dans la moelle épinière, témoignant d'une lésion neuronale précoce. Les fibrilles seraient donc les plus susceptibles d'induire une pathologie de type Lewy.



Figure 4 : dépôts d' α -synucléine humaines et activation microgliale (coloration Mac1 / CD11b) au niveau du segment rachidien thoracique à faible et fort grossissement. Extrait la figure 4 de (11).

Ces résultats montrent non seulement des différences de neurotoxicité entre fibres, oligomères et rubans d' α -synucléine *in vivo*, mais aussi suggèrent que la conformation initiale de l' α -synucléine exogène a été transmise à l' α -synucléine endogène. Une fois que cette protéine désordonnée « voyou » existe et forme des agrégats LB, elle se propage de

neurone en neurone et «infecte» progressivement le cerveau, provoquant les symptômes de la MP.

De plus, il existe des preuves convaincantes que lorsque les fibrilles d' α -synucléine sont injectées directement dans le cerveau, elles peuvent se propager de manière rétrograde. En effet, des données expérimentales sont en grande partie cohérentes avec la notion selon laquelle les fibrilles α -synucléine sont préférentiellement absorbées par les terminaisons axonales et transportées de manière rétrograde vers le corps cellulaire. C'est le cas de protéines extraites du cerveau humain contenant des LB et injectées dans le striatum des singes (17).

La propagation des fibrilles α -synucléine du site d'injection vers les structures voisines se ferait donc par la connectivité synaptique. Cette combinaison de caractéristiques, qui comprend la capacité apparente des fibrilles α -synucléine à servir de modèle pour la création de nouvelles fibrilles à partir d' α -synucléine endogène, a conduit à la proposition que la MP serait un trouble de type prion.

En 1982, Stanley Prusiner a découvert que l'agent des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) était composé principalement d'une conformation mal repliée de la protéine de prion, appelée PrP^{Sc} (18). Les prions se répliquent par le mauvais repliement autocatalytique d'une protéine hôte normale (PrP^C) dans la conformation PrP^{Sc}. La maladie à prion humaine la plus courante est la MCJ (maladie de Creutzfeldt Jakob), dans laquelle 1% des cas représentent la variante acquise de la MCJ (vCJD), 85% à 90% sont sporadiques (sCJD), et environ 10% sont familiales. Plusieurs études ont révélé des différences frappantes entre la MCJ acquise et la MCJ sporadique / familiale. Dans les autopsies de la MCJ acquise, des prions ont été détectés dans le système lympho-réticulaire des amygdales, de la rate et des ganglions lymphatiques. Ce n'est pas le cas dans les formes sporadiques et familiales où les prions restent confinés dans le SNC. Ces résultats pour la MCJ variante acquise montrent que la propagation initiale de la maladie se produit dans le système nerveux autonome. En revanche, l'événement initial de mauvais repliement dans les formes sporadiques/ familiales, beaucoup plus fréquent, vient probablement d'un événement aléatoire spontané au sein du SNC.

Après une infection orale avec des prions associés à l'encéphalopathie spongiforme bovine, les agrégats de prions initiaux sont observés dans le tissu lymphoïde associé aux intestins et dans les plaques de Peyer. Souvent, les premiers agrégats de prions sont détectés dans les ganglions coeliaques-mésentériques (CMG) abdominaux, suivis du DMV (noyau moteur dorsal du nerf vague) et de l'IML (colonnes intermédiolatérales) de la moelle épinière. De ces points d'entrées initiaux, la pathologie s'étend au SNC.

L'étalement initial des prions à travers le système nerveux autonome serait très similaire à la voie de propagation de l' α -synucléine dans la MP.

La comparaison des cerveaux des patients parkinsoniens (à divers moments après le diagnostic) avec les cerveaux d'individus sans symptôme neurologique ou psychiatrique a conduit à l'hypothèse que, dans les stades précliniques de la MP, LB apparaît, dans le bulbe olfactif ou dans le noyau moteur dorsal du nerf vague (DMV) dans la moelle caudale (19). Ces 2 régions du cerveau ont des axones s'étendant à la surface du corps. Chez les patients diagnostiqués parkinsoniens, d'autres agrégations ont été retrouvées au niveau périphérique, y compris au niveau des plexus nerveux du tractus gastro-intestinal, cœur, glandes salivaires et peau. Ces sites de terminaisons nerveuses seraient les sites les plus probables du mauvais repliement aléatoire de l' α -synucléine. Des raisons non élucidées peuvent influencer ce mauvais repliement : proximité des terminaisons nerveuses aux agents exogènes et aux micro-organismes ou molécules toxiques (pesticides), déséquilibre du microbiote intestinal par exemple. Les axones de ces sites seraient exposés à l' α -synucléine responsable de LP, qui se propagerait rétrogradement aux neurones voisins. Celle-ci passerait du neurone infecté (dans le SNP) au neurone suivant, par des connexions synaptiques, jusqu'à atteindre le SNC (20).

Cette hypothèse de prion like est « séduisante » car elle postule un seul mécanisme unifié de la pathologie observée dans la MP, qui expliquerait le développement de LP chez ces patients.

L'accumulation de preuves provenant d'études animales démontre clairement les propriétés "prion like" de l' α -synucléine, y compris la propagation centripète après l'administration périphérique d'agrégats pathologiques.

Il capture également l'essence de l'hypothèse originale de Braak selon laquelle la stadification des LP résulterait d'un pathogène qui se propage de façon rétrograde dans le cerveau grâce à des connexions synaptiques (21). Cette distribution de LP se développerait au fil du temps, à partir de points de dépôts bien définis. Dans le schéma de Braak, l'évolution de LP est décomposée en six étapes, alignées avec les symptômes de la MP. La distribution de LP dans les stades présymptomatiques (1-2), les stades symptomatiques précoces (3-4) et les stades tardifs symptomatiques (5-6) donne l'impression que la LP se propage.

La figure 5 montre que la progression anatomique de la maladie à travers le cerveau augmenterait avec le temps (de gauche à droite): plus la couleur est foncée, plus la LP serait présente dans chaque région, à un stade donné.

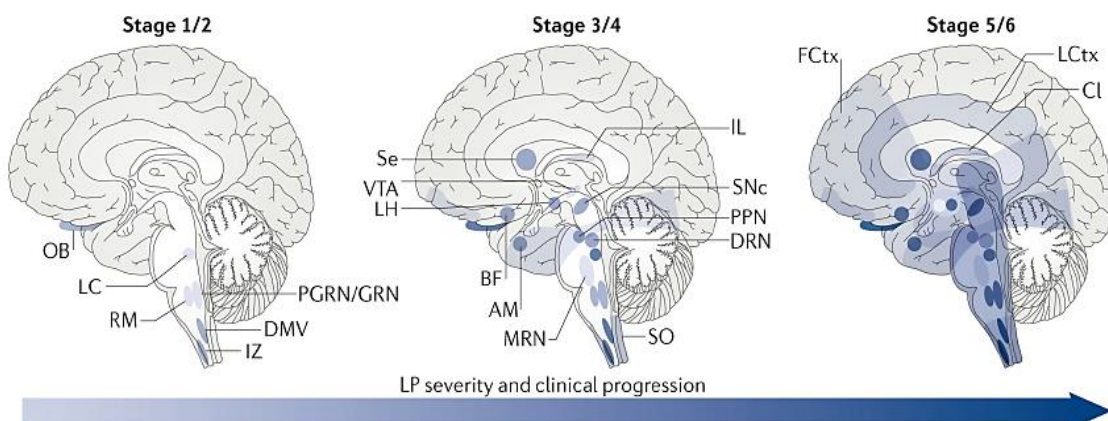


Figure 5 : Progression de la perte de cellules neuronales après l'apparition de la maladie de Parkinson clinique. Extrait la figure 1 de (16).

D. Limites du modèle "Prion like"

Ce chapitre s'appuie sur la référence (20).

La reconnaissance que la MP est distribuée, et non limitée à la SNc, a fondamentalement changé la réflexion sur la pathogenèse et son traitement. Cependant, les données humaines sur lesquelles repose cette hypothèse ont d'importantes limites (20):

1. Critère de diagnostic inadapté

Il est important de se rappeler que la LP se trouve dans plusieurs autres maladies neurologiques liées au vieillissement, qui n'ont pas les principales caractéristiques de la MP. De plus, bien que les individus atteints de la MP aient généralement une LP, ce n'est pas toujours le cas. A l'inverse, la LP est également trouvée dans le cerveau des individus sans symptômes de la MP.

Pour exemple, les mutations de LRRK2 sont la cause dominante autosomique majoritaire de la MP. Des travaux récents ont montré que, bien que les patients atteints de la MP avec la mutation LRRK2 la plus commune (G2019S) puissent manifester la LP, tous ne le font pas.

De même, les patients atteints de mutations récessives de perte de fonction - PINK1, PARK2 (qui code pour parkin) et PARK7 (qui code pour DJ1) - liées à des déficits de la fonction mitochondriale, développent un MP sensible à la L-dopa, indiquant une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNC. Cependant, l'analyse neuropathologique des cerveaux des porteurs de mutations PARK2 (forme récessive la plus courante de la MP) n'a trouvé que des LP peu distribuées chez les patients âgés, avec un profil distinct de celui des cas de MP non génétiques.

L'ensemble de ces observations permet donc de dissocier la dégénérescence de la SNC, qui est une caractéristique commune de la MP, des LP.

Cette découverte remet donc en question la proposition que la dégénérescence neuronale dans la MP est causée par une propagation de LP le long d'un réseau neuronal défini par la connectivité synaptique. De plus, il suggère que la dégénérescence neuronale dans le SNC ne dépend pas nécessairement de l' α -synucléine ou de la LP.

2. Absence de distribution au hasard

Suite à l'hypothèse de Braak, on s'est efforcé de déterminer s'il existe une concordance entre les stades cliniques et pathologiques. Cependant, seulement environ la moitié des personnes atteintes de la MP ont une distribution de LP dans le cerveau qui est compatible

avec le modèle de stadification de Braak. Cette conclusion fait valoir que, bien que les régions du cerveau sensibles à la LP soient bien définies, la séquence dans laquelle elles se manifestent et la mesure dans laquelle elles le font, ne le sont pas.

3. Absence de propagation au "plus proche voisin"

Cette règle selon laquelle la probabilité de manifester la LP est directement liée à la proximité physique d'un site d'ensemencement initial, n'est pas compatible avec le profil de LP chez les patients atteints de la MP.

La figure 6 représente la surface externe latérale d'un cerveau, identifiant les niveaux de chaque coupe transversale (figure i-v). Les régions qui montrent la LP sont représentées en rouge, tandis que celles qui ne montrent que rarement la LP, ou qui montrent seulement une LP « douce », sont indiquées en bleu.

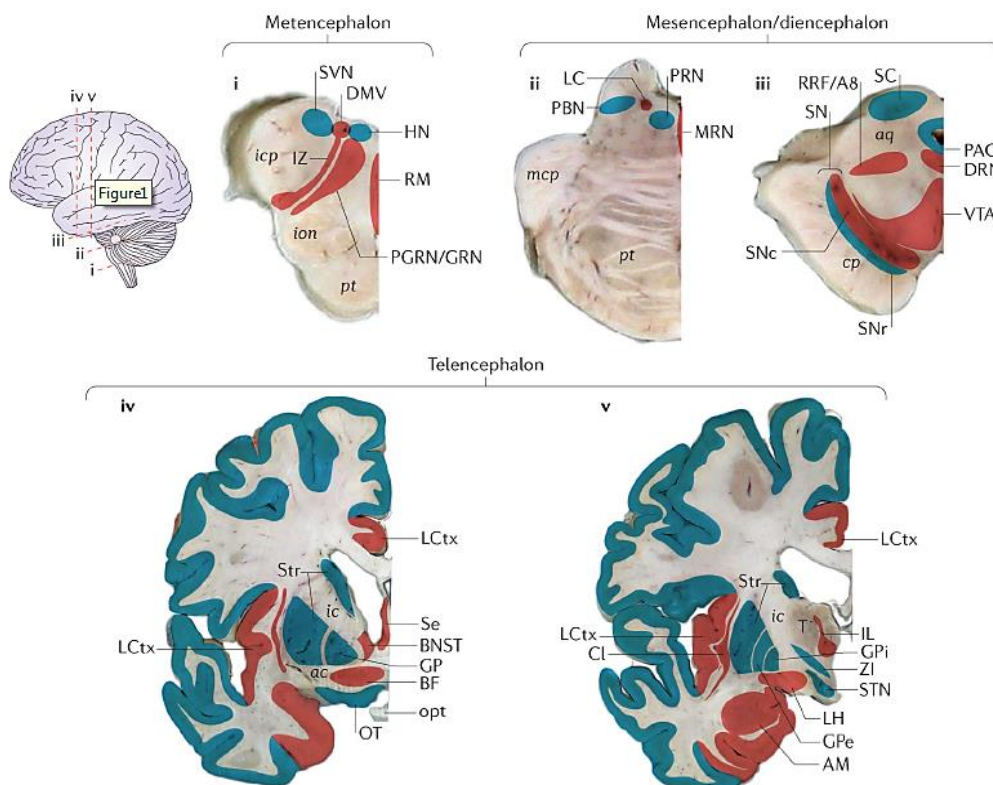


Figure 6 : Mise en scène de la pathologie de Lewy (LP) dans la maladie clinique de Parkinson. Extrait la figure 1 de (20).

Dans les stades tardifs de la maladie, représentés sur le schéma ci-dessus en *iv* et *v*, la LP dans la moelle caudale reste limitée au DMV, à la zone réticulé intermédiaire et au raphé magnus, laissant la plupart des autres noyaux de cette région apparemment non affectés. Une restriction similaire est trouvée dans le mésencéphale et le diencephale, où la LP est visible dans un groupe bien défini de neurones. De plus, dans les noyaux ou les régions affectées, seul un sous-ensemble (typiquement moins de 15%) de neurones manifeste la LP. La LP ne semble donc pas «fuir» vers les "voisins" les plus proches.

4. Absence de propagation liée à la « connectivité synaptique »

L'hypothèse, selon laquelle la propagation rétrograde de l' α -synucléine est dictée par le nombre ou la force des connexions synaptiques, est remise en question.

Les modèles de connectomes ont été observés chez la souris, puisque les données sur le connectome humain ne sont pas disponibles.

La figure 7 montre un tracé du connectome des neurones dopaminergiques de la SNc chez la souris. Le diamètre du cercle représente la force de la projection estimée par le nombre de neurones marqués de manière rétrograde. Les noyaux avec LP post-synaptique intraneuronale dans les MP de stade avancé, sont positionnés dans la case ombrée à droite et les noyaux avec peu ou pas de LP, sont sur la gauche. La figure montre que les régions ayant la connectivité la plus forte avec la SNc (le striatum et le GPe) ne présentent pas de LP importante. De plus, la plupart des grands cercles sont situés à gauche de la parcelle. Encore une fois, il n'y a pas de corrélation claire entre la force de la connexion synaptique avec la SNc et la probabilité de manifester la LP chez les humains avec la MP.

Dans le diagramme de droite, un réseau synaptique est représenté avec des neurones résistants à la propagation de l' α -synucléine (couleur bleue) et des neurones vulnérables (bleu foncé). Un événement d'ensemencement en α -synucléine entraînerait la propagation de LP d'une manière rétrograde, seulement à travers certains neurones (représentés par les

flèches). Le diagramme résume la conclusion que la propagation de l' α -synucléine n'est pas strictement déterminée par la connectivité synaptique.

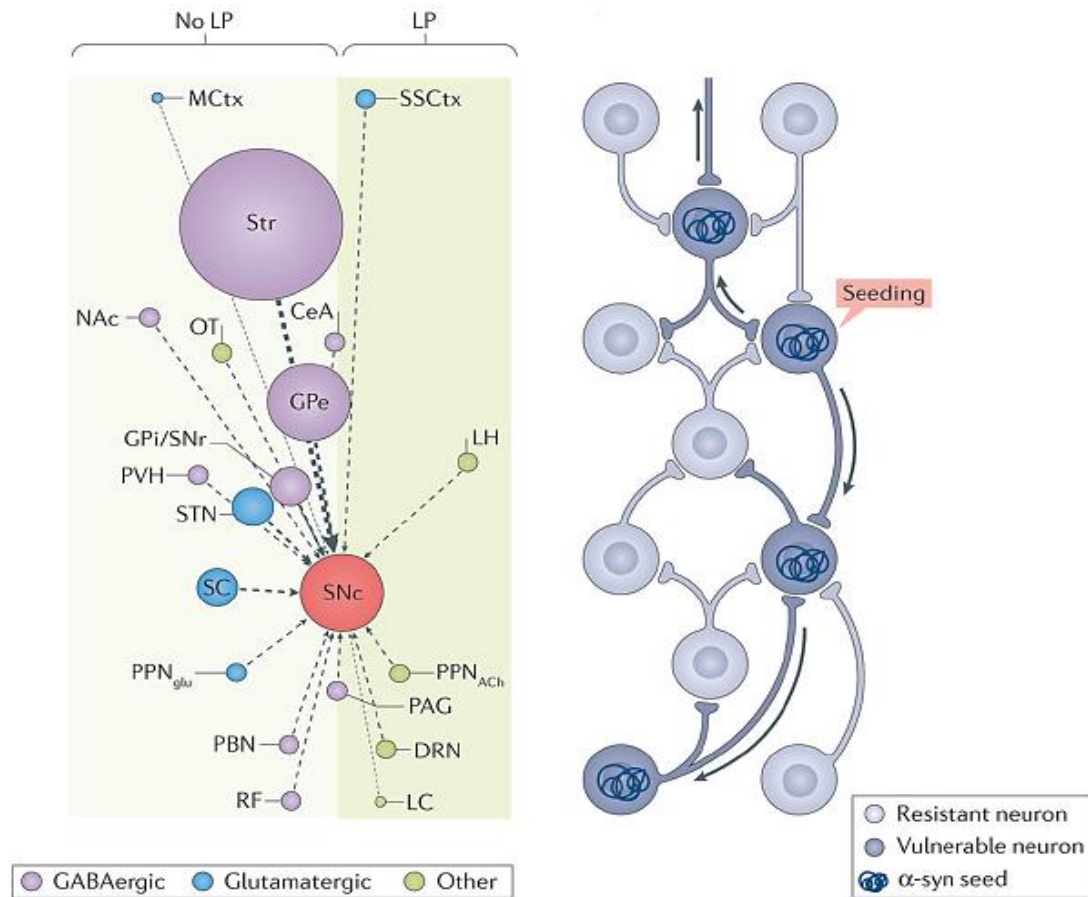


Figure 7 : A droite, représentation du connectome de la SNc chez la souris et des noyaux montrant une LP. A gauche, illustration de la propagation d' α -synucléine dans un réseau de neurones aux propriétés différentes. Extrait la figure 2 de (20).

Le point de vue dominant de l'étiologie de la MP est que la LP se propage rétrogradement dans le cerveau à travers des réseaux couplés synaptiquement, entraînant la mort neuronale et des manifestations cliniques. Cependant, la distribution de la pathologie et le déclenchement de la mort neuronale dans le cerveau des patients atteints de la MP n'est pas cohérente avec ce modèle. Si la LP se propage trans-synaptiquement dans la MP, néanmoins son étendue diffère selon la région ou le type cellulaire. Aussi, compte-tenu de la capacité de nombreux neurones à tolérer les LB durant des décennies, il est évident que l'émergence de la LP seule ne provoque pas la mort cellulaire.

Comme mentionné précédemment, l' α -synucléine peut compromettre les systèmes d'autophagie et mitochondriaux, créant des points de basculement, au-delà desquels la mort cellulaire se produirait. La protéine représenterait donc un facteur de risque de mort neuronale, mais, elle seule ne l'induirait pas.

Si la mort neuronale n'est pas seulement une conséquence de la propagation ou de l'agrégation de l' α -synucléine mal repliée à travers le connectome du cerveau, alors qu'est-ce qui la dicte?

L'effort, pour répondre à cette question, a mis l'accent sur le contexte cellulaire et les caractéristiques distinctives des neurones qui meurent prématurément dans la MP, ou qui manifestent les LB.

III. Vulnérabilité neuronale calcium-dépendante des neurones dopaminergiques de la SNc dans la MP

A. Mort sélective des neurones dopaminergiques de la SNc

Ce chapitre s'appuie sur les références (22), (23), (24), (25) et (26).

1. Rappel sur la physiopathologie des ganglions de la base

Dans la MP, les lésions neuronales sont concentrées sur une petite zone du tronc cérébral appelée *locus niger* ou substance noire en raison de sa pigmentation (22).

La substance noire appartient à un ensemble de structures nerveuses appelées collectivement ganglions de la base. Ces derniers se composent du noyau caudé et du putamen formant le néostriatum et le globus pallidus (ou pallidum) divisé en deux parties : interne (GPi) et externe (GPe). Ils sont étroitement interconnectés avec le noyau sous thalamique (STN) et avec la substance noire composée d'une zone réticulée ventrale (*pars reticulata*, GABAergique) et d'une zone compacte dorsale et pigmentée de noir (*pars compacta*, dopaminergique).

Ces cinq structures nerveuses, associées aux différentes aires du cortex moteur, au cervelet et aux noyaux moteurs du tronc cérébral, participent au contrôle de la motricité, bien qu'aucune d'elles n'ait de connexion directe avec la moelle épinière. Le flux d'information général va du cortex vers les ganglions de la base, où le néostriatum (noyau caudé et putamen) constitue la voie d'entrée. Le GPi et la SNr sont les principaux points de sortie vers le thalamus, qui renvoie vers le cortex prémoteur et supplémentaire. Ces derniers sont chargés de la programmation et de l'exécution du mouvement.

Le circuit des ganglions de la base se compose de 3 boucles, dont les rôles respectifs sont classiquement décrits comme suit :

➤ Boucle A cortico-thalamo-corticale : elle descend vers le tronc cérébral et la moelle épinière et s'exprime dans les commandes motrices.

➤ Boucle B :

- Directe (B) : elle se caractérise par des projections GABAergiques du striatum vers le GPi et la SNr. Les influx sont à l'origine d'une inhibition de l'activité du GPi et de la SNr, qui conduit à lever l'inhibition que ces noyaux exercent sur le thalamus, dont l'activité se trouve renforcée. Cette désinhibition est à l'origine de l'élaboration du mouvement et de l'exécution du programme désiré (23).

L'information va donc du cortex au striatum, qui la redirige vers la SNr et le GPi. Ces derniers projettent ensuite l'information vers le thalamus, avant de former une boucle vers le cortex frontal.

- Indirecte (B') : la voie indirecte comporte par rapport à la voie directe une étape supplémentaire, qui implique le GPe et le STN. Des projections inhibitrices partent du striatum vers le GPe, puis vers le STN. L'activation du striatum freine l'activité du GPe qui n'exerce plus d'inhibition sur les neurones du STN. La levée de l'inhibition se traduit par une stimulation des neurones du GPi et de la SNr qui freinent l'activité du thalamus. Cette voie permet donc l'arrêt de l'exécution d'un programme.

- Boucle C nigro-striée : La SNc, composée de neurones dopaminergiques, reçoit des projections du cortex et de nombreuses autres zones cérébrales. Certains neurones dopaminergiques de la SNc stimulent les neurones du striatum porteur de récepteurs de type D1. Cela conduit à stimuler l'activité de ces neurones et donc à renforcer l'activité du thalamus. D'autres neurones dopaminergiques de la SNc stimulent les neurones du striatum équipés de récepteurs de type D2. L'activité de ces neurones est freinée et s'oppose donc aux effets de la boucle indirecte. La SNc renforce l'activation corticale en soutenant la boucle directe (B) aux dépens de la boucle indirecte (B').

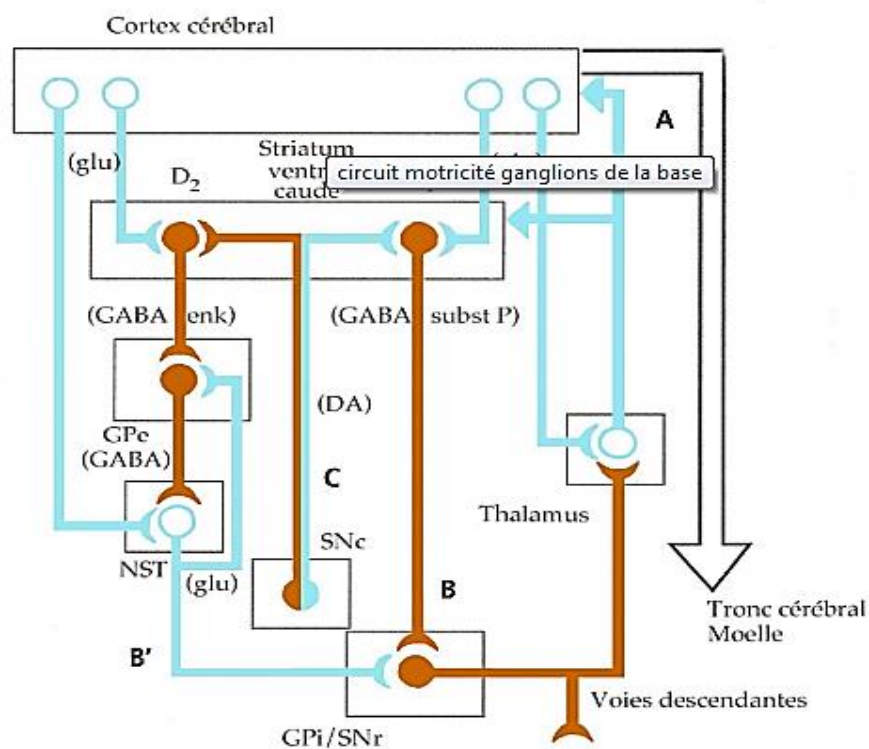


Figure 8 : Schéma général du contrôle de la motricité par les ganglions de la base. D'après (22).

Dans la MP, la raréfaction des neurones dopaminergiques de la SNc explique le fait que la boucle nigro-striée n'active plus aussi efficacement la voie directe B et ne freine plus aussi efficacement la voie indirecte B'. L'activité thalamo-corticale est ainsi inhibée, expliquant

l'akinésie retrouvée dans la MP. La carence en DA entraîne une dépolarisation des neurones cholinergiques du striatum, qui déchargent des bouffées rythmiques à la fréquence des tremblements. Une rigidité des muscles est la conséquence d'une mauvaise commande des muscles antagonistes.

Les neurones sont de nature vulnérable. En effet, le cerveau contient environ 50% de neurones; le reste étant constitué de glie (astrocytes, microglies, oligodendrocytes) et de vaisseaux sanguins. Les neurones sont post-mitotiques et ne se régénèrent pas (à l'exception de certains neurones de l'hippocampe et de quelques autres structures comme le bulbe olfactif). Ils doivent donc durer toute une vie.

Par conséquent, tous les problèmes homéostatiques pouvant être présents dans les neurones sont cumulatifs au cours de la vie d'un individu (24).

L'environnement des neurones dopaminergiques au niveau de la SNc est responsable du vieillissement et de l'augmentation de la vulnérabilité de ces neurones. Cette dernière est directement liée aux caractéristiques bioénergétiques et morphologiques des neurones (25).

2. Comparaison de la mort des neurones dopaminergiques de la SNc et de l'ATV

Il existe un phénomène de mort sélective entre les neurones de la SNc ciblés et les neurones dopaminergiques voisins de l'ATV épargnés.

Des approches électrochimiques et d'imagerie ont été requises pour étudier les changements métaboliques dans les neurones dopaminergiques cultivés du mésencéphale de souris, et exposés à une neurotoxine parkinsonienne : le MPTP (26). Le MPTP est métabolisée par l'astroglie en toxine active : le MPP+.

MPP+ provoque les symptômes permanents de la MP en détruisant certains neurones de la SNc. Il possède la capacité de détruire sélectivement les neurones dopaminergiques en raison d'une grande affinité d'absorption par les terminaisons nerveuses. En effet, le

transporteur de la dopamine DAT entraîne le MPP⁺ à l'intérieur de la cellule, lors du processus normalement utilisé pour la recapture de la dopamine.

MPP⁺ détruit essentiellement les neurones dopaminergiques dans une partie du cerveau : la SNc. Il interfère avec le complexe I de la chaîne respiratoire : cela conduit à la mort cellulaire et provoque l'accumulation de radicaux, de molécules toxiques, contribuant ultérieurement à la destruction des neurones.

La figure 9 montre que la neurotoxicité dans la SNc est supérieure à celle observée dans les neurones de l'ATV.

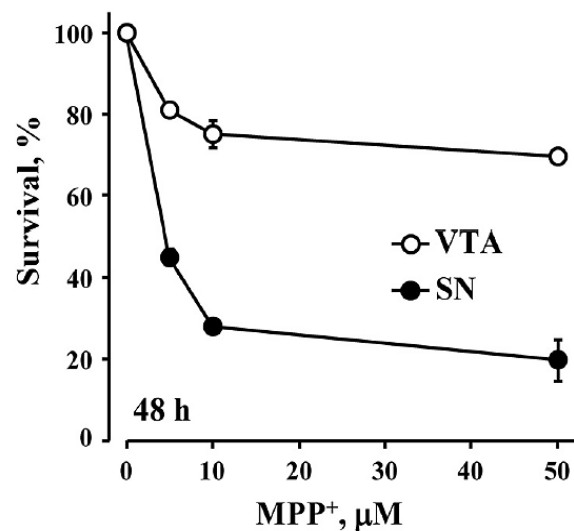


Figure 9 : Neurotoxicité après exposition de 2 jours de cultures primaires de neurones SNc et ATV de souris à différentes concentrations de MPP⁺. Les neurones dopaminergiques ont été comptés après fixation et immunoloration par TH. Extrait la figure 1 de (26).

L'exposition des neurones du mésencéphale ventral, cultivés en présence d'une gamme de concentrations de MPP⁺, a confirmé que, comme *in vivo*, les neurones de la SNc sont beaucoup plus sensibles à la toxine que les neurones de l'ATV.

Des différences significatives ont également été observées au cours du temps de toxicité: la plupart des décès cellulaires surviennent le premier jour d'exposition dans les neurones ATV, et à plus de 3 jours dans les cultures SNc.

3. Hypothèses de mort sélective

Les hypothèses sur la façon dont la MPP+ conduit à la mort sélective des neurones de la SNc peuvent être regroupées en 2 catégories impliquant des facteurs extraneuronaux et intraneuronaux.

L'hypothèse de l'implication des facteurs extraneuronaux en faveur de la mort neuronale a été rejetée.

Cette hypothèse soutenait que la toxicité accrue résultait d'une concentration intracellulaire plus élevée de MPP à l'intérieur des neurones de la SNc. Elle pouvait être due majoritairement à des facteurs extraneuronaux, dont une augmentation d'absorption de la toxine liée à plus de DAT dans la SNc que dans l'ATV (26).

Les données plaident contre cette raison unique. En effet, l'analyse de l'absorption d'APP (analogue structurel fluorescent de MPP+), qui s'accumule sélectivement dans les cellules dopaminergiques *via* DAT, a révélé que les neurones de la SNc possèdent une activité DAT 40% plus élevée que les neurones de l'ATV.

De plus, l'utilisation de gamme de concentrations de nomifensine pour bloquer partiellement le DAT et empêcher la recapture de la dopamine, a permis de comparer l'absorption et la neuroprotection vis-à-vis de l'APP, un analogue fluorescent du MPP+ des neurones de la SNc.

La concentration de nomifensine nécessaire pour bloquer l'absorption de la moitié d'APP (CI50 de 250 nM) est beaucoup plus faible que celle nécessaire pour obtenir un effet demi-maximal sur la survie cellulaire (2 M). En fait, la concentration de la nomifensine, baissant l'activité de la DAT dans les neurones de la SNc, a diminué la toxicité de seulement 10%.

Ainsi, si le DAT est nécessaire pour médier la toxicité de MPP+, des facteurs intrinsèques peuvent jouer un rôle plus important dans la sensibilité différentielle des neurones dopaminergiques de la SNc et de l'ATV.

B. Implication des facteurs intrinsèques dans la vulnérabilité sélective des neurones dopaminergiques de la SNc

Ce chapitre s'appuie sur les références (20), (25), (27), (28), (29), (30), (31), (32) et (33).

1. Champ axonal étendu

La spécialisation des neurones, c'est-à-dire la neurotransmission, les rend particulièrement vulnérables par rapport aux autres types de cellules. C'est notamment le cas pour les neurones de projection qui relient différentes régions du cerveau, par opposition aux interneurones courts. Les neurones de projection ont de longs axones fins avec de grands champs dendritiques et synaptiques et sont souvent faiblement myélinisés.

Les neurones vulnérables ont un rôle fonctionnel connecté dans le cerveau (20). Ce sont des neurones principaux dans les réseaux de neuromodulation de contrôle. En effet, leur projections axonales diffuses régulent d'autres neurones, en libérant des émetteurs (tel que la DA), qui activent « lentement » les récepteurs couplés aux protéines G. A l'inverse, les neurones des réseaux cérébraux, responsables des sensations et du contrôle moteur précis, ont une connectivité synaptique restreinte et s'appuient sur des neurotransmetteurs classiques, qui activent les récepteurs ionotropiques rapides.

Bien qu'il y ait eu relativement peu de «phénotypage profond» des neurones dans ces réseaux neuromodulateurs, ces neurones partagent plusieurs traits qui pourraient les rendre vulnérables à l'âge, aux mutations génétiques et aux toxines.

Le trait le mieux caractérisé est un axone long et fortement ramifié, avec un très grand nombre de sites de diffusion de neuromodulateur. Cette terminaison axonale diffuse aide les neurones à coordonner leurs activités dans des réseaux spatialement distribués, tels que les ganglions de la base ou la moelle épinière. Les neurones dopaminergiques de la SNc ont un champ axonal très grand (longueur 470000 μ m), chaque axone supporte 370000 synapses (27). Chez le rongeur, les axones se ramifient abondamment dans le striatum et possèdent jusqu'à 200 000 sites de libération. Ces neurones se distinguent donc des neurones

sensoriels ou moteurs dans le cerveau ayant généralement des axones modestement ramifiés.

L'hypothèse, selon laquelle l'arborisation axonale inhabituellement grande est associée à une vulnérabilité neuronale, est certaine. Des demandes particulièrement élevées en ATP sont nécessaires pour soutenir la neurotransmission le long des axones. En effet, les composants cellulaires ont un long chemin à parcourir entre le corps cellulaire et la terminaison axonale.

La charge protéostatique (qui définit la charge métabolique pour maintenir l'homéostasie protéique) est augmentée au niveau des terminaisons nerveuses. La concentration en mitochondries au niveau du soma est faible, et forte au niveau axonale pour permettre de répondre aux besoins énergétiques au niveau des axones.

La surexpression virale de DsRed2-mito (protéine fluorescente rouge spécifique des mitochondries) a permis de visualiser la distribution et la densité du réseau mitochondrial dans les neurones dopaminergiques. La figure 10 montre que celle-ci est 2 fois plus élevée dans le compartiment axonal des neurones dopaminergiques de la SNc que dans les neurones dopaminergiques de l'ATV (25). Or, il n'y a pas une telle différence dans le compartiment dendritique ou dans le corps cellulaire. Ce résultat suggère que la densité de mitochondries est augmentée uniquement dans cet espace axonal restreint.

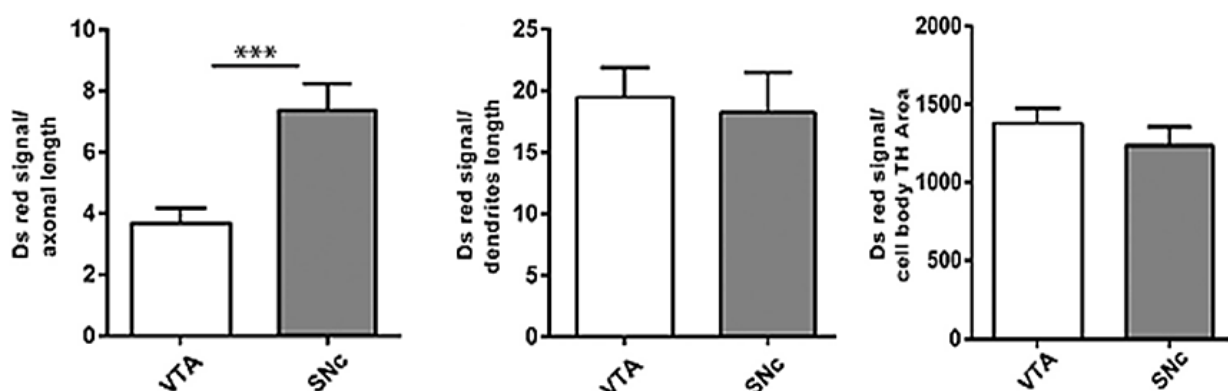


Figure 10 : Densité des mitochondries au niveau des axones, dendrites et corps cellulaires de neurones dopaminergiques de la SNc et de l'ATV en culture. Extrait la figure 4 de (25).

Une théorie implique le stress mitochondrial comme moteur potentiel de la neurodégénérescence. Ce stress serait réduit avec des tailles de l'arbre axonal réduites ; il serait donc élevé au niveau des axones des neurones dopaminergiques de la SNc.

Des travaux récents ont démontré l'expression de Sema7A (protéine jouant un rôle central dans le guidage axonal, la régénération axonale et le développement de certains tissus) dans le mésencéphale ventral et l'importance de ce facteur pour l'arborisation axonale des neurones dopaminergiques (28).

La figure 11 montre que l'expression de Sema7A réduit significativement la taille de l'arborisation axonale des neurones dopaminergiques de la SNc (46%), mais pas celle des neurones dopaminergiques de l'ATV. Aussi, la consommation d'oxygène basale est significativement réduite (39%) dans les neurones dopaminergiques de la SNc traités avec Sema7A (figure 11).

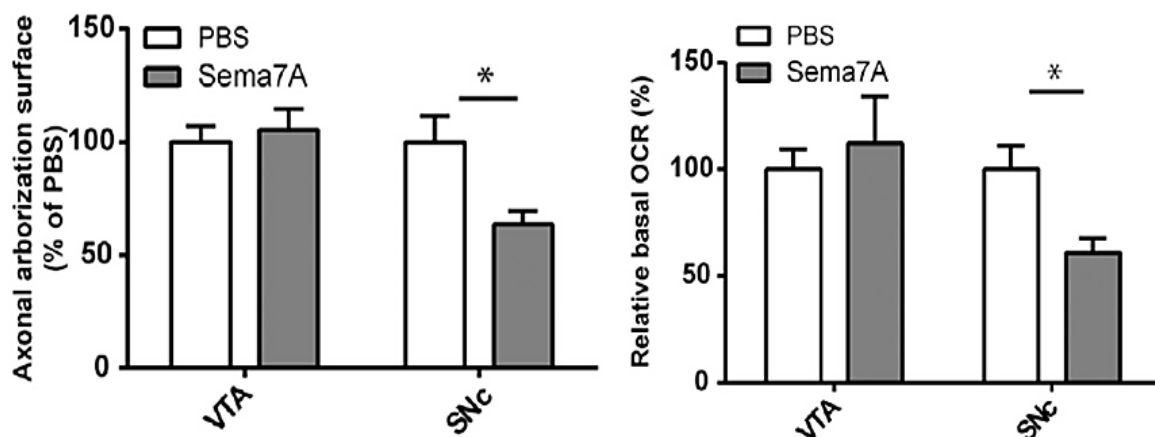


Figure 11 : Quantification de la surface d'arborisation axonale et effet du traitement par sema7a sur le taux de consommation d'oxygène basale. Sema7A réduit la taille de l'arborisation axonale, la consommation d'oxygène basale, la production de ROS et la vulnérabilité des neurones SNc DA. Extrait la figure 7 de (25).

Une consommation basale d'oxygène élevée permet de maintenir l'exocytose et le gradient ionique le long des axones. En contrepartie, cette demande soutenue d'énergie est à associée à une phosphorylation oxydative et à une production de ROS/superoxyde élevée.

Cette manipulation de l'arborisation axonale des neurones dopaminergiques par le gène *sema7A* montre que la vulnérabilité sélective de ces neurones est peut être due, en partie, à leur plus grande arborisation axonale.

Cela dit, tous les neurones avec de longs axones ramifiés ne sont pas vulnérables dans la MP. Par exemple, les interneurons cholinergiques striataux possèdent des axones fortement ramifiés avec autant de sites de libération que les neurones dopaminergiques de la SNC. Cependant, ils ne dégènèrent pas ou ne manifestent pas de LB dans la MP.

Ainsi, une grande arborisation est un facteur à risque de stress oxydatif élevé, mais n'est pas suffisante à elle seule pour induire la pathogénèse.

2. Activité pacemaker autonome dépendante des canaux calciques voltage-dépendants de type L (LCCVD)

Une hypothèse récente suggère que les neurones dopaminergiques de la SNC, qui dégènèrent dans la MP, sont particulièrement vulnérables parce qu'ils ont une activité pacemaker autonome dépendante des LCCVD. Activité pacemaker autonome signifiant que la génération du potentiel d'action des neurones se fait en l'absence d'entrée synaptique excitatrice.

L'activité pacemaker de la plupart des neurones repose exclusivement sur une activité médiée par des canaux cationiques monovalents de type Na^+ . Par exemple, les neurones dopaminergiques de la région ATV adjacente à la SNC, moins affectés par la neurodégénérescence, reposent plutôt sur l'entrée d'ions Na^+ pour le maintien des oscillations de conductance. A l'inverse, les neurones de la SNC et du noyau DMV utilisent les LCCVD pour générer une activité pacemaker, bien qu'une activité pacemaker basée sur des canaux Na^+ , K^+ , et non spécifiques (de fuite et HCN) exprimés à la membrane du soma, des dendrites proximaux et du segment initial de l'axone, se maintiennent quand les canaux LCCVD sont spécifiquement inhibés (29). Ces canaux LCCVD sont appelés « voltage-dépendants » car leur ouverture est activée par la dépolarisation membranaire. Ils permettent l'entrée du Ca^{2+} dans les cellules excitables.

Les LCCVD font partis des canaux calciques HVA (high voltage activated), qui s'activent pour de fortes dépolarisations et qui s'inactivent plus lentement. La caractéristique pharmacologique essentielle des LCCVD est leur sensibilité aux antagonistes calciques et, en particulier, à ceux de la classe des DHP (30).

a) Caractéristiques structurelles des LCCVD

Le canal lui-même est formé par la sous-unité α_1 . Cette sous-unité se compose du pore avec un filtre sélectif ionique. Elle est constituée de 4 domaines avec 6 segments transmembranaires. Les segments S5 et S6 forment le pore du canal. Le segment S4 (chargé positivement) est le senseur de potentiel. Des sites de liaison aux drogues se situent au niveau des hélices (notamment ceux des DHP). Des sous-unités auxiliaires γ sont associées pour permettre de réguler l'expression et les caractéristiques biophysiques de la sous-unité α_1 . La sous-unité α_2 extra-cellulaire est reliée à la sous-unité δ intra-membranaire par des ponts disulfures. Notons aussi la présence de la sous-unité γ transmembranaire et de la sous-unité β cytosolique (31).

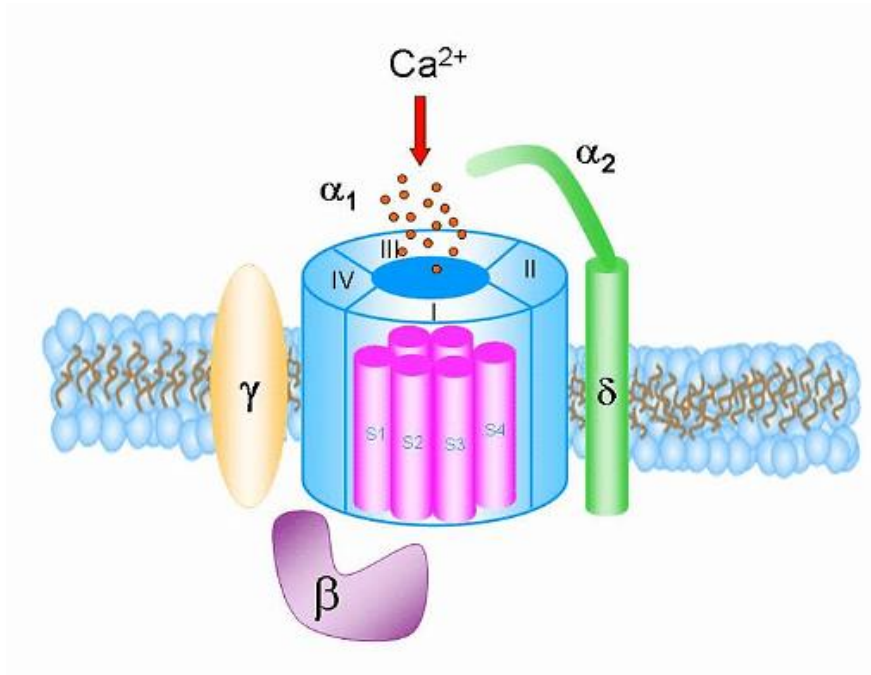


Figure 12 : Structure d'un canal calcique. D'après (31).

b) Expression spécifique des LCCVD des neurones dopaminergiques de la SNc

Les 4 sous types de LCCVD (CaV1.1, CaV1.2, CaV1.3, CaV1.4) sont retrouvés dans les neurones, le nœud sinusal, les cardiomyocytes auriculaires et les cellules chromaffines rénales. Les canaux CaV1.2 et CaV1.3 sont les 2 sous-types prédominants de LCCVD dans le SNC. Les canaux CaV 1.2 sont activés à un seuil plus dépolarisé que les canaux CaV1.3. Ces deux sous-types sont retrouvés au niveau somatodendritique en post synaptique dans la SNc (24) . Ils ont une distribution étendue dans tout le cerveau, alors que les canaux CaV1.1 et CaV1.4 ne sont exprimés respectivement que dans le muscle squelettique et la rétine. Bien qu'il y ait de très faibles niveaux de transcrits de CaV1.1 et CaV1.4 (détectés par PCR) dans le cerveau, leur signification fonctionnelle est incertaine et leur détection peut être due à la haute sensibilité de la PCR et la présence d'autres types cellulaires (par exemple les lymphocytes).

c) Activité des LCCVD

L'observation des neurones dopaminergiques de la SNc montre un potentiel d'action large, lent et rythmique (2-10 Hz), entraîné par l'ouverture des LCCVD et accompagné par de grandes oscillations de la concentration intracellulaire de Ca²⁺. Ces neurones génèrent un potentiel d'action sans entrée synaptique permettant le maintien des niveaux de dopamine, appelé tonus dopaminergique, des régions innervées par ces neurones (par exemple, dans le striatum).

Les deux isoformes CaV1.2 et CaV1.3 régulent l'excitabilité neuronale et la plasticité synaptique. Ils transportent du Ca²⁺ (dépolarisant) vers l'intérieur de la cellule et augmentent le Ca²⁺ libre intracellulaire, servant de second messenger pour de nombreuses voies de signalisations dépendantes du Ca²⁺ (32). Ces canaux contrôlent ainsi de nombreux processus cellulaires comme la libération des neurotransmetteurs, la survie neuronale, l'activation des kinases, la croissance des neurites et la transcription génique par l'afflux de calcium dans les neurones, suite à la dépolarisation membranaire, ou par le calcium libéré des réserves intracellulaires.

d) Ségrégation fonctionnelle entre les canaux CaV1.2 et CaV1.3

Malgré la forte similitude structurelle de leur sous-unité $\alpha 1$ au niveau du pore, les canaux CaV1.2 et CaV1.3 montrent une ségrégation fonctionnelle avec des propriétés biophysiques et des fonctions physiologiques différentes (33):

- Canaux CaV1.2 : Le flux de Ca^{2+} apparaît lors des pics de dépolarisation. Ils sont couplés aux canaux K^+ .

- Canaux CaV1.3 : Ils sont rares et ne représentent que $\frac{1}{4}$ des LCCVD. Ils s'ouvrent à un potentiel de membrane plus hyperpolarisé que les canaux CaV1.2. Leur activité n'est pas nécessaire à la génèse du potentiel d'action. En effet, lorsque ces canaux sont bloqués avec des antagonistes DHP, l'activité neuronale se poursuit. Ils ont la capacité d'accélérer le passage à la dépolarisation et de contribuer indirectement à l'influx de Ca^{2+} pendant la décharge neuronale. Ils ont donc un rôle de « soutien ». Contrairement aux autres neurones, les canaux CaV1.3 de la SNc sont quasiment ouverts la plupart du temps avec une magnitude et une étendue plus large.

L'influx de Ca^{2+} transite donc majoritairement à travers les canaux CaV1.2 responsables de la dépolarisation. Les canaux CaV1.3 maintiennent le flux de calcium infraliminaire.

C. Mise en jeu du Ca^{2+} et dysfonction mitochondriale

Ce chapitre s'appuie sur les références (20), (25), (26) (29), (34) et (35).

Les oscillations Ca^{2+} cytosoliques lentes dans les neurones dopaminergiques de la SNc ont 3 fonctions complémentaires (29).

Tout d'abord, elles aident à maintenir une activité électrique autonome lente dans ces neurones. Puis, le Ca^{2+} module positivement l'expression et l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse de la DA, assurant ainsi l'adéquation entre l'offre et la demande

du neurotransmetteur. Enfin, l'augmentation de Ca^{2+} cytosolique est responsable de l'entrée de Ca^{2+} dans la mitochondrie.

1. Coût énergétique élevé

L'un des inconvénients majeurs d'un système d'alimentation bioénergétique à médiation calcique est qu'il entraîne une élévation soutenue du Ca^{2+} cytosolique. Celle-ci fournit une charge d'énergie conduisant à "l'usure" des machines homéostatiques cellulaires. Le coût bioénergétique de la séquestration du Ca^{2+} est important, car le pompage de Ca^{2+} , ion divalent, nécessite un transport actif. Ces gradients sont entretenus par des pompes dépendantes de l'ATP, dont l'engagement prolongé crée une charge bioénergétique coûteuse pour les cellules.

L'utilisation d'ions Ca^{2+} , plutôt que d'ions Na^{+} , pour le pacemaker, nécessite beaucoup plus de dépense énergétique pour maintenir une concentration de Ca^{2+} intracellulaire sûre et non toxique. En effet, Le gradient électrochimique des ions Ca^{2+} à travers les membranes cellulaires est 1000 fois plus grand que celui des ions monovalents. Ainsi, tout processus qui utilise du Ca^{2+} dans la cellule est très exigeant en énergie et nécessite un coût métabolique important. La fonction mitochondriale doit être efficace, associée à une bonne capacité tampon du Ca^{2+} , afin de prévenir les dommages liés au stress oxydatif ou à l'excitotoxicité. Or le pouvoir tampon des neurones de la SNc vis-à-vis du Ca^{2+} est faible.

Une expérience a été réalisée pour comparer le métabolisme énergétique des neurones dopaminergiques de la SNc à ceux des neurones dopaminergiques de l'ATV (25).

Un rapport de contrôle respiratoire (entre oxygène basal et maximal) a été réalisé. Les résultats ont montré qu'il était inférieur de 19,3% dans les neurones à dopamine de la SNc à ceux de l'ATV.

Les neurones de la SNc sont proches de leur capacité maximale de production d'énergie mitochondriale à l'état basal et moins capables que d'autres neurones dopaminergiques d'augmenter, si besoin, leur production d'énergie.

Ils ont significativement une respiration mitochondriale basale et une teneur élevée en ATP par rapport aux neurones de l'ATV.

Aussi, l'observation que les neurones dopaminergiques dégénératifs de la SNc sont principalement dans les zones à faible niveau de protéine calbindin-D28k de liaison de calcium, a suggérée un rôle pour le Ca²⁺ dans la susceptibilité neuronale.

Les neurones dopaminergiques de l'ATV, moins vulnérables, ont un pacemaker autonome à large potentiel d'action, mais aussi des courants Ca²⁺ à travers les LCCVD plus petits et de nombreuses protéines tampon du Ca²⁺ (la calbindine). Bien qu'il y ait très peu d'études examinant ces caractéristiques dans d'autres neurones vulnérables de la MP, celles qui ont étudié le LC, le DMV et le PPN, montrent que ce phénotype est largement partagé.

2. Stress oxydant mitochondrial

Le transfert du Ca²⁺ entre le cytosol et les mitochondries se fait, directement ou non, par l'intermédiaire du pore du calcium mitochondrial (mitochondrial calcium unipore, MCU). Indirectement, le Ca²⁺ est d'abord pompé du cytosol vers le RE par l'intermédiaire de la pompe ATPase SERCA (pompe à Ca²⁺ permettant le pompage des ions Ca²⁺ du cytosol vers la lumière du RE) puis transféré vers la mitochondrie, par activation séquentielle du récepteur IP3 et du MCU (20).

L'entrée de Ca²⁺ mitochondrial stimule la phosphorylation oxydative et la production d'ATP.

En principe, le contrôle de la phosphorylation oxydative permet d'assurer que les besoins bioénergétiques sont satisfaits et que les niveaux d'ATP intracellulaires ne tombent pas dans une plage qui déclencherait une activation protectrice des canaux KATP, causant la cessation de l'activité en cours. Ce ralentissement entraînerait une baisse des niveaux striataux de DA et la désinhibition de la voie indirecte des neurones striataux, qui supprimerait ou arrêterait le mouvement.

Cependant, ce système de contrôle bioénergétique a un coût.

La stimulation de la phosphorylation oxydative en l'absence de fortes demandes d'ATP (la plupart du temps) entraîne une hyperpolarisation mitochondriale avec un flux d'électrons

rétrograde, à travers la chaîne de transport des électrons. L'hyperpolarisation et l'état de réduction élevé de la chaîne respiratoire favorisent la production d'anions superoxydes convertis en H₂O₂ (34). La persistance de l'inhibition des complexes et de la production de ROS, en présence d'une augmentation de NO (monoxyde d'azote), aboutit à un effondrement des systèmes antioxydants (glutathion réduit). Dans ce contexte, l'ouverture du pore est facilitée, avec pour corollaire, dissipation du potentiel de membrane, trouble de perméabilité, libération de facteurs proapoptotiques et mort cellulaire par apoptose ou nécrose.

Les ROS peuvent endommager les protéines, les lipides et l'ADN, en particulier dans les mitochondries. Le stress oxydant mitochondrial soutenu pourrait être un facteur favorisant le déclin de la fonction mitochondriale dans les neurones à risque, chez les personnes âgées. Cette perte de fonction - en conséquence de l'accumulation de dommages oxydants - a été proposée comme facteur principal du déclin de la viabilité neuronale lié au vieillissement (35).

Dans les deux cas, le stress oxydant mitochondrial en cours, dans les neurones dopaminergiques de la SNC, peut conduire à une augmentation du taux de renouvellement des organites par la mitophagie. Le déclin, lié au vieillissement, de la capacité à recycler les mitochondries affaiblies, pourrait entraîner une sénescence prématurée et la mort des cellules. De plus, un besoin accru d'éliminer les mitochondries endommagées pourrait compromettre d'autres fonctions protéostatiques, notamment la dégradation des protéines mal repliées, comme l' α -synucléine.

Enfin, le Ca²⁺ favorise l'agrégation de l' α -synucléine puisque la calpaïne protéase dépendante du Ca²⁺ clive la terminaison carboxyle de la protéine, favorisant son agrégation. Ceci est renforcé par le stress oxydatif. Chez l'animal, l'inhibition de la calpaïne réduit nettement la toxicité neuronale de la surexpression ou de la mutation de l' α -synucléine. Fait intéressant, les oscillations de Ca²⁺ et l'incubation avec des fibrilles α -synucléine créent un stress oxydant cytosolique pouvant se combiner avec le stress oxydant mitochondrial dans les neurones dopaminergiques de la SNC. Pour aggraver les choses, la protéine phosphatase calcineurine dépendante du Ca²⁺ favorise la toxicité α -synucléine.

Les caractéristiques des neurones vulnérables sont divisées en 2 classes:

a) Charge de Ca²⁺ et / ou dysfonction mitochondriale
(rouge)

Les neurones vulnérables ont généralement une activité pacemaker autonome avec de grandes fluctuations du Ca²⁺ cytosolique qui ne sont pas fortement tamponnées.

Il en résulte une activation de la phosphorylation oxydative conduisant à une augmentation du stress oxydatif mitochondrial et des dommages. Les dommages mitochondriaux pourraient être exacerbés par l'âge, les toxines environnementales et les mutations génétiques affectant le contrôle de la qualité mitochondrial (boîtes bleu clair).

Rappelons, qu'environ un cas sur dix de MP est familial, c'est-à-dire que l'apparition de la maladie peut être attribuée à une mutation génétique (29).

Les mutations les plus caractérisées, récessives et à perte de fonction ont été clairement liées à la fonction mitochondriale. Les mutations PINK1 et PARKIN dans les cellules non neuronales conduisent à des déficits dans le renouvellement ou le contrôle de la qualité mitochondriale. La PARKINE a également été impliquée dans la biogenèse mitochondriale à travers sa régulation négative sur le répresseur transcriptionnel PARIS. La biogenèse mitochondriale est favorisée par le co-activateur transcriptionnel PGC-1 α et son gène cible, NRF-1. En l'absence de PARKIN, PARIS s'accumule et conduit à la perte progressive des neurones dopaminergiques dans le SNc. Les mutations de DJ-1 tombent également dans cette catégorie. Celui-ci aide à réguler les défenses oxydantes cellulaires et mitochondriales.

Ces 3 mutations génétiques sont liées à la fonction mitochondriale et augmentent la probabilité d'apparition précoce de la MP. Fait intéressant, la LP n'est pas une composante obligatoire du profil pathologique chez de nombreux patients parkinsoniens atteints de ces mutations.

En ligne avec cette dernière observation, des études ont également signalé une augmentation progressive et soutenue du stress oxydant dans les neurones de la SNc des souris, surexprimant l' α -synucléine A53T mutant.

De plus, une grande arborisation axonale conduit à un stress oxydant mitochondrial élevé et à des dommages. L'accumulation de défauts mitochondriaux et/ou de dommages conduisent à la sénescence et/ou la mort cellulaire.

b) Dysfonctionnement protéostatique (violet)

Comme mentionné dans la partie 2, il y a un lien entre l' α -synucléine, la dérégulation de la protéostase et la dysfonction mitochondriale dans la MP.

Dans les neurones vulnérables, l'agrégation de l' α -synucléine pourrait être augmentée par une expression d' α -synucléine élevée, due à un axone long, très ramifié et des mutations génétiques.

Le Ca^{2+} cytosolique élevé, les ROS, les espèces réactives azotées, ou l'absorption de l' α -synucléine agrégée pourraient favoriser la formation d'agrégats intracellulaires d' α -synucléine, conduisant à LP. En outre, la diminution de la capacité autophagique résultant de l'augmentation de la mitophagie, des mutations génétiques ou du vieillissement pourrait augmenter l'importance des agrégats. Enfin, les agrégats α -synucléine pourraient contribuer à la dysfonction mitochondriale, au stress oxydant et aux niveaux élevés de Ca^{2+} cytosolique, favorisant davantage la pathologie.

Bien que l' α -synucléine soit impliquée dans la MP par ses mutations ou sa surexpression, elle ne serait pas suffisante pour induire la pathologie (20).

Fait intéressant: dans les neurones de la SNc, l'excès d' α -synucléine exacerbe l'augmentation de Ca^{2+} provoquée par l'exposition MPP⁺ à travers les LCCVD, alors que dans les neurones ATV il n'y avait pas d'augmentation détectable de Ca^{2+} , indépendamment des niveaux d'expression d' α -synucléine (26).

Aussi, il a été constaté que les neurones de la SNc et de l'ATV provenant de souris déficientes en α -synucléine (α Syn KO) étaient plus résistants à la toxicité induite par la MPP⁺ que les neurones d'animaux sauvage. En l'absence d' α -synucléine, aucune augmentation détectable de Ca^{2+} dans les neurones de la SNc, suite au traitement MPP n'a été observée. De même, aucun effet de la toxine sur le Ca^{2+} mitochondrial ou la morphologie mitochondriale n'a été observé dans les neurones α SynKO.

Ces résultats ont montré que bien que l'expression d' α -synucléine est essentielle, elle n'est pas suffisante pour déclencher l'augmentation de Ca^{2+} induite par la MPP, ce qui nécessite vraisemblablement des facteurs supplémentaires spécifiquement exprimés dans les neurones de la SNC.

Les 2 facteurs pathogènes (l' α -synucléine et l'activité dépendante des LCCVD) agissent de concert, mais l'augmentation des niveaux d' α -synucléine reste insuffisante pour sensibiliser les neurones à la toxine MPP+.

L'ensemble de ces découvertes permet d'affirmer une nouvelle interaction entre les facteurs de risque génétique primaire de la MP, la dysfonction mitochondriale et la signalisation du calcium.

La combinaison particulière de caractéristiques (crêtes larges, pacemaker autonome dépendant des LCCVD, faible capacité de tampon du Ca^{2+} intrinsèque et oscillations de Ca^{2+} cytosoliques) distingue les neurones DA de la SNC des autres neurones qui sont moins vulnérables dans la MP. Elle peut expliquer le déclin des neurones dopaminergiques dans cette région avec l'âge avancé mais n'explique pas pourquoi nous n'obtenons pas tous la MP. La MP n'est pas simplement un vieillissement accéléré puisque la perte cellulaire est différente dans le cerveau post-mortem des personnes âgées non parkinsoniennes de celle des patients parkinsoniens. Comme indiqué ci-dessus, un certain nombre de mécanismes (stress oxydatif, insuffisance mitochondriale, dysfonctionnement du protéasome, excitotoxicité, apoptose) sont impliqués dans la neurodégénérescence au cours de la MP.

IV. Utilisation de bloqueurs des canaux calciques type L DHP : essais sur l'isradipine

A. Choix de l'isradipine

Ce chapitre s'appuie sur la référence (36).

Une expérience a permis de comparer l'affinité des différentes DHPs : isradipine, azidopine, nitrendipine, nifédipine et amlodipine pour les canaux LCCVD (36).

Son objectif était de déterminer le « médicament-candidat » optimal pour bloquer efficacement l'entrée de Ca^{2+} à travers les canaux LCCVD et assurer la neuroprotection la plus optimale. Comme mentionné précédemment, il existe 4 isoformes de LCCVD : CaV1.1, CaV1.2, CaV1.3 et CaV1.4. Ils sont présents dans le cerveau des mammifères et contiennent la sous-unité α_1 , cible des DHP.

Une PCR quantitative a révélé que les sous-unités α_1 (qui lient les DHPs) des canaux CaV1.1 et CaV1.4 représentaient 0,08% des transcriptions des LCCVD dans le cerveau entier de la souris. Ces données suggèrent que ces canaux sont peu susceptibles de servir de cibles médicamenteuses pour les DHP. Le SNc utilise des canaux CaV1.2 pour la potentialisation à long terme dans les neurones, qui renforce l'efficacité de la transmission synaptique. Les canaux CaV1.3 peuvent s'activer à des potentiels plus négatifs, servant principalement de modulateurs du pacemaking. Les canaux CaV1.3 jouent donc un rôle physiopathologique important dans la MP. Le blocage de ces canaux serait intéressant pour assurer une neuroprotection. Il était donc nécessaire de sélectionner parmi les DHPs disponibles, celle qui aurait une affinité suffisamment importante pour les LCCVD et notamment pour les canaux CaV1.3.

Pour cela, une expérience a combiné radiorécepteurs, PCR et a utilisé des souris doubles mutantes (36):

- Souris exprimant des canaux CaV1.2 mutants manquant d'affinité élevée pour les DHPs [CaV1.2DHP (-/-)]
- Souris exprimant des canaux CaV1.3 mutants manquant d'affinité élevée pour les DHPs [CaV1.3 (-/-)].

Notons, figure 14, que la différence de liaison du marqueur (+)-[3H]isradipine entre les souris simplement mutées [CaV1.2DHP (-/-)] et les souris doublement mutées ([CaV1.2DHP (-/-)] , [CaV1.3DHP (-/-)]) a été réduite respectivement de 15,1 à 4,4%, indiquant que les canaux CaV1.3 représentent 10,7% des LCCVD du cerveau.

L'exploitation du modèle CaV1.2DHP (-/-) a permis de tester l'affinité de DHPs, structurellement différentes, entre les poches de liaison CaV1.2 et CaV1.3. Les membranes du cerveau des souris sauvages et des souris [CaV1.2DHP (-/-)] ont été marquées avec le

ligand radioactif + [3H] isradipine en l'absence et en présence de concentrations croissantes de DHPs non marquées.

➤ Résultats nitrendipine et nifédipine

Le tableau 15 montre que les CI50 de la nitrendipine et de la nifédipine, en l'absence de canaux CaV1.2 (CaV1.2DHP (-/-)), sont respectivement 3 et 4 fois plus importantes que celles chez les souris sauvages (WT). Le rapport CI50 souris WT/ souris [CaV1.2DHP (-/-)] est faible ($\pm 0,3$ pour les 2 molécules) et démontre une forte affinité de ces 2 molécules pour les canaux CaV1.2 par rapport aux autres canaux. Plus en détail, le tableau 16 montre que le rapport des CI50 pour les canaux CaV1.2 et CaV1.3 étant faible et éloigné de 1, la nitrendipine et la nifédipine ne se fixent que très peu sur les canaux CaV1.3 par rapport aux canaux CaV1.2. Malgré leur forte affinité pour les canaux CaV1.2, leur intérêt pour la neuroprotection reste limité, du fait de leur faible affinité pour les canaux CaV1.3.

➤ Résultats isradipine, amlodipine et azidopine

Le tableau 15 montre que les rapports des valeurs CI50 pour l'isradipine, l'amlodipine et l'azidopine restent à peu près similaires. Cependant, l'isradipine est la plus intéressante. En l'absence de CaV1.2 (souris CaV1.2DHP (-/-)), son affinité pour les autres canaux reste quasiment inchangée : le rapport CI50 souris WT/ souris [CaV1.2DHP (-/-)] est le plus proche de 1 ($\pm 0,98$). De plus, comme résumé tableau 16, son affinité pour les canaux CaV1.2 et CaV1.3 est presque identique : le rapport des CI50 pour les canaux CaV1.2 et CaV1.3 étant également proche de 1 ($\pm 1,09$) en comparaison à l'amlodipine et à l'azidopine.

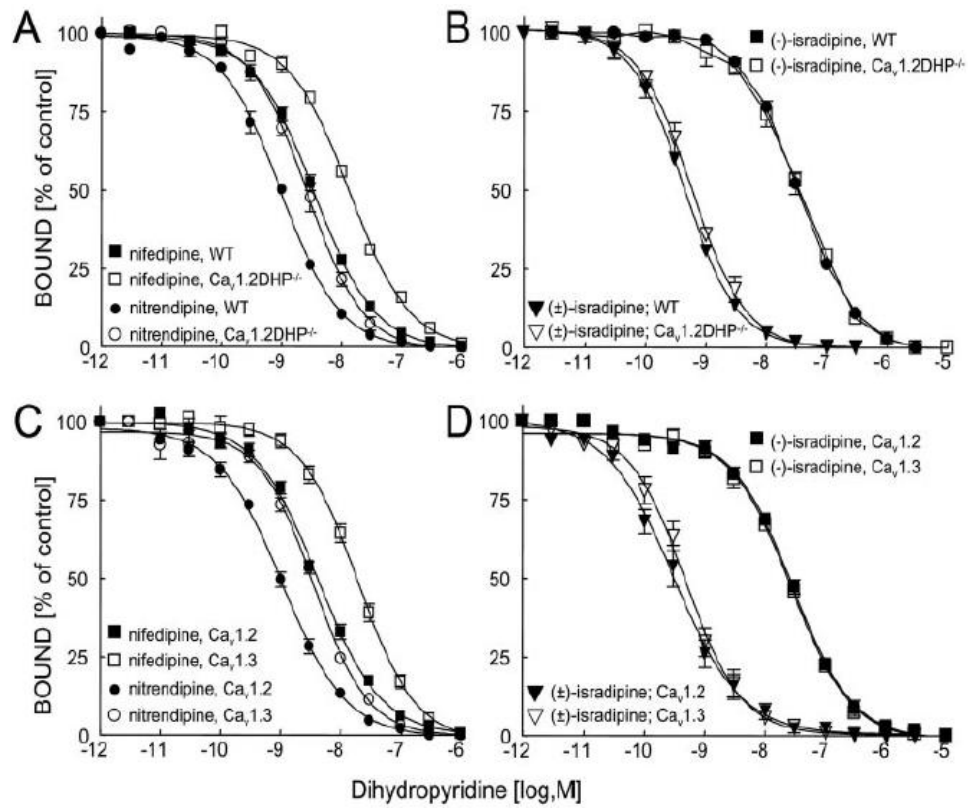


Figure 14 : Inhibition de la liaison [3H] isradipine aux LCCVD natifs dans des membranes de cerveaux de souris et inhibition de la liaison [3H] isradipine aux LCCVD $Ca_v1.2$ et $Ca_v1.3$ recombinants exprimés dans des cellules tsA201 par des DHPs non marquées. Tiré de (36) , figure 5.

Dihydropyridine	WT	Ca _v 1.2DHP(-/-)	IC ₅₀ WT:MUT	n
(±)-Isradipine				
IC ₅₀ (nM)	0.43 ± 0.03	0.59 ± 0.12	0.76 ± 0.20	3
Slope factor	0.99 ± 0.10	0.98 ± 0.08		
Azidopine				
IC ₅₀ (nM)	1.23 ± 0.71	1.08 ± 0.56	1.13 ± 0.18	3
Slope factor	0.94 ± 0.04	0.95 ± 0.04		
Nitrendipine				
IC ₅₀ (nM)	0.97 ± 0.11	2.79 ± 0.80 ⁺⁺⁺	0.37 ± 0.11 ^{**}	4
Slope factor	0.89 ± 0.08	0.96 ± 0.10		
Nifedipine				
IC ₅₀ (nM)	3.42 ± 0.55	13.21 ± 1.05 ⁺⁺⁺	0.26 ± 0.06 ^{**}	3
Slope factor	0.85 ± 0.04	0.87 ± 0.11		
(-)-Isradipine				
IC ₅₀ (nM)	35.2 ± 7.4	35.5 ± 5.2	0.98 ± 0.09	3
Slope factor	0.95 ± 0.01	0.86 ± 0.07		
Amlodipine				
IC ₅₀ (nM)	41.1 ± 1.2	39.2 ± 4.6	1.06 ± 0.14	3
Slope factor	0.93 ± 0.04	1.01 ± 0.02		

⁺⁺⁺ $P < 0.001$; unpaired student's t test.

^{**} $P < 0.01$, for difference from unity, one-sample t test.

Figure 15 : Affinités des différentes DHPs pour les membranes cérébrales de CaV1.2DHP (-/-) et de souris de type sauvage WT. La signification statistique de la sélectivité a été déterminée à partir d'une comparaison directe des valeurs des CI50 et des rapports de sélectivités (WT:MUT). Tiré de (36) , Table 2.

Dihydropyridine	Ca _v 1.2	Ca _v 1.3	IC ₅₀ WT:MUT
(±)-Isradipine			
IC ₅₀ (nM)	0.40 ± 0.21	0.51 ± 0.20	0.76 ± 0.18*
Slope factor	0.80 ± 0.04	0.96 ± 0.12	
Azidopine			
IC ₅₀ (nM)	0.46 ± 0.10	0.65 ± 0.11 ⁺	0.74 ± 0.23
Slope factor	0.85 ± 0.06	1.00 ± 0.11	
Nitrendipine			
IC ₅₀ (nM)	1.08 ± 0.27	3.59 ± 0.66 ⁺⁺⁺	0.31 ± 0.11 ^{***}
Slope factor	0.82 ± 0.10	0.96 ± 0.12	
Nifedipine			
IC ₅₀ (nM)	4.45 ± 1.21	20.1 ± 4.78 ⁺⁺⁺	0.22 ± 0.04 ^{***}
Slope factor	0.84 ± 0.12	0.92 ± 0.10	
(-)-Isradipine			
IC ₅₀ (nM)	29.7 ± 5.56	27.2 ± 3.67	1.09 ± 0.11
Slope factor	0.88 ± 0.13	0.86 ± 0.12	
Amlodipine			
IC ₅₀ (nM)	28.4 ± 11.8	60.1 ± 28.3	0.48 ± 0.11 ^{***}
Slope factor	0.87 ± 0.11	0.94 ± 0.09	

⁺ $P < 0.05$.

⁺⁺⁺ $P < 0.001$.

* $P < 0.05$.

^{***} $P < 0.001$.

Figure 16 : Affinités des différentes DHPs pour les canaux CaV1.3 et CaV1.2 recombinants. Les rapports de sélectivités (WT: MUT) ont été calculés à partir d'expériences individuelles réalisées en parallèle pour les deux isoformes de canal. Tiré de (36) , Table 3.

Cette expérience a permis d'affirmer que l'isradipine, par son affinité quasi égale pour les canaux CaV1.2 et CaV1.3, est la DHP la plus intéressante pour bloquer efficacement l'entrée de Ca²⁺ à travers les canaux LCCVD.

Aussi, il a été démontré que certaines DHPs se lient aux LCCVD d'une manière isoforme-sélective. Les résultats indiquent que la nitrendipine et la nifédipine peuvent détecter, malgré la très forte similitude de séquence dans la poche de liaison DHP, des différences dans les architectures moléculaires des canaux CaV1.2 et CaV1.3. Il semble donc probable que de telles différences puissent permettre le développement de molécules ayant une plus grande affinité pour la poche de liaison CaV1.3. Ceci pourrait aider au développement de bloqueurs sélectifs de CaV1.3, permettant de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement de la MP.

B. Essai pré-clinique de l'isradipine sur l'animal

Ce chapitre s'appuie sur les références (37), (38) et (39).

Pour vérifier l'hypothèse de l'effet neuroprotecteur de l'isradipine sur les modèles de souris, la toxine 6-OHDA a été injectée par voie intrastriale en parallèle de l'injection systémique d'isradipine (37).

De manière similaire au MPP⁺, la toxine 6-OHDA est connue pour son effet toxique sur les neurones catécholaminergiques, en entraînant un stress oxydatif. Elle possède un rôle délétère vis à vis des neurones dopaminergiques en inhibant le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'injection de 6-OHDA dans le striatum semble être un des meilleurs modèles de la physiopathologie de la MP. En effet, elle provoque une perte rétrograde progressive et modérée des neurones dopaminergiques de la SNc, atteignant un pic de dégénérescence à 3 semaines post-injection (38).

Le stress oxydant, augmentant la sensibilité des neurones dopaminergiques de la SNc aux toxines mitochondriales, est la conséquence d'un fardeau métabolique. Ce dernier est créé

par la nécessité d'éliminer le Ca^{2+} de l'espace cytosolique par des mécanismes dépendants de l'ATP.

Par conséquent, l'antagonisme des canaux LCCVD se doit d'être neuroprotecteur dans les modèles de MP, provoqués par la toxine 6-OHDA.

25 jours après des injections intrastriatales de 2,5 μ g de 6-OHDA, concentration suffisante pour induire la lésion partielle des neurones dopaminergiques de la SNc, les souris ont été sacrifiées. Leur sang a été recueilli et la concentration d'isradipine dans les échantillons de plasma a été déterminée. L'étendue de la perte des fibres terminales a été évaluée par immunohistochimie de la tyrosine hydroxylase (TH, enzyme clé de la biosynthèse des catécholamines). Une mesure quantitative de la densité des fibres TH+ striatales a été obtenue par des mesures de densité optique.

L'expérience figure 17 a montré une perte > 90% des fibres TH+ striatales chez les souris, du côté de la lésion (par comparaison à la densité de TH+ striatale sur le côté intact du cerveau). En présence d'un prétraitement avec de l'isradipine, la perte des fibres induite par 6-OHDA a été significativement réduite.

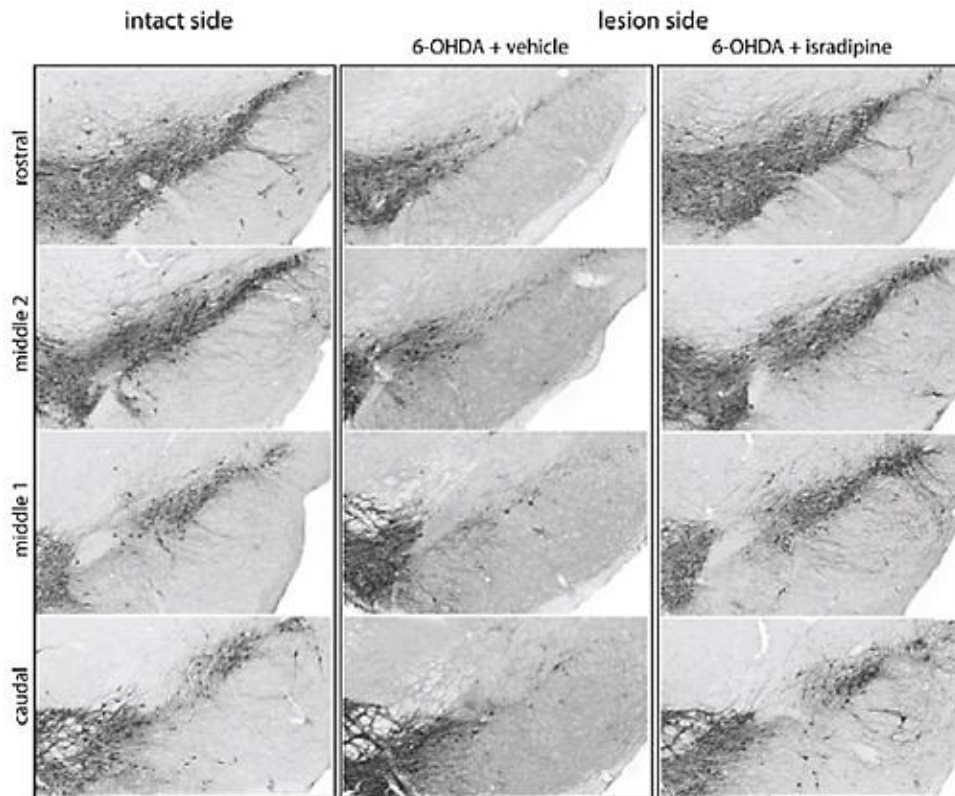


Figure 17 : Microphotographies représentatives montrant des fibres immunoréactives TH dans le striatum après une injection unilatérale de 6-OHDA chez des souris prétraitées avec le véhicule (A) et avec de l'isradipine (B) (concentration plasmatique 10,4 ng / ml). La protection offerte par l'isradipine était évidente dans tous les niveaux rostro-caudaux.

Extrait la figure 3 de (37).

Fait intéressant, la figure 18 montre que la neuroprotection était dose-dépendante, avec une CI50 de l'isradipine plasmatique estimée à 13 nM pour les corps cellulaires et à 19 nM pour les terminaisons.

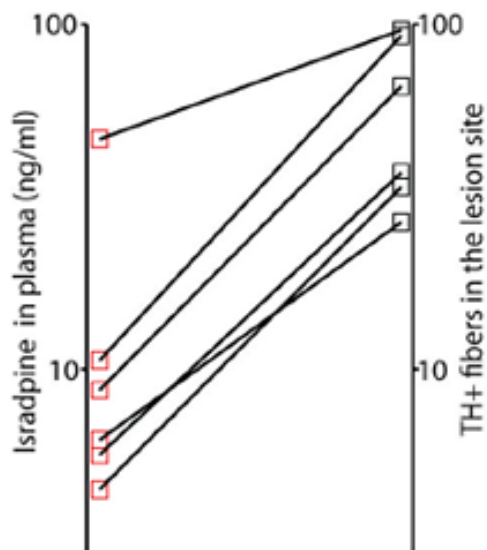


Figure 18 : Effet protecteur de l'isradipine dose-dépendant, chez 6 souris. Extrait la figure 2 de (37).

Cette différence de sensibilité des 2 régions à l'isradipine pourrait être interprétée de deux manières. La première : les terminaisons sont plus sensibles aux toxines que les corps cellulaires, exigeant un antagonisme plus complet des canaux LCCVD pour obtenir une protection. La seconde : les terminaisons sont plus hyperpolarisées que les corps cellulaires, diminuant la capacité des DHPs à antagoniser les canaux LCCVD.

Un des points-clés de cette étude était la détermination de la plage de concentration plasmatique pour laquelle la neuroprotection était obtenue.

Rappelons que les DHPs, y compris l'isradipine, sont approuvées pour l'usage humain dans le traitement de l'hypertension. Les analyses pharmacocinétiques chez l'homme ont montré des concentrations plasmatiques d'isradipine d'environ 2 ng / ml (~ 5 nM) avec 5 mg / jour et de 8 ng / ml (22 nM) avec 10 mg / jour. Le médicament ICAZ® 5mg, utilisé dans le traitement de l'hypertension, atteint des concentrations de environ 2 ng/ml à l'état d'équilibre (39).

Ces concentrations sont clairement dans la gamme permettant la neuroprotection dans cette étude. La figure 19 montre que les CI50, pour obtenir une neuroprotection de 50%, était de 7,2ng/ml.

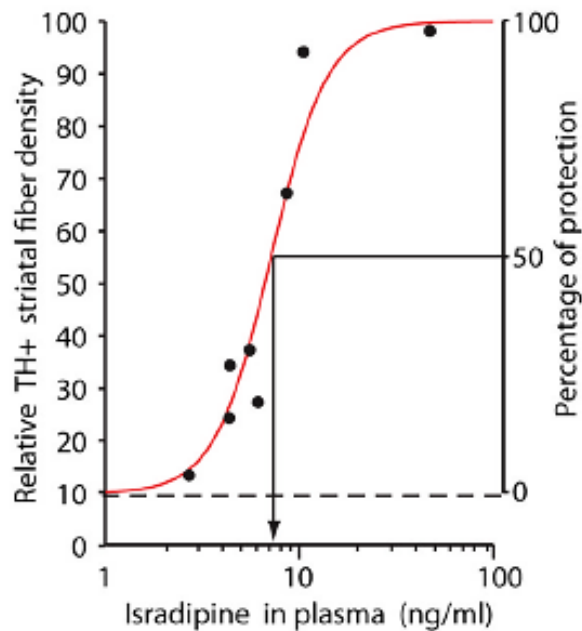


Figure 19 : Courbe de régression non linéaire de la densité relative des fibres striatales TH + montrant une concentration plasmatique d'isradipine avec un coefficient de Hill de 3 (=pente de la courbe) et une CI50 = 7,2 ng / ml. Extrait figure 2 de (37).

Ces concentrations plasmatiques d'isradipine, conduisant à la neuroprotection, se situent donc dans les limites de celles pouvant être atteintes en toute sécurité chez l'homme.

La conclusion de cette étude est que chez la souris, l'administration systémique d'isradipine, antagoniste des canaux calciques LCCVD, protège les terminaisons dopaminergiques striatales et les corps cellulaires des neurones dopaminergiques de la SNc contre l'injection intrastriatale de 2,5 µg de la toxine 6 OHDA. Ces concentrations plasmatiques, proches de celles utilisées pour le traitement de l'hypertension, suggèrent que l'isradipine pourrait être un agent neuroprotecteur viable au stade précoce de la MP.

C. Essai de phase II sur l'isradipine STEADY-PD II

Ce chapitre s'appuie sur les références (40) et (41).

Un essai de phase II a été réalisé, suite à la découverte des propriétés neuroprotectrices de l'isradipine, sur les modèles animaux dans la MP.

Cet essai a permis de définir la posologie d'isradipine la mieux adaptée pour répondre aux critères de tolérance, sécurité et efficacité préliminaire en vue des futurs essais de phase 3.

1. Description de l'essai de phase II

Cet essai multicentrique a été mené sur 21 sites du Parkinson Study Group et coordonné par le Centre de coordination des essais cliniques et le Département de Biostatistique de l'Université de Rochester (UR, Rochester, NY, États-Unis).

L'étude a été conçue comme un essai randomisé, en double aveugle, à quatre bras en groupes parallèles, avec des sujets recevant une fois par jour 5, 10 ou 20 mg d'isradipine ou un placebo.

Entre septembre 2009 et octobre 2010, 115 sujets ont été examinés dont 99 ont été inclus dans l'étude. Le dernier sujet a terminé l'étude en novembre 2011. Les participants étaient des hommes et des femmes âgés de 30 ans et plus, avec un diagnostic de MP précoce, établi depuis 3 ans à un stade <2,5 sur l'échelle de Hoehn et Yahr, ne nécessitant pas de traitement dopaminergique (agoniste dopaminergique ou lévodopa) ni de le commencer dans les 6 mois (Annexe 1).

L'utilisation de la sélégiline, rasagiline, amantadine ou des anticholinergiques était permise tant que la dose restait stable pendant les 3 mois précédant la visite initiale et pendant la durée de l'étude. Les principaux critères d'exclusion comprenaient : un diagnostic de syndrome parkinsonien atypique, l'exposition à un traitement dopaminergique dans les 60 jours précédant l'inscription ou pendant 3 mois à n'importe quel moment dans le passé, la présence d'un dysfonctionnement cognitif défini par un score d'examen de mini-mentalité (MMSE) <26, une dépression cliniquement significative déterminée par un score de Beck Depression Inventory II (BDI) > 15, des antécédents d'exposition aux antipsychotiques typiques ou à d'autres agents bloquant la dopamine et des antécédents d'hypotension

orthostatique cliniquement significative, d'insuffisance cardiaque congestive, de bradycardie ou d'autres anomalies électrocardiographiques importantes (ECG), anomalies biologiques, de comorbidités médicales ou psychiatriques connues. Les participants, ayant des antécédents d'hypertension traités avec d'autres antihypertenseurs, ont été autorisés à condition que les doses de traitement concomitantes puissent être réduites / ajustées au cours de l'étude en fonction des valeurs de la tension artérielle.

La figure 20 montre que les participants randomisés, en nombre égal aux 4 bras de traitement, ont été initiés à la dose quotidienne de 5 mg d'isradipine ou à un placebo, et ont été titrés à leur dose assignée par paliers de 5 mg toutes les 2 semaines, puis, suivis durant 12 mois. À l'avant-dernière visite, le médicament a été réduit progressivement de 5 mg tous les 3 jours jusqu'à l'arrêt du traitement. L'échelle UPDRS (Annexe 3) et d'autres évaluations cliniques ont été réalisées au départ, semaines 2, 4, 6, 8, 12, tous les 3 mois et lors des visites finales. Les effets indésirables ont été enregistrés à chaque visite d'étude.

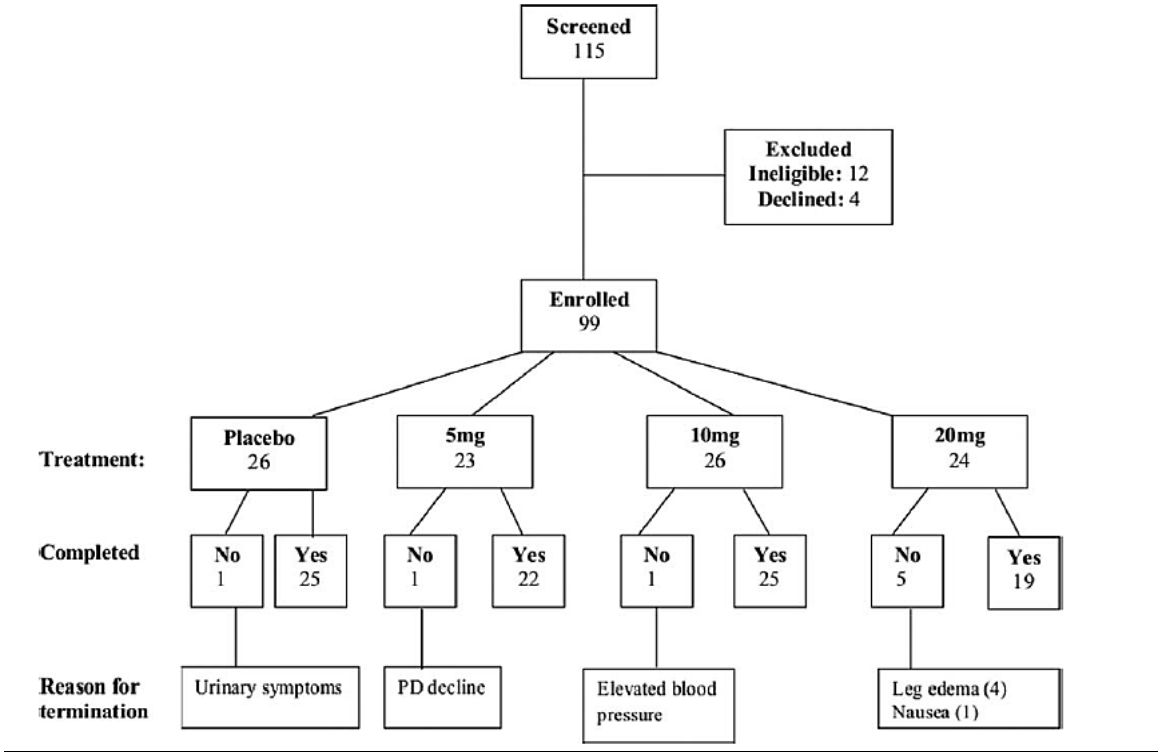


Figure 20 : Diagramme de flux d'étude. Tiré de (40), figure 1.

2. Evaluation de la tolérance

La tolérance est définie comme la proportion de sujets capables de compléter l'étude de 12 mois ou, jusqu'au moment de l'initiation de la thérapie dopaminergique (selon la première éventualité), selon la posologie initialement assignée. Le seuil de tolérance a été fixé comme inférieur à 30% entre chaque groupe de traitement actif par rapport au placebo.

Cette analyse a été réalisée après que les premiers 50% des sujets aient achevé la phase de titration à 12 semaines de l'étude. Un DSMB (comité de surveillance et de suivi chargé d'assurer le suivi des essais, en particulier lors de grands essais multicentriques menés sur des populations à haut risque de mortalité ou d'événements indésirables graves) indépendant a été chargé de l'examen des données, afin d'éliminer les doses identifiées comme intolérables.

Les résultats ci-dessous montrent les différences de tolérance du placebo et de l'isradipine :

- Placebo : 25 patients sur 26 (96%)
- Isradipine 5mg : 19 sur 23 patients (83%)
- Isradipine 10mg : 19 sur 26 patients (73%)
- Isradipine 20mg : 9 sur 24 patients (37%) dont 2/ 4 patients (50%) pour la dose de 15 mg et 7 /20 patients (35%) pour la dose de 20 mg.

Les événements indésirables les plus fréquents étaient l'œdème périphérique (30 patients) et les vertiges (24 patients).

La dose de 5mg présentait 13% de tolérance (96%- 83%) par rapport au placebo et celle de 10 mg 24% (96%-73%). Toutes deux étaient inférieures au seuil de tolérance de 30%.

Les doses de 5 mg et 10 mg répondaient donc aux critères de tolérance.

Cependant, la dose d'isradipine 20 mg, ayant une tolérance de 59% (96%-37%) > 30%, était intolérable.

L'isradipine 10 mg par jour était la dose maximale tolérable dans cette étude.

3. Evaluation de la sécurité

Il y a eu 7 événements indésirables graves au cours de l'étude (dont 2 cas pour le placebo, 2 pour 5 mg, 1 pour 10 mg et 2 pour 20 mg), avec peu de preuves d'un lien avec le médicament actif étudié. Ces effets comprenaient 2 hospitalisations pour une chirurgie programmée, une biopsie de la prostate, un diagnostic de cancer de la prostate, une infection, une douleur thoracique, des calculs rénaux et un mélanome *in situ*.

Les effets indésirables affectent globalement plus de 5% des sujets (Annexe 2). Seul l'œdème périphérique a montré une relation posologique. En effet, une fréquence croissante de l'œdème périphérique a été observée pour des doses plus élevées.

Les effets indésirables, ayant entraîné une réduction ou une suspension posologique, incluaient un œdème des jambes, des vertiges, la combinaison de ces deux et une réduction de la tension artérielle. La plupart des réductions de dose sont survenues au début de la phase de titration.

4. Evaluation de l'efficacité

L'objectif de l'analyse d'efficacité dans cette étude était de choisir le meilleur des 3 groupes de traitements actifs, avec les doses tolérables adaptées, pour les études futures. Le choix pour la sélection de la dose était basé sur un critère d'efficacité d'un changement de 3 points du score UPDRS total (incluant les sous-échelles UPDRS, l'échelle modifiée de Hoehn et Yahr, l'échelle de qualité de vie de Schwab et England et Montreal Cognitive Assessment Scale) entre chaque groupe actif, depuis la visite de référence, jusqu'au 12^{ème} mois ou la visite au point final (Annexe 3) (41). Dans le cas où il n'y avait pas de différence, le dosage tolérable le plus élevé devait être choisi pour les futures études pivots.

a) Test Anova : Comparaison entre les 3 bras de traitements actifs (Annexe 4)

Ce test a permis une comparaison intergroupe des 4 moyennes UPDRS de chacun des bras. Les écarts types sont notés entre parenthèse et traduisent la dispersion des valeurs (valeurs plus ou moins écartées de la moyenne).

La p-value obtenue est de 0,7107 ($> 0,05$) pour les valeurs de l'UPDRS total.

Ainsi, l'hypothèse nulle, affirmant qu'il n'y avait pas de différence statistiquement significative dans la variation de l'UPDRS ou d'autres variables entre les groupes de traitement actifs, n'a pas été rejetée.

b) Test de comparaison de l'efficacité des traitements avec le placebo (Annexe 4)

Les valeurs de l'UPDRS total du tableau ont été obtenues par soustraction des moyennes UPDRS total du test ANOVA de chaque dosage d'isradipine avec le placebo. L'intervalle de confiance (comprenant 95% des valeurs) est noté entre parenthèse.

Les différences, ajustées dans les points UPDRS, entre chaque groupe posologique et le placebo, étaient de 0,04 pour 5 mg, - 1,10 pour 10 mg et - 2,00 pour 15/20 mg. Les signes positifs indiquent une aggravation et les signes négatifs une amélioration.

Malgré un p value $> 0,05$, ne montrant pas de différence significative entre les valeurs, ces résultats suggèrent une tendance possible à l'efficacité pour les doses de 10 mg et 20 mg. Cependant, cette différence n'est pas significative, elle peut être le fruit du hasard.

Pour que celle-ci devienne significative, des échantillons de plus grandes tailles auraient été nécessaires.

c) Comparaison des valeurs UPDRS totales des 4 bras à la 12^{ème} semaine et entre la 52^{ème} et 54^{ème} semaine

La période entre la 52^{ème} et la 54^{ème} semaine correspond à la période de "wash out" : les sujets ne reçoivent plus les traitements à l'étude, pour en faire disparaître les effets.

La p-value de 0,2417 et 0,5793, pour la 12^{ème} semaine et entre la 52^{ème} et 54^{ème} semaine respectivement ($> 0,05$), ne montrait pas de différence significative des valeurs UPDRS entre les 4 bras.

Cette étude a montré la tolérance dépendante de la dose d'isradipine chez les patients atteints de MP précoce et a établi la dose de 10 mg comme dose maximale tolérable parmi les doses testées. Il n'y avait pas de différences significatives dans l'efficacité entre les traitements actifs ou le placebo. Cependant, il y avait une tendance vers l'augmentation du bénéfice à des doses plus élevées.

La principale limite de cette étude était le nombre de patients. En effet, il est difficile de mettre en évidence une différence d'efficacité entre les doses et le placebo sur des petits échantillons. L'objectif principal de cette étude étant de déterminer la dose tolérable la plus élevée.

Les données précliniques ont démontré un effet neuroprotecteur dose-dépendant de l'isradipine sur les modèles animaux. Bien que la corrélation entre les données pharmacocinétiques chez l'animal et chez l'humain soit prudente, l'isradipine 10 mg / j a atteint des concentrations sériques qui se situent dans la fourchette neuroprotectrice lors des études animales. Ces données ont appuyé l'utilisation de 10 mg / j pour les futures études pivot d'efficacité.

L'étude a également fourni des informations importantes sur le profil de sécurité de l'isradipine, chez les patients atteints de MP précoce. L'effet indésirable le plus courant était l'œdème périphérique, lié à l'effet vasodilatateur puissant des DHPs.

Ainsi l'isradipine, à des doses quotidiennes allant jusqu'à 10 mg, a bien été tolérée chez les sujets atteints de MP débutante. Cependant, il n'y avait aucune évidence d'un effet

symptomatique immédiat de l'isradipine sur les symptômes moteurs dans cette étude cohorte.

Une étude de phase III, randomisée en double aveugle contre placebo, est nécessaire pour tester l'efficacité de l'isradipine, pour ralentir la progression de l'invalidité au début de la maladie.

Cette étude a jeté les bases de l'essai de phase III sur l'efficacité de l'isradipine dans la MP.

D. Essai de phase 3 en cours STEADY- PD III

Ce chapitre s'appuie sur les références (42) et (43).

STEADY-PD III est un essai en groupe parallèle, en double aveugle, qui évalue l'effet de l'isradipine sur la progression de l'incapacité au début de la MP. Il se réalise sur des individus avec une MP précoce, non traités au départ, ne recevant ni ne nécessitant de traitements (42).

1. Description de l'essai III

Cette étude, à double insu, randomisée, contrôlée par placebo est d'une durée de 36 mois.

L'inscription des 336 participants a débuté en novembre 2014 et a été achevée en Octobre 2015. L'essai se terminera en novembre 2018.

L'étude est menée dans 57 sites du Groupe d'étude Parkinson (PSG) en Amérique du Nord. Elle est financée par l'Institut National des Troubles Neurologiques et des Maladies (NINDS), et par la Fondation Michael J. Fox.

Les participants admissibles ont :

- Une MP idiopathique précoce (présence de deux des trois manifestations cardinales de la MP : akinésie, rigidité et tremblements)
- Un âge supérieur ou égal à 30 ans au moment du diagnostic
- Un diagnostic de la MP datant de moins de 3 ans

- Ils ne doivent pas recevoir de traitements symptomatiques (lévodopa, agoniste de la dopamine ou inhibiteurs de la MAO-B). L'utilisation d'amantadine et / ou d'anticholinergiques est autorisée à des doses stables avant l'inscription.

Le diagnostic d'un parkinsonisme atypique, une exposition antérieure à un traitement symptomatique, des antécédents d'hypotension orthostatique, une bradycardie, une insuffisance cardiaque congestive, une autre pathologie cardiaque ou systémique, la présence d'un dysfonctionnement cognitif et une dépression, représentent des critères d'exclusions à l'étude. Les participants peuvent prendre jusqu'à deux autres antihypertenseurs, à l'exception des inhibiteurs calciques qui sont exclus.

Les phénotypes de la maladie recrutés pour l'essai sont variables. Les cas précoces éventuels, avec forme atypique ou familiale de la maladie notamment ne sont pas recherchés, ce qui pourrait impacter le résultat de l'essai.

Cet essai teste l'hypothèse selon laquelle les individus traités par isradipine, entre le début et le 36^{ème} mois, ont une plus faible progression de l'incapacité dans la MP (déterminée par le changement du score UPDRS), par rapport au placebo. Les participants reçoivent de l'isradipine 5 mg deux fois par jour (soit 10mg/jour) ou reçoivent un placebo.

Comme le montre la figure 21 ci-dessous, les 4 à 12 semaines du début correspondent à une période de titration de la posologie. Durant la période d'entretien, un suivi des participants est systématique. Enfin, une titration de 3 jours du médicament, suivie de 2 semaines de visite de sécurité de titrage, seront réalisées.

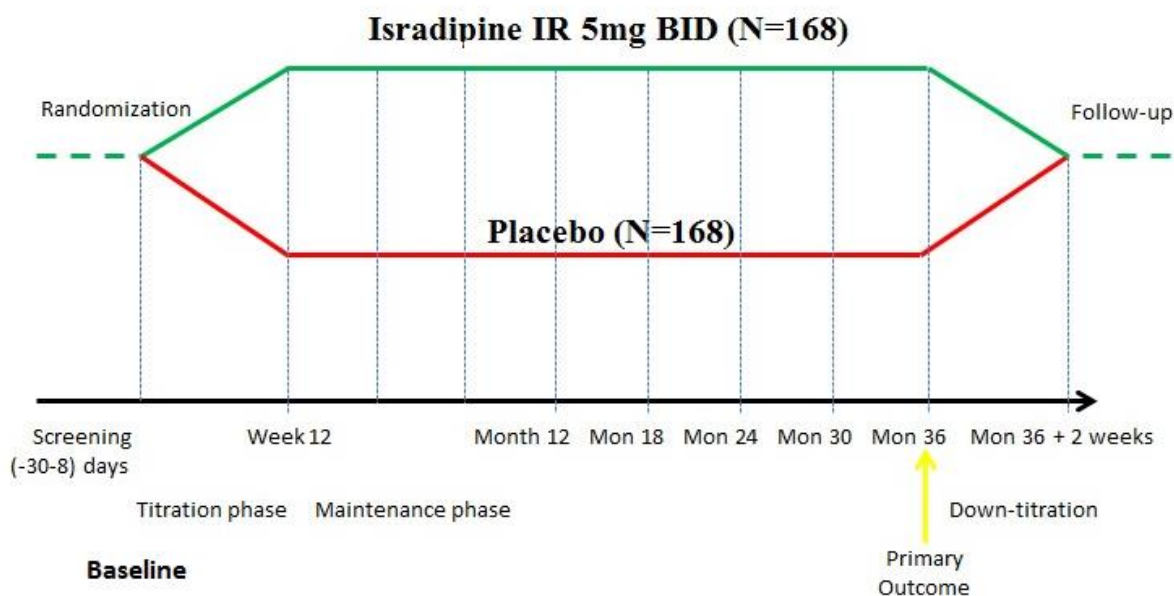


Figure 21 : Conception de l'étude de phase III. Tiré de (42), figure 1.

2. Résultat principal

Ce résultat est susceptible d'apporter une démonstration formelle de l'effet du traitement. Il correspond au changement de l'UPDRS dans la phase "ON", une fois le traitement symptomatique initié. Les observations pour les résultats sont faites 1 h après l'administration de la dose de traitement symptomatique (thérapie dopaminergique) pour ceux le recevant. Cela permet d'identifier le bénéfice de l'isradipine "au-dessus" de l'avantage conféré par le traitement symptomatique.

Par conséquent, cette étude est conçue pour démontrer un effet modificateur de la maladie, «en plus» du bénéfice symptomatique des traitements existants. Les résultats sont donc plus cliniquement pertinents. Le résultat primaire, décrit figure 22, devra détecter un ralentissement du fonctionnement d'au moins 25% avec l'isradipine "au-dessus" du bénéfice du traitement symptomatique.

L'UPDRS, outil fiable utilisé dans de nombreux essais de la MP, reste la mesure de résultat la mieux caractérisée dans la MP. En effet, il se corrèle avec la perte neuronale de la SNC.

La mesure de l'UPDRS durant la phase "OFF" (12h après la dernière dose de traitement symptomatique) est considérée comme un résultat primaire alternatif. Elle n'est pas prise en charge par les données cliniques.

Bien que 36 mois ne soit pas une période assez longue pour voir apparaître des complications à long terme, telles que l'instabilité posturale et la démence, c'est la durée la plus longue jamais proposée pour une étude dans une population *de novo* non traitée. En effet, la plupart des essais précédents (rasagiline, coenzyme Q10 etc) étaient d'une durée relativement courte (environ 20 mois).

L'étude vise à démontrer qu'à 36 mois, les participants prenant l'isradipine auront moins de baisse fonctionnelle que les participants sous placebo, malgré la prise d'un traitement symptomatique par les deux groupes.

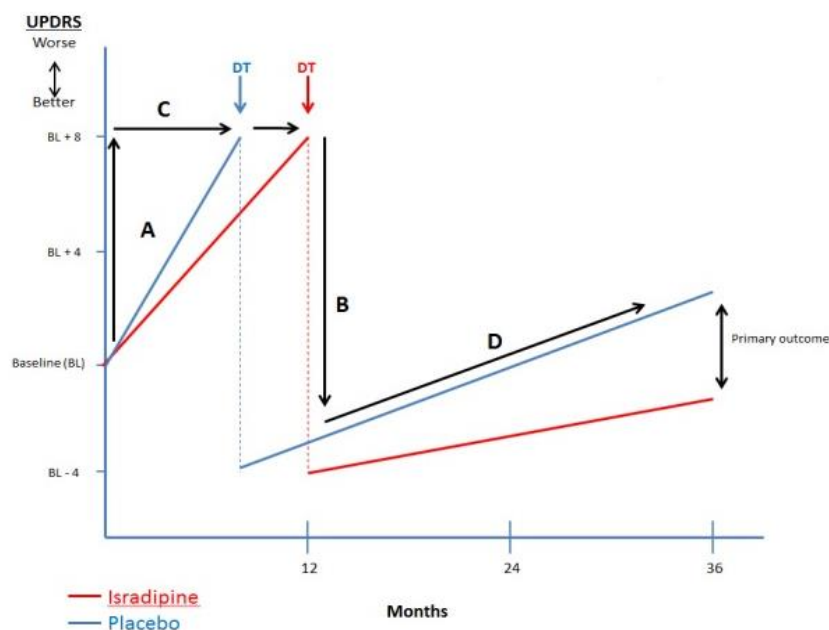


Figure 22 : Vue d'ensemble des analyses d'efficacité. Présentation des résultats primaires et secondaires de l'étude. Tiré de (42), figure 2.

A- Changement d'UPDRS avant l'initiation de la thérapie dopaminergique symptomatique.

B- Changement d'UPDRS suite à l'initiation de la thérapie dopaminergique symptomatique.

C- Temps avant l'initiation du traitement symptomatique.

D- Trajectoire du changement UPDRS.

3. Résultats secondaires

Souvent, lorsque le critère de jugement principal est significatif, on scrute les résultats secondaires à la recherche d'effets supplémentaires du traitement. Cela permet de présenter d'autres avantages et de "soutenir " le résultat principal.

Ces résultats comprennent :

- Le délai avant l'initiation du traitement symptomatique. Il était considéré comme résultat principal des précédentes études, examinant l'efficacité des interventions potentiellement modificatrices de la MP (rasagiline, coenzyme Q10 etc.). Il permettra de comparer les futurs résultats de cette étude avec les essais précédents.
- Le temps nécessaire au développement de complications motrices. Elles contribuent de manière disproportionnée à la qualité de vie.
- L'utilisation différentielle du traitement symptomatique. Un effet bénéfique de l'isradipine sur la progression de la maladie pourrait être masqué par l'utilisation de traitements symptomatiques différents. Pour tenir compte de ce facteur, cette utilisation différentielle sera évaluée en calculant les doses équivalentes de lévodopa (LED) entre les groupes de traitements. La LED d'un médicament est définie comme la quantité de ce médicament qui a le même effet antiparkinsonien que 100 mg de lévodopa à libération immédiate (43). L'objectif est d'évaluer si les différences observées au niveau du résultat primaire pourraient être attribuées à l'utilisation de différents traitements symptomatiques entre les groupes de traitements.
- Le changement dans le handicap non moteur.

Ainsi, cette étude teste l'isradipine en tant que médicament neuroprotecteur potentiel dans la MP. La conception de l'étude STEADY-PDIII est unique dans l'évaluation de l'impact de l'isradipine sur 36 mois (à un moment donné où tous les participants seront probablement sous thérapie dopaminergique symptomatique) et permettra de déterminer si le bénéfice est maintenu « au-dessus » du traitement symptomatique.

Conclusion

Bien que les causes de la MP chez les humains restent encore non résolues, la compréhension des caractéristiques communes des neurones atteints dans la maladie a conduit à une hypothèse, soutenue par des observations chez l'homme et l'animal.

Les caractéristiques communes des neurones atteints dans la maladie soutiennent en effet l'idée que la pathologie est dictée par un phénotype neuronal inhabituel, retrouvé au niveau des neurones dopaminergiques de la SNc. Ce dernier comprendrait un long axone hautement ramifié et un phénotype pacemaker inhabituel, engageant les canaux Cav1.3. Véritables fardeaux métaboliques, ces canaux seraient à l'origine d'un stress oxydant mitochondrial soutenu et conduiraient à la perte progressive de la fonction mitochondriale. Aussi, ils augmenteraient la dysfonction protéostatique en endommageant les protéines cellulaires.

L'élévation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique pourrait également favoriser l'agrégation de l' α -synucléine, un composant majeur de la LP.

Les deux principales caractéristiques de la MP seraient donc la neurodégénérescence et la LP, qui pourraient être aggravées par d'autres facteurs de stress normalement tolérés : mutations génétiques, toxines environnementales ou réactives.

De nombreuses données épidémiologiques lient l'utilisation des DHPs, bloqueurs des LCCVD, à la diminution du risque de développer la MP et à une progression ralentie de la maladie.

L'essai clinique de phase III, en cours sur l'isradipine, sera le premier test de cette hypothèse. Si le traitement par isradipine ralentissait significativement la progression de la maladie, l'étude aura un impact profondément positif sur la qualité et la durée de vie de ces patients, en plus des avantages de limitation des coûts de santé. Les symptômes cliniques apparaissant relativement tard au cours de la maladie, il sera important que le traitement par isradipine soit initié le plus précocement possible : l'espoir résidant dans le soulagement des contraintes mitochondriales pour augmenter la survie des neurones restants. Il faut cependant garder en mémoire que les phénotypes des patients recrutés pour l'essai sont variables et pourraient « confondre » le résultat de l'essai clinique. Par conséquent, même si l'essai est un échec, la poursuite de l'utilisation des antagonistes des canaux calciques ne devra pas être abandonnée.

Bibliographie

1. **Olivier Rascol, MD, PhD,1,2 Pierre Payoux, MD,2,3 Fabienne Ory, MD,1 Joaquim J. Ferreira, MD,1,4.** Limitations of Current Parkinson's disease therapy. *Annals of neurology*. 2003, Vol. 53, 3-15.
2. **CNPM.** pharmacomedicale.org médicament antiparkinsoniens. [En ligne] 2017. <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/l-dopa>.
3. **FMPMC.** chapitre 15 neurologie psychiatrie antiparkinsonniens. <http://www.chups.jussieu.fr>. [En ligne] 13 Février 2018. <http://www.chups.jussieu.fr/polys/pharmaco/poly/POLY.Chp.15.2.2.html>.
4. **Faculté de Médecine de Strasbourg, M.Grima.** Les antiparkinsonniens . <http://udsmmed.u-strasbg.fr>. [En ligne] 2008.
5. **Alan L. Whone, Ray L. Watts, A. Jon Stoessl , Margaret Davis, Sven Reske Claude Nahmias, Anthony E. Lang, Olivier Rascol , Maria J. Ribeiro, Philippe Remy, Werner H. Poewe, Robert A. Hauser, David J. Brooks.** Slower progression of Parkinson's disease with ropinirole versus levodopa: The REAL-PET study. *Annals of neurology*. 2003, Vol. 54, p 93-101.
6. Commission de la transparence avis 20 janvier 2016 tolcapone. HAS. [En ligne] 2 novembre 2005. [Citation : 20 Mars 2018.] <https://www.has-sante.fr>.
7. La Maladie- Parkinson diffère d'un malade à un autre. *France Parkinson*. [En ligne] 2018. [Citation : 19 juin 2018.] <http://www.franceparkinson.fr/la-maladie/traitements/chirurgie/>.
8. Guide du parcours de soins- maladie de Parkinson. HAS. [En ligne] septembre 2016. [Citation : 18 avril 2018.] <https://www.has-sante.fr>.
9. **Michael Seagar, Stephanie Quetglas, Cécile Iborra, Christian Lévêque.** www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle. *Le complexe SNARE au coeur de la fusion membranaire*. [En ligne] 2001. [Citation : 20 Mars 2018.]
10. **Patrick P. Michel, Etienne C. Hirsch, Stephane Hunot.** Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease. *Neuron*. 2016, Vol. 90, 675-691.
11. **W. Peelaerts1, L. Bousset2, A. Van der Perren1, A. Moskalyuk3, R. Pulizzi3, M. Giugliano3,4,5,6, C. Van den Haute1,7,.** a-Synuclein strains cause distinct synucleinopathies. *Nature international journal of science*. 2015, Vol. 522, 320-344.
12. **Foufelle Fabienne, Ferré Pascal.** La réponse UPR : Son rôle physiologique et physiopathologique. <http://www.ipubli.inserm.fr>. [En ligne] 2007.
13. **Cordonnier, Marie-Neige.** Maladie de Parkinson : quand des rubans et des fibres envahissent les neurones. <https://www.pourlascience.fr>. [En ligne] 2015.

14. **Hideki Nishitoh¹, Atsushi Matsuzawa¹, Kei Tobiume¹, Kaoru Saegusa¹, Kohsuke Takeda, Kiyoshi Inoue, Seiji Hori, Akira Kakizuka and Hidenori Ichijo.** ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *genes and development*. 2002, Vol. 16, 1345-1355.
15. L'autophagie. <https://www.anticorps-enligne.fr>. [En ligne] 2013.
16. **Benjamin Dehay, Miquel Vila, Erwan Bezard, Patrik Brundin, Jeffrey H. Kordower.** Alpha-synuclein propagation: New insights from animal models. *Movement disorders*. 2015, Vol. 31, 161-168.
17. **Recasens A1, Dehay B, Bové J, Carballo-Carbajal I, Dovero S, Pérez-Villalba A, Fernagut PO, Blesa J, Parent A, Perier C, Fariñas I, Obeso JA, Bezard E, Vila M.** Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger α -synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Annals of neurology*. 2014, Vol. 0, 1-12.
18. **Supattapone.** Expanding the prion disease repertoire. *PNAS*. 2015, Vol. 112, 11748-11749.
19. **Borghammer.** How Does Parkinson's Disease Begin? Perspectives on Neuroanatomical Pathways, Prions, and Histology. *Movement disorders*. 2018, Vol. 33, 48-57.
20. **D. James Surmeier, José A. Obeso, Glenda M. Halliday.** Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nat rev neurosci*. 2017, Vol. 18, 101-113.
21. Parkinsonism and akinetic-rigid disorders. <https://clinicalgate.com>. [En ligne] 2015.
22. **Lyon-Acces, ENS.** Aspects biologiques de la maladie de Parkinson. [En ligne] <http://acces.ens-lyon.fr>.
23. Parkinson et Huntington. [En ligne] 2016. <http://uf-mi.u-bordeaux.fr/ter-2016/pastureau-labarchede/references.php>.
24. **Tara Swart, Michael J Hurley.** Calcium Channel Antagonists as Disease Modifying Therapy for Parkinson's Disease: Therapeutic Rationale and Current Status. *CNS drugs*. 2016, Vol. 30, 1127-1135.
25. **Consiglia Pacelli, Nicolas Gigue, Marie-Jose Bourque, Martin Levesque, Ruth S. Slack, Louis-Eric Trudeau.** Elevated Mitochondrial Bioenergetics and Axonal. *Current Biology*. 2015, Vol. 25, 2349-2360.
26. **O. Lieberman, S. Choi, E. Kanter, A. Saverchenko, MD. Frier, G M. Fiore, M. Wu, J. Kondapalli, E. Zampese, D. James Surmeier, D. Sulzer, EV. Mosharov.** alpha-Synuclein-Dependent Calcium Entry Underlies differential Sensitivity of Cultured SN and VTA dopaminergic Neurons to a Parkinsonian neurotoxin. *ENEURO*. 2017, Vol. 4, 1-22.

27. **Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez-Padilla J.** Calcium, cellular aging, and selective neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Cell calcium*. 2010, Vol. 47, 175-182.
28. SEMA7A Gene. *Gene Cards*. [En ligne] [Citation : 19 Mars 2018.]
<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SEMA7A>.
29. **D. James Surmeier, Paul T. Schumacker, Jaime D. Guzman, Ema Ilijic, Ben Yang, Enrico Zampese.** Calcium and Parkinson's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018, Vol. 483, 1013-1019.
30. **Joël N argeot, Pierre Charnet.** Diversité moléculaire des canaux calciques : du gène à la fonction. 1994, Vol. 10, 1293-1308.
31. **Poirrier, Jean-Etienne.** Propriétés biochimiques des canaux calciques voltage-dépendants. [En ligne] 2010.
<http://cyrille.nathalie.free.fr/biologie/travaux/lz1neurobioca.pdf>.
32. **Nadine J Ortner, Jörg Striessnig.** L-type calcium channels as drug targets in CNS disorders. *Channels*. 2016, Vol. 10, 7-11.
33. **Garry Cooper, Efrat Lasser-Katz, Alon Simchovitz, Ronit Sharon, Hermona Soreq, D. James Surmeier, Joshua A. Goldberg.** Functional segregation of voltage-activated calcium channels in motoneurons of the dorsal motor nucleus of the vagus. *J Neurophysiol*. 2015, Vol. 114, 1513-1520.
34. **Nevière, R.** Physiopathologie mitochondriale et. *Réanimation*. 2008, Vol. 17, 185-191.
35. **Cristina Mammucari, Rosario Rizzuto.** Signaling Pathways in Mitochondrial Dysfunction and Aging. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2010, Vol. 131, 536-543.
36. **Martina J. Sinnegger-Brauns, Irene G. Huber, Alexandra Koschak, Claudia Wild, Gerald J. Obermair, Ursula Einzinger, Jean-Charles Hoda,1 Simone B. Sartori, Gerald J. Obermair, Ursula Einzinger, Jean-Charles Hoda, Simone B. Sartori.** Expression and 1,4-Dihydropyridine-Binding Properties of Brain L-Type Calcium Channel Isoforms. *Molecular Pharmacology*. 2009, Vol. 75, 407-414.
37. **E Ilijica, JN Guzman, DJ Surmeiera.** The L-type channel antagonist isradipine is neuroprotective in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol dis*. 2011, Vol. 43, 364-371.
38. **Bensaïd, Manale.** Vulnérabilité des neurones dopaminergiques dans la maladie de Parkinson : rôle des afférences excitatrices des systèmes cholinergique pédonculopontin et orexinergique hypothalamique. *HAL*. [En ligne] 2015. [Citation : 20 Avril 2018.]
<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01165068/document>. 138 p.

39. Résumé des caractéristiques du produit. [En ligne] 2015. [Citation : 18 Avril 2018.]
<http://agence-prd.ansm.sante.fr>.

40. **Tanya Simuni, MD, Kevin Biglan.** Phase II Safety, Tolerability, and Dose Selection Study of Isradipine as a Potential Disease-Modifying Intervention in Early Parkinson's Disease (STEADY-PD). *Movement disorders*. 2013, Vol. 28, 1823-1831.

41. Guide d'évaluation de l'UPDRS. [En ligne] [Citation : 14 Mai 2018.]
<http://www.cofemer.fr>.

42. **K. Biglan, D.Oakes, A. Lang, R. Hauser, K Hodgeman, B.Greco, J. Lowell, R. Rockhill, I. Shoulson, C.Venuto, D. Young, T. Simuni.** A novel design of a Phase III trial of isradipine in early Parkinson disease (STEADY-PD III). *Annals of Clinical and Translational*. 2017, Vol. 4, 360-368.

43. groupe parkinson 29. [En ligne] 2014. [Citation : 22 Janvier 2018.]
<http://gp29.net/?s=dopa>.

ANNEXES

- Annexe 1 : Caractéristiques de base des participants à l'essai phase II. D'après (36) Table 1.

- Annexe 2 : Événements indésirables survenant chez plus de 5% des participants durant l'essai de phase II. D'après (36) Table 2.

- Annexe 3 : Guide d'évaluation de l'UPDRS. D'après (37).

- Annexe 4: Analyse d'efficacité des 4 bras de l'essai de phase II : test Anova, effet de chacun des traitements par rapport au placebo et analyse de l'effet symptomatique basé sur les effets de wash-in et de washout. D'après (36) Table 3 et Table 4.

Annexe 1

TABLE 1. Baseline characteristics of the study participants

	Placebo	5 mg	10 mg	15 mg ^a	20 mg	All
Subjects, n	26	23	26	4	20	99
Male, n (%)	21 (80.8)	15 (65.2)	17 (65.4)	2 (50.0)	14 (70.0)	69 (69.7)
White, n (%)	25 (96.2)	22 (95.7)	22 (91.7)	4 (100.0)	18 (90.0)	91 (93.8)
Age, y, mean (SD)	60.2 (10.1)	57.7 (8.3)	58.5 (11.7)	60.8 (11.1)	59.6 (8.7)	59.1 (9.8)
Onset age, y, mean (SD)	58.5 (10.3)	55.8 (8.2)	56.7 (12.7)	57.8 (10.7)	57.9 (8.8)	57.3 (10.1)
Diagnosis age, y, mean (SD)	59.8 (10.1)	57.5 (8.3)	58.2 (12.1)	60.1 (12.1)	58.8 (8.8)	58.7 (9.9)
Years diagnosed, y, mean (SD)	1.0 (1.1)	0.8 (0.8)	0.9 (0.9)	1.1 (1.2)	1.2 (0.9)	0.9 (0.9)
Total UPDRS, mean (SD)	25.5 (9.4)	26.4 (9.7)	23.7 (9.9)	26.8 (13.9)	24.3 (10.4)	25.0 (9.9)
UPDRS ADL, mean (SD)	5.9 (2.9)	5.8 (3.0)	6.2 (3.0)	6.8 (2.4)	6.6 (3.2)	6.1 (3.0)
UPDRS Motor, mean (SD)	19 (7.3)	19.3 (8.0)	16.9 (7.9)	18.8 (10.2)	16.8 (8.1)	18.0 (7.8)
H&Y stage, mean (SD)	1.7 (0.5)	1.8 (0.4)	1.7 (0.5)	1.3 (0.5)	1.6 (0.5)	1.7 (0.5)
SE, mean (SD)	93.1 (5.1)	93.5 (4.6)	93.1 (5.1)	90 (0.0)	91.3 (5.6)	92.7 (5.0)
MMSE, mean (SD)	29.3 (1.1)	29.3 (0.6)	29.2 (1.0)	29.8 (0.5)	29.3 (0.8)	29.3 (0.9)
MOCA, mean (SD)	27 (2.6)	28 (1.9)	26.9 (2.4)	28.0 (0.0)	27.8 (2.1)	27.4 (2.3)

^aAs per the protocol, newly recruited subjects randomized to the 20-mg group after the results of the interim analysis became available were titrated to the 15-mg maximum dose (n = 4). See Results section.
 UPDRS, Unified Parkinson disease rating scale; ADL, Activities of Daily Living; H&Y, Modified Hoehn and Yahr Scale; SE, Schwab & England Scale; MMSE, Mini-Mental Status Exam; MOCA, Montreal Cognitive Assessment Scale.

Annexe 2

TABLE 2 Adverse events occurring in more than 5% of the participants

Adverse events	Placebo n (%)	5 mg n (%)	10 mg n (%)	15 mg n (%)	20 mg n (%)	Subjects
Peripheral edema						
All	1 (3.85)	4 (17.39)	9 (34.62) ^a	4 (100.00) ^a	12 (60.00) ^a	30
wo/Mild	1 (3.85)	0 (0.00)	4 (15.38)	1 (25.00)	5 (25.00)	
Dizziness						
All	7 (26.92)	5 (21.74)	6 (23.08)	1 (25.00)	5 (25.00)	24
wo/Mild	2 (7.69)	2 (8.70)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
Nasopharyngitis						
All	2 (7.69)	4 (17.39)	7 (26.92)	0 (0.00)	4 (20.00)	17
wo/Mild	2 (7.69)	1 (4.35)	1 (3.85)	0 (0.00)	0 (0.00)	
Headache						
All	3 (11.54)	3 (13.04)	6 (23.08)	0 (0.00)	4 (20.00)	16
wo/Mild	1 (3.85)	1 (4.35)	1 (3.85)	0 (0.00)	0 (0.00)	
Constipation						
All	3 (11.54)	2 (8.70)	3 (11.54)	0 (0.00)	4 (20.00)	12
wo/Mild	0 (0.00)	0 (0.00)	2 (7.69)	0 (0.00)	1 (5.00)	
Fatigue						
All	2 (7.69)	1 (4.35)	3 (11.54)	0 (0.00)	3 (15.00)	9
wo/Mild	1 (3.85)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
Nausea						
All	3 (11.54)	2 (8.70)	1 (3.85)	0 (0.00)	2 (10.00)	8
wo/Mild	2 (7.69)	1 (4.35)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
URT infection						
All	1 (3.85)	2 (8.70)	5 (19.23)	0 (0.00)	0 (0.00)	8
wo/Mild	0 (0.00)	1 (4.35)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
Depression						
All	2 (7.69)	3 (13.04)	1 (3.85)	1 (25.00)	1 (5.00)	8
wo/Mild	1 (3.85)	1 (4.35)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (5.00)	
Somnolence						
All	2 (7.69)	3 (13.04)	2 (7.69)	0 (0.00)	0 (0.00)	7
wo/Mild	0 (0.00)	2 (8.70)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
Insomnia						
All	2 (7.69)	3 (13.04)	1 (3.85)	0 (0.00)	0 (0.00)	7
wo/Mild	0 (0.00)	2 (8.70)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (5.00)	
Dyspepsia						
All	3 (11.54)	1 (4.35)	1 (3.85)	0 (0.00)	1 (5.00)	6
Diarrhea						
All	2 (7.69)	1 (4.35)	2 (7.69)	0 (0.00)	1 (5.00)	6
wo/Mild	1 (3.85)	0 (0.00)	1 (3.85)	0 (0.00)	0 (0.00)	
Sinusitis						
All	3 (11.54)	2 (8.70)	1 (3.85)	0 (0.00)	0 (0.00)	6
wo/Mild	2 (7.69)	1 (4.35)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
Back pain						
All	1 (3.85)	0 (0.00)	2 (7.69)	0 (0.00)	3 (15.00)	6
wo/Mild	1 (3.85)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	2 (10.00)	
Hypotension						
All	1 (3.85)	1 (4.35)	2 (7.69)	1 (25.00)	1 (5.00)	6
Muscle spasms						
All	0 (0.00)	2 (8.70)	1 (3.85)	0 (0.00)	2 (10.00)	5
wo/Mild	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (5.00)	

^aP < 0.05 versus placebo.

wo/Mild, with events judged to be mild eliminated; URT, upper respiratory tract.

Annexe 3

Guide d'valuation de l'UPDRS

tat mental, comportemental et thymique

1 Affaiblissement intellectuel	
Absent	0
Lger. Manque de mmoire habituel avec souvenir partiel des vnements sans autre difficult	1
Perte mn sique mod r e, avec d sorientation et difficult s mod r es faire face des probl mes complexes. Atteinte l g re mais indiscutable de ses capacit s fonctionnelles avec besoin d'une incitation occasionnelle de l'entourage	2
D ficit mn sique grave avec d sorientation dans le temps et souvent dans l'espace. Handicap grave face aux probl mes	3
Perte mn sique s v re avec uniquement conservation de sa propre orientation. Incapable de porter des jugements ou de r soudre des probl mes, demande beaucoup d'aide pour les soins personnels, ne peut plus tre seul	4
2 Troubles de la pens e	
Aucun	0
R ves anim s	1
Hallucinations b nignes critiqu es	2
Hallucinations occasionnelles ou fr quentes ou id es d lirantes non critiqu es : peuvent g ner les activit s quotidiennes	3
Hallucinations continuelles. Id es d lirantes ou psychose expansive : incapable de prendre soin de lui-m me	4
3 D pression	
Absente	0
P riodes de tristesse ou sentiment de culpabilit excessif ne persistant pas plusieurs jours ou semaines	1
D pression durable (une semaine ou plus)	2
D pression durable avec sympt mes v g tatifs (insomnie, anorexie, pertes de poids, perte d'int r t)	3
D pression durable avec sympt mes v g tatifs et pens es ou intentions suicidaires	4
4 Motivation-Initiative (Akin sie)	
Normale	0
Moins franche qu' l'habitude : plus passif	1
Perte d'initiative avec d sint r t pour certaines activit s non routi ni res	2
Perte d'initiative ou d sint r t dans les activit s quotidiennes routi ni res	3
Absence d'initiative, perte totale d'int r t	4



Activités dans la vie quotidienne

(à terminer en période ON et en période OFF)

5 Parole	
Normale	0
Légèrement perturbée, pas de difficulté majeure	1
Modérément perturbée. On doit occasionnellement lui demander de répéter	2
Gravement perturbée. On doit lui demander fréquemment de répéter	3
Incompréhensible la plupart du temps	4
6 Salivation	
Normale	0
Légère, mais excès habituel de salive dans la bouche, peut baver pendant la nuit	1
Hypersialorrhée modérée. Peut baver pendant la nuit	2
Hypersialorrhée nette avec un peu de bave	3
écoulement habituel de bave nécessitant en permanence un mouchoir	4
7 Déglutition	
Normale	0
S'étrangle rarement	1
S'étrangle occasionnellement	2
Nécessite une alimentation semi-liquide	3
Nécessite une alimentation par sonde gastrique ou une gastrostomie	4
8 Lecture	
Normale	0
Légèrement ralentie ou micrographique	1
Nettement ralentie ou micrographique, tous les mots sont lisibles	2
Gravement perturbée : tous les mots ne sont pas lisibles	3
La majorité des mots est illisible	4
9 S'alimenter et manipuler les couverts	
Normale	0
Un peu lent et maladroit, mais n'a pas besoin d'aide	1
Pour la plupart des aliments, peut se débrouiller seul quoique maladroit et lent	2
A besoin d'une aide pour les repas, mais peut encore s'alimenter lentement	3
On doit lui donner à manger	4
10 Habillage	
Normal	0
Un peu lent, mais ne doit pas d'aide	1
Aide occasionnelle pour boutonner, enfiler une manche	2
A besoin d'aide, mais peut encore faire certaines choses seul	3
Totalement dépendant	4
11 Hygiène	
Normale	0
Un peu lent, mais n'a pas besoin d'aide	1
Nécessite une aide pour la douche et le bain, ou très lent dans les soins hygiéniques	2
Nécessite une aide pour se laver, se brosser les dents, se coiffer et se baigner	3
Sonde urinaire ou autres aides mécaniques	4
12 Se retourner dans son lit et arranger les draps et couvertures	
Normal	0
Un peu lent et maladroit, mais n'a pas besoin d'aide	1
Peut se retourner seul ou arranger les draps mais avec une grande difficulté	2
Peut commencer le geste mais n'arrive pas à se retourner ou arranger les draps seul	3
Dépendant	4



13 Chute non li e au pi timent	
Aucune	0
Chutes rares	1
Chutes occasionnelles, mais moins d'une fois par jour	2
En moyenne, une chute par jour	3
Chutes pluri quotidiennes	4
14 Pi timent lors de la marche	
Aucun	0
Rare pi timent lors de la marche, peut avoir une h sitation au d part	1
Pi timent occasionnel lors de la marche	2
Pi timent fr quent entra nant occasionnellement des chutes	3
Chutes fr quentes dues aux pi timents	4
15 Marche	
Normale	0
Difficult s l g res, mais peut balancer les bras ou tra ner les pieds	1
Difficult s mod r es mais ne demande que peu ou pas d'aide	2
Difficult s importantes la marche n cessitant une aide	3
Ne peut pas marcher du tout, m me avec une aide	4
16 Tremblement	
Absent	0
L ger et rarement pr sent	1
Mod r , g nant le patient	2
Important, g ne certaines activit s	3
Marqu , g ne la plupart des activit s	4
17 Troubles sensitifs subjectifs li s au parkinsonisme	
Aucun	0
Occasionnellement engourdissements, picotements ou douleurs l g res	1
Engourdissements, picotements ou douleurs fr quentes : pas g nant	2
Sensations douloureuses fr quentes	3
Douleurs tr s vives	4

Examen moteur (p riode ON ou OFF)

Conseils et pi ges de la passation du score moteur

(facteur III)

Le score moteur permet d' valuer objectivement l' volution de la maladie au cours du temps.

■ Conseils

- 1] Important de noter la p riode (ON ou OFF) chez le patient fluctuant et l'heure de l'examen.
- 2] Noter chaque main s par ment pour les items 23 et 24. Demander les deux mains ensemble pour l'item 25 (ceci permet de mettre en vidence une atteinte droite ou gauche de la maladie).
- 3] Remplir l'item 33 du facteur IV qui value l'intensit des dyskin sies.
Car m me si on cote que le score moteur, les dyskin sie g nent l'appr ciation de ce score en ON.
- 4] L'item 31 est un bon reflet du score moteur.
Si vous disposez d'un temps tr s court, ne remplissez que cet item.
- 5] Pour plus d'objectivit , il est n cessaire de remplir cette chelle sans conna tre la pr c dente cotation.
- 6] Signification globale des r sultats :

6-12 / 108 : p riode de lune de miel,
12-30 / 108 : maladie install e,
30-80 / 108 : maladie s v re.



■ Pi ges

- 1] Le score moteur est une aide à la décision thérapeutique mais ce n'est pas le reflet de l'autonomie du patient. En effet un même score moteur peut caractériser un patient très autonome (stade 2) comme un patient très handicapé (stade 4).
- 2] L'item 32 du facteur IV est difficile à valuer car le patient n'a souvent pas conscience de ses dyskinésies.

18 Parole	
Normale	0
Légère perte d'expression, de la diction et/ou du volume vocal	1
Voix monotone, bredouille mais compréhensible, altération modérée	2
Altération marquée, difficile à comprendre	3
Incompréhensible	4
19 Expression faciale	
Normale	0
Hypomimie légère, semble avoir un visage normalement impassible	1
Diminution légère mais franchement anormale de l'expression faciale	2
Hypomimie modérée : lèvres souvent entrouvertes	3
Masque facial ou faciès figé avec perte importante ou totale de l'expression faciale : lèvres entrouvertes (0,6 cm ou plus)	4
20 Tremblement de repos	
Absent	0
Léger et rarement présent	1
Tremblement de faible amplitude mais persistant, ou d'amplitude modérée, mais présent seulement de façon intermittente	2
Tremblement modéré en amplitude et présent la plupart du temps	3
Tremblement d'amplitude marquée et présent la plupart du temps	4
21 Tremblement d'action ou tremblement postural des mains	
Absent	0
Léger, présent lors de l'action	1
Modéré en amplitude, présent lors de l'action	2
Modéré en amplitude, tant lors du maintien postural que lors de l'action	3
Amplitude marquée, gêne l'alimentation	4
22 Rigidité (valuée lors des mouvements passifs des principales articulations avec un malade relâché, en position assise. Ne pas tenir compte de la roue dentée)	
Absente	0
Minime ou apparaissant lors des manœuvres de sensibilisation	1
Légère ou modérée	2
Marquée, mais la plupart des mouvements peuvent être effectués aisément.	3
Sévére, les mouvements sont effectués difficilement	4
23 Tapotement des doigts (le malade fait les mouvements rapides et de large amplitude du pouce sur l'index)	
Normal	0
Ralentissement léger et/ou réduction d'amplitude	1
Modérément perturbé, se fatigue nettement et rapidement, peut avoir d'occasionnels arrêts du mouvement	2
Sévérement perturbé. Situations fréquentes au démarrage du mouvement	3
Peut peiner à effectuer le mouvement	4



24 Mouvements des mains (le malade ouvre et ferme rapidement les mains avec la plus grande amplitude possible, chaque main s par ment)	
Normal	0
Ralentissement l ger et/ou r duction d'amplitude	1
Mod r ment perturb , se fatigue nettement et rapidement, peut avoir d'occasionnels arr ts du mouvement	2
S v rement perturb . H situations fr quentes au d but du mouvement ou arr t en cours de mouvement	3
Peut peine effectuer la t che	4
25 Mouvements alternatifs rapides (mouvements de pronation des mains verticalement ou horizontalement, avec la plus grande amplitude possible, les deux mains simultan ment)	
Normaux	0
Ralentissement l ger et/ou r duction d'amplitude	1
Mod r ment perturb , se fatigue nettement et rapidement, peut avoir d'occasionnels arr ts du mouvement	2
S v rement perturb . H situations fr quentes au d but du mouvement ou arr t en cours de mouvement	3
Peut peine effectuer la t che	4
26 Agilit de la jambe (le patient tape le talon sur le sol de façon rapide en soulevant tout le pied. L'amplitude doit tre d'environ 7,5 cm en position assise)	
Normaux	0
Ralentissement l ger et/ou r duction d'amplitude	1
Mod r ment perturb , se fatigue nettement et rapidement, peut avoir d'occasionnels arr ts du mouvement	2
S v rement perturb . H situations fr quentes au d but du mouvement ou arr t en cours de mouvement	3
Peut peine effectuer la t che	4
27 Se lever d'une chaise (le patient essaye de se lever d'une chaise dos droit en bois ou en m tal, les bras pli s devant la poitrine)	
Normal	0
Lentement ou a besoin de plus d'un essai	1
Pousse sur les bras du si ge	2
Tend tomber en arri re et doit essayer plus d'une fois mais peut se lever sans aide	3
Incapable de se lever sans aide	4
28 Posture	
Normalement droite	0
Pas tout fait droite, posture l g rement fl chie : cette attitude peut tre normale pour une personne plus g e	1
Posture mod r ment fl chie, nettement anormale : peut tre l g rement pench e d'un c t	2
Posture s v rement fl chie avec cyphose : peut tre mod r ment pench d'un c t	3
Flexion marqu e avec posture tr s anormale	4
29 Stabilit posturale (r ponse un d placement post rieur soudain produit par une pouss e sur les paules alors que le patient est debout les yeux ouverts et les pieds l g rement cart s. Le patient doit- tre pr venu)	
Normale	0
Gesticulations mais se r tablit l quilibre sans aide	1
Absence de r ponse posturale : peut tomber s'il n'est pas retenu par l'examineur	2
Tr s instable, tend perdre l quilibre spontan ment	3
Incapable de se tenir debout sans aide	4

30 D marche	
Normale	0
Marche lentement, mais traîne les pieds et fait de petits pas, mais sans festinations, ni propulsions possibles	1
Marche avec difficulté, mais nécessite peu ou pas d'aide : festination, petits pas ou propulsions possibles	2
Perturbation sérieuse de la marche, nécessitant une aide	3
Ne peut pas marcher du tout, même avec aide	4
31 Bradykinésie corporelle et hypokinésie (combinant la lenteur, l'hésitation, la diminution du ballant des bras, l'amplitude faible et la pauvreté des mouvements en général)	
Aucune	0
Lenteur minime, donnant aux mouvements un caractère délabré, pourrait être normal pour certaines personnes. Possibilité d'une réduction d'amplitude	1
Degré léger de lenteur et de pauvreté du mouvement qui est nettement anormal. De plus, il existe une certaine réduction d'amplitude	2
Lenteur modérée, pauvreté et petite amplitude du mouvement	3
Lenteur marquée, pauvreté et petite amplitude du mouvement	4

Complications du traitement (au cours de la dernière semaine)

■ Dyskinésies

32 Durée Durant quelle proportion au cours de la journée les dyskinésies sont-elles présentes ? (information obtenue par l'interrogatoire)	
Aucune	0
1-25 % de la journée	1
26-50 % de la journée	2
51-75 % de la journée	3
76-100 % de la journée	4
33 Incapacité les dyskinésies entraînent-elles une incapacité ?	
Aucune	0
Légère	1
Modérée	2
Sérieuse	3
Complète	4
34 Dyskinésies douloureuses les dyskinésies entraînent-elles des douleurs ?	
Aucune	0
Légères	1
Modérées	2
Sérieuses	3
Marquées	4
35 Présence d'une dystonie matinale précoce (information obtenue par l'interrogatoire)	
Non	0
Oui	1



■ Fluctuations cliniques

36 Y a-t-il des p riodes OFF dont on peut pr dire la survenue apr s une prise m dicamenteuse ?	
Non	0
Oui	1
37 Y a-t-il des p riodes OFF dont on ne peut pas pr dire la survenue apr s une prise m dicamenteuse ?	
Non	0
Oui	1
38 Est-ce que certaines des p riodes OFF se produisent soudainement, c'est- -dire en quelques secondes ?	
Non	0
Oui	1
39 Quelle est la proportion du temps au cours de la journ e durant laquelle le patient est en moyenne, en situation OFF ?	
Aucune	0
1 25 % de la journ e	1
26 50 % de la journ e	2
51 75 % de la journ e	3
76 100 % de la journ e	4

■ Autres complications

40 Le patient est-il anorexique, a-t-il des naus es ou des vomissements ?	
Non	0
Oui	1
41 Le patient a-t-il des troubles du sommeil, par exemple insomnie ou somnolence excessive ?	
Non	0
Oui	1
42 Le patient a-t-il une hypotension orthostatique symptomatique ?	
Non	0
Oui	1



Stade de Hoehn et Yahr

- Stade 0** : pas de signe de la maladie.
- Stade 1** : maladie unilatérale.
- Stade 1,5** : maladie unilatérale, plus atteinte axiale.
- Stade 2** : maladie bilatérale sans trouble de l'équilibre.
- Stade 2,5** : maladie bilatérale légère avec rétablissement lors du test de la poussée.
- Stade 3** : maladie bilatérale légère modérée : une certaine instabilité posturale, physiquement autonome.
- Stade 4** : handicap sévère : toujours capable de marcher ou de se tenir debout sans aide.
- Stade 5** : malade en chaise roulante ou alité sauf s'il est aidé.

échelle d'activité de la vie quotidienne de Schwab et England

- 100 %** : totalement indépendant. Est capable d'effectuer toutes les activités sans lenteur, difficulté ou gêne. Tout fait normal, n'ayant conscience d'aucune difficulté.
- 90 %** : complètement indépendant. Est capable d'effectuer toutes les activités avec un certain degré de lenteur, de difficulté, de gêne. Peut mettre deux fois plus de temps. Commence à avoir conscience de ses difficultés.
- 80 %** : complètement indépendant dans la plupart des activités. Met deux fois plus de temps. Conscient de ses difficultés et de sa lenteur.
- 70 %** : pas complètement indépendant. Beaucoup de difficultés pour certaines activités. Trois ou quatre fois plus lent dans certaines d'entre elles. Peut passer une grande partie de la journée pour les activités de base.
- 60 %** : partiellement dépendant. Peut effectuer un certain nombre d'activités, mais très lentement et avec beaucoup d'efforts, fait des erreurs : certaines activités sont impossibles.
- 50 %** : est plus dépendant. Doit être aidé dans la moitié des activités, plus lent. Difficultés pour chaque chose.
- 40 %** : très dépendant. Peut effectuer toutes les activités avec aide, mais peu d'entre elles seul.
- 30 %** : effectue seul peu d'activités, avec effort, mais ne fait que les commencer seul. Plus d'aide est nécessaire.
- 20 %** : ne fait rien seul. Peut légèrement aider pour certaines activités. Invalidité sévère.
- 10 %** : totalement dépendant, ne peut aider en rien, complètement invalide.
- 0 %** : certaines fonctions vitales telles que la déglutition, les fonctions urinaires et les fonctions intestinales sont altérées. Alité.



Annexe 4

TABLE 3. Efficacy analysis

A: ANOVA, adjusting for baseline value of measure*

Outcomes	Placebo	5 mg	10 mg	15-20 mg	P
UPDRS Total	7.4 (1.39)	7.4 (1.48)	6.3 (1.39)	5.4 (1.45)	0.7107
UPDRS Motor	4.3 (1.03)	3.5 (1.09)	3.9 (1.03)	3.7 (1.07)	0.9505
SE/ADL	-5.04 (0.96)	-5.56 (1.02)	-3.69 (0.96)	-3.76 (1.01)	0.4603
H&Y stage	0.27 (0.08)	0.22 (0.08)	0.12 (0.08)	0.11 (0.08)	0.3937

B: Treatment effect compared to placebo (95% CIs)

Outcomes	5 mg versus placebo	10 mg versus placebo	15-20 mg versus placebo	Outcomes	5 mg versus placebo
UPDRS Total	0.04 (-3.99, 4.07)	-1.10 (-5.01, 2.80)	-2.00 (-5.98, 1.99)	UPDRS Total	0.04 (-3.99, 4.07)
UPDRS Motor	-0.83 (-3.80, 2.14)	-0.41 (-3.30, 2.48)	-0.64 (-3.58, 2.31)	UPDRS Motor	-0.83 (-3.80, 2.14)
SE/ADL	-0.52 (-3.30, 2.26)	1.35 (-1.35, 4.04)	1.27 (-1.51, 4.05)	SE/ADL	-0.52 (-3.30, 2.26)
H&Y stage	-0.05 (-0.27, 0.17)	-0.15 (-0.36, 0.07)	-0.16 (-0.38, 0.06)	H&Y stage	-0.05 (-0.27, 0.17)

Least square means (standard errors).

ANOVA, analysis of variance; UPDRS, Unified Parkinson disease rating scale; SE, Schwab & England Scale; ADL, Activities of Daily Living; H&Y, Modified Hoehn and Yahr Scale; CI, confidence interval.

TABLE 4. Analysis of the symptomatic effect based on the wash-in and washout effects

Outcomes	Placebo	5 mg	10 mg	15-20 mg	P
Changes from baseline to 12 weeks (titration phase)					
UPDRS Total	1.52 (1.05)	2.26 (1.09)	0.67 (1.12)	-0.81 (1.11)	0.2417
UPDRS Motor	0.52 (0.70)	1.55 (0.73)	0.73 (0.74)	-0.81 (0.74)	0.1595
SE/ADL	-1.79 (0.76)	-1.61 (0.80)	-1.74 (0.82)	-1.14 (0.82)	0.9415
H&Y stage	0.12 (0.07)	0.14 (0.07)	0.12 (0.07)	-0.01 (0.07)	0.4316
Changes from 52 to 54 weeks (washout phase)					
UPDRS Total	1.32 (0.99)	-0.60 (1.10)	-0.13 (1.03)	-0.09 (1.20)	0.5793
UPDRS Motor	0.57 (0.80)	-0.65 (0.90)	-0.70 (0.84)	-1.12 (0.98)	0.5353
SE/ADL	-0.45 (0.65)	0.33 (0.72)	0.63 (0.67)	0.66 (0.78)	0.6298
H&Y stage	0.07 (0.06)	-0.06 (0.07)	-0.03 (0.07)	-0.16 (0.08)	0.1656

*Values are analysis of variance (ANOVA), adjusting for baseline value of the measure. Positive signs denote worsening, negative signs improvement. UPDRS, Unified Parkinson disease rating scale; SE, Schwab & England Scale; ADL, Activities of Daily Living; H&Y, Modified Hoehn and Yahr Scale.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.