Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans l'infiltration cérébrale des lymphocytes T dans la maladie de Parkinson

Amaury Bekaert

▶ **To cite this version:**

Amaury Bekaert. Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans l'infiltration cérébrale des lymphocytes T dans la maladie de Parkinson. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05T013 . tel-01195987

HAL Id: tel-01195987

https://theses.hal.science/tel-01195987

Submitted on 8 Sep 2015

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.

UNIVERSITE PARIS DESCARTES – PARIS V

Ecole doctorale GC2ID

DEA de Biologie du Vieillissement

Thèse présentée par AMAURY BEKAERT

ETUDE DES MECANISMES MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS L'INFILTRATION CEREBRALE DES LYMPHOCYTES T DANS LA MALADIE DE PARKINSON

Soutenue le 7 septembre 2012, devant le jury composé de :

Dr. Jacques EPELBAUM	Président
Dr. Emmanuel BROUILLET	Rapporteur
Dr. Klaus PETRY	Rapporteur
Dr. David BLUM	Examinateur
Dr. Christophe COMBADIERE	Examinateur
Dr. Etienne HIRSCH	Directeur de thèse
Dr. Stéphane HUNOT	Co-directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier Jacques Epelbaum qui a accepté de présider mon jury de thèse.

Mes remerciements vont également aux membres du jury, Messieurs David Blum, Emmanuel Brouillet, Christophe Combadière et Klaus Petry pour avoir accepté d'examiner ma thèse.

Je remercie Etienne de m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour ses conseils.

Stéphane, merci de m'avoir donné les moyens de réaliser cette thèse.

Merci à Christophe, Sébastien et Lucie pour leur collaboration qui nous a permis de développer les approches de transfert passif. Merci également à Marie-Caroline et Tessa pour leur aide dans la réalisation des qPCR Arrays. Sans oublier Sylvain et Claire pour leur aide concernant le FACS.

Merci Yann, j'ai beaucoup appris de toi pour la mise en place de mes expériences et tes compétences techniques indéniables m'ont été d'une grande aide.

Cécile, j'ai beaucoup apprécié travailler avec toi, merci beaucoup pour ton aide au cours de ma 4^{e} année de thèse.

Annick, merci pour tes nombreux conseils concernant l'immunohistochimie et la bonne humeur avec laquelle tu les dispenses.

Merci Andrée et Aurélien pour votre gentillesse et pour m'avoir formé à l'imagerie.

Léa et Josiane, merci de vous occuper aussi bien de toutes les questions administratives.

Merci à Michèle qui m'a bien aidée lors de l'impression de ma thèse.

Aux anciens, Lixia merci pour m'avoir transmis tes compétences de biologie moléculaire. Daniel, pour ton humour et ta gentillesse. Damien, nous avons passé 3 ans côté à côte, merci

pour tes conseils judicieux concernant la façon de mener sa thèse et pour les discussions autour d'un verre. Vanessa, le bébé a grandi, j'ai essayé de lui donner des bases solides, le relai passe maintenant.

Je voudrais également remercier pour leur amitié et les bons moments passés ensemble : Serge, j'adore ta bonne humeur quotidienne, Manale et Inma avec qui j'apprécie de discuter et de danser, Vincent j'aime ta capacité d'écoute et ta simplicité, Erwann, le papa de notre fine équipe, Christian pour tes nombreux conseils et également ta bonne humeur habituelle. Sans oublier Patrick, Cécile, Marie-Paule, Sandro, Martina, Julia, Pinar, Gaelle, Jérôme et toutes les personnes que j'ai rencontrées au cours de cette thèse.

Je remercie également Amandine et Morgane avec lesquelles nous avons débuté l'association. Sans oublier Patricia qui nous a été d'un grand secours dans l'organisation de la retraite à Lisbonne et qui est toujours prête à nous aider.

J'aimerais tout particulièrement remercier mes amis et professeurs d'aïkido qui m'ont beaucoup apporté et soutenu au cours des 3 dernières années. Jacques, merci pour ce chemin de vie que tu nous proposes. François, Trang, Mikaël et Marie pour les très bons moments passés ensemble, c'est un réel plaisir de parcourir ce chemin avec vous ! Rémi et Valentin j'aime beaucoup votre simplicité dans la relation à autrui dont j'essaie de m'inspirer. Stéphane, Gabriel, Marcus et André merci pour votre amitié et votre aide dans l'appréhension de la voie tracée par maître Tamura.

Nathan et Chico, que de chemin parcouru depuis le DUT !

Werrick, merci pour ton amitié inconditionnelle depuis plus de 10 ans.

Je remercie mes parents pour leur soutien dans mes choix de vie et pour leur patience. Je pense également à mes grands parents, merci pour tout ce que vous m'avez donné. Merci à toute ma famille pour leurs pensées et leur soutien.

INTRODUCTION

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LA MALADIE DE PARKINSON 3
1. Description neuropathologique 3
1.1. Lésions dopaminergiques 3
1.2. Lésions non dopaminergiques 5
1.3. Corps de Lewy 5
1.4. Gliose réactionnelle et infiltration lymphocytaire 7
2. Etiologie de la maladie de Parkinson 9
2.1. Rôle du vieillissement 9
2.2. Facteurs génétiques 10
2.3. Facteurs environnementaux 12
2.4. Autres causes 13
II. HYPOTHESES CONCERNANT LES MECANISMES DE MORT DES NEURONES DOPAMINERGIQUES 14
1. Modèles animaux de la maladie de Parkinson 14
1.1. Modèles toxiques 15
1.1.1 Modèle d'intoxication par le MPTP 15
a) Mécanisme d'action du MPTP 16
b) Modèles animaux 17
1.1.2 Autres modèles toxiques 18
1.2. Modèles génétiques 20
1.3. Combinaison des modèles toxiques et génétiques 22
2. Hypothèses de la mort neuronale 23
2.1. Altérations mitochondriales 23
2.1.1 Déficience des complexes de la chaîne respiratoire 23
2.1.2 Fonction des gènes mutés dans les formes familiales de maladie de Parkinson 24
2.2. Stress oxydatif 25
2.3. Déficit d'excitabilité des neurones 27
2.4. Dysfonction des voies de dégradation protéique 28
2.5. Rôle de l'α-synucléine 29
III. NEURODEGENERESCENCE ET NEUROINFLAMMATION : MECANISMES NON AUTONOMES DE LA MORT NEURONALE 30
1. Immunité innée et neuroinflammation 31
1.1. Qu'est ce que l'immunité innée ? 31
1.2. Les acteurs moléculaires 31
1.2.1 Cytokines 31
1.2.2 Les systèmes catalytiques du « burst » oxydatif 32
1.3. Les acteurs cellulaires 33
1.3.1 Les microglies 33
1.3.2 Les astrocytes 35
2. Immunité adaptative 36
3. Neuroinflammation et maladie de Parkinson 40
3.1. Immunité innée dans la maladie de Parkinson 41
3.2. Immunité adaptative dans la maladie de Parkinson 43
IV. MECANISMES D'INFILTRATION CEREBRALE DES LEUCOCYTES 46

1. Voies d'entrée principales 46
1.1. Plexus choroïdes 47
1.2. Les méninges 48
1.3. La barrière hémato-encéphalique 49
2. Cascade moléculaire conduisant à la diapédèse dans le système nerveux central 50
2.1. Un processus multi-étapes 50
2.2. Implication des molécules d'adhésion 52
2.2.1. Description de la famille des molécules d'adhésion et de leurs rôles physiologiques 52
2.2.2 Fonctions des molécules d'adhésion dans les pathologies inflammatoires 53
2.3. Implication des chimiokines 54
2.3.1. Description de la famille des chimiokines 54
2.3.2. Fonctions des chimiokines dans la neuroinflammation 56
a) Recrutement des cellules myéloïdes 56
b) Recrutement des granulocytes 57
c) Recrutement des lymphocytes 57
2.3.3. Expression des chimiokines dans la maladie de Parkinson. 60

OBJECTIFS

I. CARACTERISER L'EXPRESSION DES CHIMIOKINES ET DES MOLECULES D'ADHESION DANS UN CONTEXTE LESIONNEL DE LA VOIE NIGRO-STRIEE CHEZ LA SOURIS 62

II. DETERMINER LE ROLE DES CHIMIOKINES DANS L'INFILTRATION LYMPHOCYTAIRE ET LA DEGENERESCENCE DOPAMINERGIQUE DANS UN CONTEXTE LESIONNEL DE LA VOIE NIGRO-STRIEE 63

III. ETUDIER L'EXPRESSION DES CHIMIOKINES DANS LE TISSU HUMAIN POST-MORTEM DE PATIENTS PARKINSONIENS 63

METHODOLOGIE

I. CERVEAUX HUMAINS *POST-MORTEM* 64
1. Description des pièces anatomiques 64
2. Préparation du tissu humain 65

II. MODELES EXPERIMENTAUX IN VIVO 65
1. Animaux 65
2. Intoxication des animaux par le MPTP 66
3. Méthode de transfert passif de leucocytes 66
4. Injection du Met-RANTES 67
5. Chirurgie stéréotaxique 68
6. Prélèvement de sang et cytométrie en flux 68
7. Sacrifice et préparation des tissus 70

III. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE 71
1. Préparation de l'ARN 71
1.1. Extraction des ARN totaux 71
1.2. Dosage et contrôle qualité des ARN 71

2. Transcriptomique 72
2.1 Etude transcriptomique : Oligoarrays 72
2.1.1 Amplification linéaire et marquage des ARN 72
2.1.2 Hybridation et révélation 73
2.2. Biopuces TaqMan® 73
2.2.1 Rétrotranscription 73
2.2.2. Amorces et PCR quantitative 74
3. PCR quantitative 75
3.1 Chez la souris 75
3.1.1. Rétrotranscription 75
3.1.2. Amorces et PCR quantitative 75
3.2. Chez l'homme 76
3.2.1. Qualité des ARN 76
3.2.2. Rétrotranscription 76
3.2.3 Amorces et PCR quantitative 77
3.3. Tests d'efficacité des couples d'amorces de PCR quantitative 77
IV. DOSAGE PROTEIQUE PAR ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) 78
1. Extraction protéique 78
2. Dosage des protéines 78
3. Dosage des chimiokines par ELISA 78
V. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES 79
1. Marquage immunohistochimique 79
2. Triple marquage immunofluorescent 79
3. Quantification des neurones TH+ 80
VI. ANALYSE STATISTIQUE 81

RESULTATS

I. CARACTERISATION DE L'EXPRESSION DES CHIMIOKINES ET DES MOLECULES D'ADHESION DANS UN MODELE MURIN DE MALADIE DE PARKINSON 85
1. Etude transcriptomique 85
1.1. Oligoarrays 85
1.1.1 Présentation 85
1.1.2 Résumé des principaux résultats 85
1.2. TaqMan Arrays 88
1.2.1 Présentation 88
1.2.2 Résumé des principaux résultats 88
2. Caractérisation protéique 93
2.1. Détection des chimiokines par ELISA 93
2.1.1. Présentation 93
2.1.2. Résumé des principaux résultats 93
2.2. Détection des chimiokines par immunomarquages en fluorescence 94
2.2.1. Spécificité des anticorps dirigés contre les chimiokines 95
a) Présentation 95
b) Résumé des principaux résultats 95
2.2.2. Détection des chimiokines par immunomarquage 97
a) Présentation 97
b) Résumé des principaux résultats 97
2.2.3. Confirmation de la localisation cellulaire par microscopie confocale 103

a) Présentation *103*
b) Résumé des principaux résultats *103*

II. ETUDE DU ROLE DES CHIMIOKINES DANS LES MECANISMES D'INFILTRATION LYMPHOCYTAIRE 105

1. Expériences de délétions constitutives de récepteurs aux chimiokines 106
1.1. Présentation 106
1.2. Résumé des principaux résultats 106
2. Expériences de blocage multiple de récepteurs aux chimiokines 108
2.1. Présentation 108
2.2. Résumé des principaux résultats 110
3. Expériences de délétion de récepteurs aux chimiokines à l'échelle leucocytaire 111
3.1. Etude des lymphocytes dans le sang périphérique 111
3.1.1. Présentation 111
3.1.2. Résumé des principaux résultats 112
3.2. Dégénérescence dopaminergique et infiltration lymphocytaire 113
3.2.1. Présentation 113
3.2.2. Résumé des principaux résultats 113

III. EXPRESSION DES CHIMIOKINES DANS LA MALADIE DE PARKINSON 113

1. Présentation 113
2. Résumé des principaux résultats 114

DISCUSSION

I. MECANISMES NON AUTONOMES ET MALADIE DE PARKINSON 174

1. Réponses immunitaires innées et adaptatives dans la maladie de Parkinson 174
2. Stratégies thérapeutiques ciblant le système immunitaire 175

II. CARACTERISATION DE L'EXPRESSION DES CHIMIOKINES DANS UN CONTEXTE PATHOLOGIQUE DU SYSTEME NIGRO-STRIE 177

1. Signature chimiokinique du système nigro-strié pathologique 177
2. Expression cellulaire des chimiokines. 181
3. Localisation subcellulaire des chimiokines 184

III. IMPLICATION DES CHIMIOKINES DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DES LYMPHOCYTES T DANS LES SYNDROMES PARKINSONIENS 185

CONCLUSION/PERSPECTIVES

REFERENCES

6-OHDA	6-hydroxydopamine
ADNc	ADN complémentaire
ARNc	ARN complémentaire
ADNmt	ADN mitochondrial
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
ASB	Albumine sérique bovine
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CCL	Chimiokine ligand
CCR	Chimiokine Récepteur
Courbe 4PL	Courbe logistique à quatre paramètres
COX	Cyclooxygénase
DPM	Délai *post mortem*
EAE	Experimental autoimmune encephalomyelitis
EIA	Enzyme immunoassay
ERO	Espèce réactive de l'oxygène
ERA	Espèce réactive de l'azote
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HLA	Human leucocyte antigen
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FasL	Fas Ligand
Iba1	Ionized calcium binding adaptor molecule 1
IFNγ	Interféron gamma
IL	Interleukine Iscove's
IMDM	Modified Dulbecco's Media
LPS	Lipopolysacharride
MP	Maladie de Parkinson
MPP+	1-méthyl-4-phénylpiridinium
MPO	Myéloperoxydase
MPTP	1-méthyl-4-1,2,3,6-tétrahydropyridine
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NDA	Neurone dopaminergique
NL	Neurite de Lewy
NOS	Nitric oxyde synthase
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PNH	Primate non humain
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
SEP	Sclérose en plaque
SN	Substantia nigra
SNpc	Substantia nigra *pars compacta*
SNpr	Substantia *pars reticulata*
SNpl	Substantia nigra *pars lateralis*
SCID	Severe combined immunodeficiency
TDA	Transporteur de la dopamine
Tc	Lymphocyte T cytotoxique
TCR	T cell receptor
Th	Lymphocyte T helper
TH	Tyrosine hydroxylase
TLR	Toll-like receptor
Treg	Lymphocyte T régulateur

RESUME

La maladie de parkinson est une affection neurologique caractérisée par une dégénérescence des neurones dopaminergiques du mésencéphale ventral et une perte de l'innervation dopaminergique striatale à l'origine de symptômes moteurs (akinésie, rigidité et tremblement de repos). L'absence de traitements curatifs s'explique notamment par notre large méconnaissance des mécanismes conduisant à la mort neuronale. De nombreuses données supportent un rôle du système immunitaire inné dans ces processus de dégénérescence. Récemment, plusieurs études ont également suggéré le rôle de la réponse immunitaire adaptative dans ces phénomènes. Ainsi une infiltration cérébrale de lymphocytes T $CD4^+$ est observée chez les patients parkinsoniens. Celle-ci pourrait jouer un rôle délétère dans les mécanismes conduisant à la mort des neurones dopaminergiques comme le suggèrent certaines données *in vivo* dans des modèles de la maladie. Par conséquent, le blocage de cette infiltration lymphocytaire pourrait constituer une stratégie thérapeutique intéressante pour ralentir la dégénérescence neuronale.

Notre hypothèse de travail est qu'un processus actif de remodelage de la barrière hémato-encéphalique permettrait aux cellules du système immunitaire adaptatif de pénétrer le parenchyme cérébral. Ainsi les chimiokines et les molécules d'adhésion constituent deux grandes familles de protéines impliquées dans les phénomènes d'infiltration tissulaire des leucocytes en condition inflammatoire. A notre connaissance, aucune étude détaillée des mécanismes permettant l'infiltration cérébrale des lymphocytes dans les syndromes parkinsoniens n'a été réalisée.

Afin de tester cette hypothèse, le projet a eu plusieurs objectifs : (1) caractériser l'expression des chimiokines et des molécules d'adhésion dans un modèle murin de lésion du système nigro-strié (2) déterminer le rôle du réseau chimiokinique dans le processus d'infiltration lymphocytaire et la dégénérescence dopaminergique dans ce modèle (3) étudier l'expression des facteurs candidats dans la substance noire des patients parkinsoniens.

Dans notre étude, nous avons pu montrer une augmentation d'expression transcriptionnelle et protéique très importante des trois chimiokines CCL3, CCL4 et CXCL10 dans le mésencéphale ventral de souris intoxiquées par le MPTP (un modèle expérimental de maladie de Parkinson). La source cellulaire de ces facteurs était les cellules microgliales pour CCL3 et CCL4 et les astrocytes pour CXCL10.

Pour aborder le rôle de ces facteurs dans les processus physiopathologiques, notre stratégie a été de cibler les récepteurs des ligands identifiés, en particulier CXCR3, CCR5 et CCR1. Bien que la déficience constitutive de chacun de ces récepteurs ne confère qu'une faible protection des neurones dopaminergiques et une faible diminution de l'infiltration lymphocytaire, une stratégie de blocage multiple des récepteurs aux chimiokines a permis de réduire l'ampleur de ces deux processus. En outre, nous avons détecté une augmentation d'expression de CCL3 et CCL4 dans la substance noire de patients parkinsoniens. Au total, nos résultats montrent une modulation importante du réseau chimiokinique associée à la réaction gliale dans un contexte de lésion du système nigro-strié et suggèrent que le réseau chimiokinique joue vraisemblablement un rôle important dans le recrutement cérébral des lymphocytes T et la physiopathologie de la maladie de Parkinson.

L'espérance de vie ne cesse d'augmenter dans les pays industrialisés grâce aux progrès de la médecine et à l'amélioration de la qualité de vie. Cependant, le vieillissement s'accompagne d'une recrudescence de pathologies liées à l'âge, en particulier les maladies neurodégénératives. Ces pathologies constituent un problème majeur de santé publique et posent de réels problèmes humains et socio-économiques. Les maladies neurodégénératives se caractérisent par une évolution lente et progressive des symptômes souvent moteurs et/ou cognitifs dont souffrent les patients. L'évolution de ces pathologies conduit à une perte totale d'autonomie nécessitant une prise en charge lourde par les familles et le système de protection sociale.

La physiopathologie des maladies neurodégénératives est sous-tendue par un processus de mort parfois spécifique de certaines populations neuronales. Actuellement il n'existe pas d'alternative aux traitements symptomatiques qui de plus sont malheureusement inefficaces pour ralentir l'évolution de ces pathologies. En outre, leur efficacité diminue au cours du temps et des effets secondaires indésirables peuvent se surajouter. Comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de la dégénérescence permettrait ainsi de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques symptomatiques mais surtout curatives.

L'objet de ce travail de thèse est la maladie de parkinson qui constitue la deuxième maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer.

Cette affection neurologique se caractérise notamment par des troubles moteurs qui sont la conséquence directe d'une dégénérescence des neurones dopaminergiques dans le mésencéphale ventral, en particulier dans la substance noire. Les données de la littérature soulignent l'importance de dysfonctions mitochondriales, du stress oxydatif, de l'agrégation protéique et de déficits d'activité électrique dans la cascade d'évènements conduisant à la mort de ces neurones (Olanow, 2007 ; Michel et coll., 2007). Par ailleurs un nombre croissant d'études suggère que les cellules environnantes, en particulier les cellules gliales pourraient moduler la dégénérescence dopaminergique. En outre, des travaux récents ont mis en évidence une modification du compartiment immunitaire adaptatif dans la maladie de Parkinson (Hirsch et Hunot, 2009).

Bien que ces processus constituent probablement une conséquence de la mort neuronale, des études récentes suggèrent qu'ils pourraient jouer un rôle délétère vis-à-vis des neurones dopaminergiques, participant ainsi à la progression du processus neurodégénératif dans la MP (Brochard et coll., 2009).

Notre hypothèse de travail est qu'un processus actif de remodelage de la barrière hémato-encéphalique permettrait aux cellules du système immunitaire adaptatif de pénétrer le parenchyme cérébral. Ainsi les chimiokines et les molécules d'adhésion constituent deux grandes familles de protéines impliquées dans les phénomènes d'infiltration tissulaire des leucocytes en condition inflammatoire. A notre connaissance, aucune étude détaillée des mécanismes permettant l'infiltration cérébrale des lymphocytes dans les syndromes parkinsoniens n'a été réalisée.

I. La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) est une affection neurologique touchant 1% des individus de plus de 60 ans (de Lau et Breteler, 2006). Représentant 75% des syndromes parkinsoniens, elle doit être distinguée d'autres pathologies telles que l'atrophie multisystématisée ou la paralysie supranucléaire progressive (Dickson et coll., 2009). Le diagnostic différentiel reste clinique avec notamment le développement unilatéral d'une akinésie et d'une rigidité extrapyramidale. La présence d'un tremblement de repos et d'une bradykinésie est également fréquente mais moins spécifique (Litvan et coll., 2003 ; Rodriguez-Oroz et coll., 2009). Ces manifestations motrices sont provoquées par une perte d'afférences dopaminergiques striatales. Celle-ci résulte d'une dégénérescence neuronale dans le mésencéphale ventral, en particulier dans la substance noire *pars compacta (SNpc)* (Ehringer et Hornykiewicz, 1960). La recherche de symptômes non moteurs souvent précoces (déficit olfactif, constipation, troubles du sommeil, etc.) peut également orienter le diagnostic (Lang, 2011). Enfin, des analyses d'imagerie cérébrale telles que l'imagerie par résonnance magnétique (IRM), la sonographie transcraniale de la SN ou d'autres utilisant des radio-isotopes (Tomographie par Emission de Positons, Tomographie d'Emission Monophotonique) constituent un élément diagnostic supplémentaire (Berg et coll., 2008 ; Stoessl et coll., 2011 ; Mahlknecht et coll., 2010). Cependant des études clinico-pathologiques ont montré que le diagnostic clinique n'est confirmé à l'autopsie que dans 80% des cas (Litvan et coll., 2003). Un bilan neuropathologique reste par conséquent indispensable pour confirmer le diagnostic.

1. Description neuropathologique

La dégénérescence des neurones dopaminergiques (NDA) de la substance noire ainsi que la présence de corps de Lewy constituent les deux critères anatomo-pathologiques fondamentaux pour diagnostiquer la maladie de Parkinson. Toutefois d'autres stigmates neuropathologiques nigraux ou extra-nigraux sont également observés.

1.1. Lésions dopaminergiques

Konstantin Tretiakoff fut le premier à mettre en évidence une atteinte de la SNpc chez les sujets parkinsoniens (Tretiakoff C Thèse de Médecine 1919). Sa description d'une « dépigmentation » de cette zone du cerveau a permis d'identifier la perte massive des

neurones dopaminergiques contenant des pigments de neuromélanine et d'orienter les études physiopathologiques qui ont suivi. Plus tard, les travaux d'Hassler ont montré que la perte cellulaire dans la maladie de Parkinson est hétérogène au sein de la SNpc (Hassler, 1938). Depuis, l'hétérogénéité de la population dopaminergique a été étudiée par de nombreux groupes. L'utilisation de traceurs neuronaux chez les rats et les singes au cours des années 1970 et 1980 a notamment révélé que les neurones dopaminergiques de la SN ventrale projettent sur le striatum dorsal, en particulier au niveau des striosomes, alors que ceux de la SN dorsale et de l'aire tegmento-ventrale projettent sur le striatum ventral et la matrice du striatum dorsal (Herkenham et coll., 1984 ; Gerfen et coll., 1987). Le système mésostriatal a ainsi pu être organisé en deux territoires : la voie nigrostriatale (SNpc-striatum dorsal) très sensible à la dégénérescence et la voie mésolimbique (aire tegmentoventrale-striatum ventral) présentant une vulnérabilité plus faible (German et coll., 1989 ; Fearnley et Lees, 1991 ; Damier et coll., 1999). Hirsch et coll. en 1988 ont également montré que les neurones dopaminergiques contenant de la neuromélanine, neurones dits « mélanisés », étaient plus sensibles à la dégénérescence (Hirsch et coll., 1988).

Fait important, les études neuropathologiques montrent que les symptômes moteurs de la maladie n'apparaissent qu'après une réduction de près de 80% de la dopamine striatale et une perte massive des neurones dopaminergiques nigraux de l'ordre de 60% (Gaig et Tolosa, 2009) suggérant l'existence de mécanismes compensatoires très efficaces pendant la phase dite « présymptomatique ».

Au total, la perte des neurones dopaminergiques est une des caractéristiques majeures de la MP. Cette perte engendre une diminution considérable des taux de dopamine striatale à l'origine du dysfonctionnement des circuits neuronaux impliqués dans le contrôle des fonctions motrices. De fait, le traitement symptomatique le plus couramment utilisé repose sur l'administration de lévodopa, un précurseur de la dopamine (Schober A Cell Tiss Res 2004). Cependant ce traitement entraine à terme des effets secondaires particulièrement handicapants tels que les dyskinésies. Par ailleurs son efficacité fluctue au cours de la journée après plusieurs années d'utilisation. Enfin ce précurseur de la dopamine ainsi que les autres formes de traitement de la MP ne permettent pas de ralentir le processus dégénératif. Il est donc aujourd'hui essentiel de mieux comprendre les mécanismes conduisant à la mort de ces neurones pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces.

1.2. Lésions non dopaminergiques

Depuis de nombreuses années, il est reconnu que les patients parkinsoniens présentent une large gamme de symptômes non moteurs. Bien que certaines de ces manifestations soient liées aux lésions dopaminergiques, notamment les troubles du sommeil, la majorité d'entre elles ne répondent pas à la dopathérapie, suggérant l'existence de lésions non dopaminergiques (Lima et coll., 2009). Par ailleurs certains signes non moteurs apparaissent très précocement, avant même les symptômes moteurs lors d'une phase dite « prémotrice ».

De fait, certaines régions extra-dopaminergiques présentent une forte dégénérescence neuronale. Ainsi des modifications du sommeil profond et une dépression sont associées à une dégénérescence des neurones noradrénergiques du *locus cœruleus* et des neurones sérotoninergiques du noyau du raphé. La démence, symptôme non moteur d'apparition tardive, pourrait être liée à la dégénérescence cholinergique dans le noyau basal de Meynert (Dickson et coll., 2009). Enfin, plus récemment une dégénérescence cholinergique du noyau pédonculopontin a été associée aux troubles de la marche et de l'équilibre qui se manifestent chez la plupart des patients parkinsoniens à des stades tardifs d'évolution de la maladie (Karachi et coll., 2010).

Les symptômes non moteurs de la MP sont aujourd'hui de plus en plus étudiés. En effet, il existe un arsenal thérapeutique moins développé que pour le déficit dopaminergique. De plus ils pourraient permettre une détection plus précoce de la pathologie.

1.3. Corps de Lewy

La présence d'inclusions cytoplasmiques identifiées par Friedriech Lewy et appelés corps de Lewy, représente le deuxième stigmate anatomo-pathologique majeur de la MP. Ces inclusions sont des agrégats de protéines dans lesquels on retrouve en abondance de l'α-synucléine (Olanow et McNaught, 2011) (Figure 1).

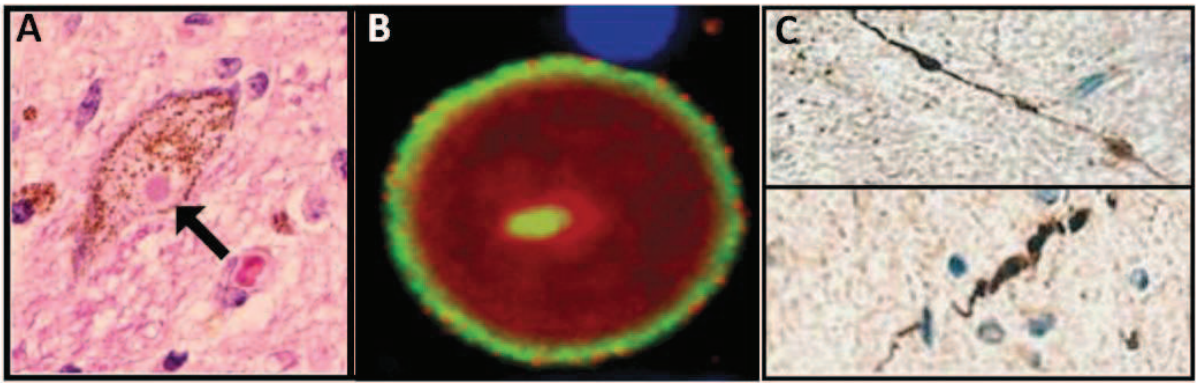


Figure 1 : A : Représentation d'un corps de Lewy au sein d'un neurone dopaminergique mélanisé de la SNpc et marqué par la coloration Hématoxyline et Eosine. B : Image confocale d'un corps de Lewy marqué pour l'ubiquitine (rouge) et l'α-synucléine (jaune). C : Des neurites de Lewy intra-neuronales marquées par l'ubiquitine sont également observées dans le cerveau des patients. Adapté d'Olanow et McNaught, 2011.

De façon tout à fait intéressante Braak et coll. ont montré que la distribution et l'apparition chronologique des inclusions synucléine positives dans le tissu cérébral au cours de la MP avaient un caractère stéréotypé (Figure 2) (Braak et coll., 2003). Sur la base de ces données neuropathologiques Braak et coll. ont proposé une hypothèse selon laquelle un agent infectieux pourrait être à l'origine de cette synucléinopathie progressive.

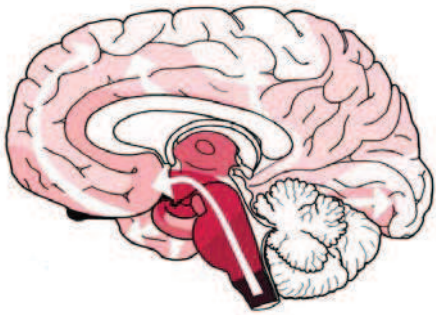


Figure 2 : Représentation schématique de la propagation de la synucléinopathie au cours de la maladie de Parkinson. Les premières régions affectées sont le noyau dorsal du nerf vague et le noyau olfactif antérieur. La pathologie se propage par le tronc cérébral de manière dorsale (flèches blanches) puis le cortex est touché. Adapté de Braak et coll., 2003.

De nombreuses études suggèrent que la pathologie α-synucléine se propagerait selon un mécanisme de type prion. Des données récentes ont montré que des greffons de neurones dopaminergiques fœtaux implantés chez les patients parkinsoniens présentaient des corps de Lewy plus de 10 ans après implantation (Kordower et coll., 2008a ; Kordower et coll., 2008b ; Li et coll., 2008 ; Li et coll., 2010). Ces résultats ont pu être reproduits en culture et chez la souris (Danzer et coll., 2007 ; Danzer et coll., 2009 ; Luk et coll., 2009 ; Nonaka et coll., 2010 ; Waxman et Giasson, 2010 ; Hansen et coll., 2011).

De manière intéressante l'apparition des symptômes semble suivre l'évolution de la pathologie α-synucléine (Table 1).

Table 1		
Relation entre la pathologie α-synucléine et les symptômes dans la maladie de Parkinson. Adapté de Dickson et coll., 2009		
Région anatomique	**Stage de Braak**	**Symptôme**
Système nerveux autonome		Autonome (hypotension orthostatique, impotence, mixion fréquente, constipation)
Bulbe olfactif Noyau olfactif antérieur	1	Hyposmie
Medulla Noyau dorsal du nerf vague	1	Autonome (parasympathique)
Pont Locues Cœruleus, noyau du raphe	2	Dépression et troubles du sommeil profond
Mésencéphale Substance noire	3	Troubles moteurs
Cerveau antéro-basal Noyau basal de Meynert Amygdale et hippocampe	4	Démence
Néocortex Cortex frontal Cortex pariétal	 5 6	Démence

Au total, la perte des neurones dopaminergiques dans la SNpc et la présence de corps de Lewy positifs pour la synucléine dans ces neurones représentent les deux stigmates neuropathologiques essentiels de la MP. Outre ces atteintes neuronales, des études anatomo-pathologiques ont également mis en évidence, dans le cerveau des patients parkinsoniens, l'existence de processus inflammatoires associés à ces lésions.

1.4. Gliose réactionnelle et infiltration lymphocytaire

Les données neuropathologiques ont révélé une modification du phénotype des cellules gliales dans le cerveau des patients ainsi qu'une infiltration cérébrale de cellules immunitaires périphériques.

En condition inflammatoire, la réaction microgliale peut être visualisée en marquant des protéines appartenant par exemple au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). En 1988 McGeer et coll. ont observé la présence de microglies positives pour HLA-DR (*human leucocyte antigene-DR*), un marqueur du CMH de classe II, dans la substance noire de

patients parkinsoniens (McGeer et coll., 1988). Cette première observation fut par la suite confirmée en utilisant d'autres marqueurs microgliaux en particulier CR3/43 et EBM11 (Banati et coll., 1998 ; Imamura et coll., 2003). Une réaction microgliale modérée a également été détectée dans d'autres régions cérébrales telles que *locus cœruleus*, l'hippocampe ou le cortex (Bertrand et coll., 1997 ; Imamura et coll., 2003).

La réaction astrocytaire, quant à elle, est plus controversée. Alors que Damier et coll. ont montré une augmentation de 30% de la densité des astrocytes dans la substance noire en utilisant la *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) comme marqueur (Damier et coll., 1993), Mirza et coll. n'ont pas retrouvé cette augmentation en utilisant la GFAP et d'autres marqueurs tels que les métallothionéines I et II, deux protéines antioxydantes majoritairement exprimées par les astrocytes (Mirza et coll., 2000). Toutefois, Mythri et coll. ont détecté une réaction astrocytaire dans le noyau caudé, le putamen et le cortex frontal des patients parkinsoniens par des études immunohistochimiques de la GFAP (Mythri et coll., 2011). Plus récemment, au travers d'études transcriptomiques associées à des observations immunohistochimiques, l'expression des métallothionéines I et II a été rapportée dans les astrocytes de la SN chez les patients parkinsoniens (Michael et coll., 2011).

Au total, les modifications du compartiment astrocytaire dans la MP restent donc débattues. En outre, le fait que la GFAP ne marquerait qu'une sous population astrocytaire soutient l'idée qu'il est nécessaire d'utiliser d'autres marqueurs permettant d'identifier et réévaluer le rôle de l'astrogliose dans les pathologies neurodégénératives.

La présence de cellules immunitaires périphériques dans le cerveau des patients parkinsoniens a également été explorée. Une première étude de McGeer en 1988 faisait état de nombreux lymphocytes T cytotoxiques ($CD8^+$) présents dans la substance noire d'un patient parkinsonien (McGeer et coll., 1988). Plus récemment, une étude immunohistochimique conduite au laboratoire a mis en évidence une augmentation de la densité de lymphocytes T $CD8^+$ et $CD4^+$ dans la SN de patients par rapport à des individus contrôles (Brochard et coll., 2009). La présence dans la SNpc de cellules positives pour le récepteur des immunoglobulines FcγRIII et présentant une morphologie lymphocytaire a également été rapportée chez les sujets parkinsoniens (Orr et coll., 2005).

A ce jour de nombreuses données concernant l'anatomo-pathologie de la maladie de Parkinson sont disponibles. Elles mettent en évidence la dégénérescence de plusieurs populations neuronales impliquées dans les symptômes moteurs et non moteurs de la MP. La présence d'une réaction gliale et de cellules du système immunitaire périphérique est également observée. Toutefois cette dernière caractéristique n'est pas spécifique de la MP et est également observée dans d'autres pathologies neurodégénératives majeures telles que la maladie d'Alzheimer ou la sclérose latérale amyotrophique.

2. Etiologie de la maladie de Parkinson

2.1. Rôle du vieillissement

La maladie de Parkinson est sans aucun doute liée au vieillissement. En effet elle est rare avant 50 ans et sa prévalence augmente avec l'âge (Li et coll., 1985 ; Morgante et coll., 1992 ; de Rijk et coll., 1995 ; Mayeux et coll., 1995 ; Errea et coll., 1999 ; Claveria et coll., 2002).

La grande majorité des données concernant de rôle du vieillissement dans la maladie de Parkinson proviennent d'études réalisées chez l'homme. Les personnes présentant un début tardif de MP ont une progression motrice plus rapide et une réponse à la lévodopa diminuée. Les troubles de la marche, la démence et les troubles cognitifs sont également plus sévères suggérant que l'état physiologique de la personne âgée favorise le développement des troubles parkinsoniens (Levy, 2007).

Il est particulièrement intéressant de noter qu'une perte neuronale de près de 40% est observée dans la SN au cours du vieillissement normal (Hirai, 1968 ; McGeer et coll., 1977). Toutefois Fearnley et coll. ont montré que le patron de dégénérescence des neurones dopaminergiques dans cette région au cours du vieillissement normal diffère de celui observé chez les patients parkinsoniens (Fearnley et Lees, 1991). Aussi, ces données suggèrent qu'il est peu probable que la MP résulte d'une simple accélération du processus de vieillissement cérébral. Cependant, il reste troublant de constater que certaines personnes âgées présentent souvent des signes bénins de parkinsonisme (Buchman et coll., 2012). En effet, près d'un tiers d'entre eux semblent présenter une dégénérescence dans la SN, et 17% des corps de Lewy (Buchman et coll., 2012). Par ailleurs, Buchman et coll. ont montré que les taux de dégénérescence dopaminergique et de corps de Lewy étaient

corrélés à l'intensité des symptômes. Enfin le patron de mort des NDA correspondait à celui observé chez les patients parkinsoniens (Buchman et coll., 2012). Ainsi, cette étude récente réalimente le débat sur l'idée qu'une accélération du vieillissement puisse participer directement au développement de la MP. On considère toutefois que le vieillissement, caractérisé par des dysfonctions physiologiques, représente vraisemblablement un facteur de risque augmentant la vulnérabilité des neurones dopaminergiques à des agents environnementaux et/ou à des facteurs génétiques hérités par l'individu. Malgré l'importance évidente du rôle du vieillissement dans le développement de la MP, trop peu d'études ont tenté de comprendre comment ce facteur influence la maladie (Obeso et coll., 2010).

2.2. Facteurs génétiques

En 1997, la découverte par Polymeropoulos et coll. de formes monogéniques de la maladie de Parkinson causées par des mutations dans le gène de l'α-synucléine et la démonstration que cette protéine constitue un composant majeur des corps de Lewy a nourrit le champ des études génétiques de la MP (Polymeropoulos et coll., 1997 ; Spillantini et coll., 1997). Depuis, au moins 16 *loci* et 11 gènes ont été associés à des formes héréditaires de la pathologie (Corti et coll., 2011).

A l'heure actuelle, deux gènes ont été impliqués dans des formes autosomiques dominantes, l'α-synucléine et LRRK2 (Leucine-rich repeat kinase). Leurs mutations agissent en général *via* un mécanisme de gain de fonction. Concernant le gène de l'α-synucléine, on peut observer dans certaines familles des duplications ou triplications de ce locus. Ces multiplications ont été mises en évidence dans 15 familles à travers le monde et représentent 2% des formes génétiques de maladie de Parkinson (Ahn et coll., 2008 ; Chartier-Harlin et coll., 2004). Les mutations ponctuelles, quant à elles, restent rares. Ainsi, la mutation A53T, la plus commune, n'a été observée que chez 15 familles grecques ou italiennes ayant probablement un ancêtre commun (Golbe et coll., 1990 ; Polymeropoulos et coll., 1997 ; Papadimitriou et coll., 1999 ; Spira et coll., 2001).

S'agissant de *LRRK2*, plusieurs mutations non sens ont été identifiées (Paisan-Ruiz et coll., 2004 ; Zimprich et coll., 2004). La découverte de mutations sur le gène *LRRK2* est particulièrement intéressante car elles sont fréquentes (10% des patients présentant des formes autosomiques dominantes) et sont de plus observées chez des individus présentant

des formes familiales à début tardif typiques et mêmes sporadiques (Berg et coll., 2005 ; Di Fonzo et coll., 2006 ; Johnson et coll., 2007).

Des formes autosomiques récessives ont également été décrites. Les allèles récessifs conduisent à l'absence de la protéine ou son inactivation et donc en une perte de fonction. Les mutations dans les gènes *parkin*, *PINK1* et *DJ-1* sont ainsi associées à des formes héréditaires à début précoce (Corti et coll., 2011). Les mutations du gène *parkin* sont les plus fréquentes, on les retrouve dans 50% des formes familiales récessives de MP (Lucking et coll., 2000). Les porteurs de mutations *parkin* présentent un phénotype clinique globalement similaire à celui des formes sporadiques (Ishikawa et Tsuji, 1996 ; Lohmann et coll., 2003 ; Lohmann et coll., 2009). Les mutations du gène *PINK1* représentent, quant à elles, la seconde cause des formes familiales récessives avec un taux de 0 à 15 % de part le monde (Deas et coll., 2009 ; Nuytemans et coll., 2010). Les phénotypes cliniques associés aux mutations de *PINK*1 sont assez classiques avec cependant une meilleure réponse à la lévodopa et une maladie globalement d'évolution plus lente (Ibanez et coll., 2006). Les mutations dans le gène *DJ-1* sont en revanche moins communes et associées à un tableau clinique proche de celui des formes *PINK1*.

Outre les formes monogéniques héritées de MP, l'importance des facteurs génétiques dans les formes les plus courantes de MP (formes sporadiques, représentant 90% des cas) peut également être illustrée par les récentes découvertes obtenues à travers des études d'association pangénomique (*genome wide association study* ou GWAS). En effet, ces études ont permis d'identifier des facteurs de risque de la maladie. Entre autres, les gènes codant pour l'α-synucléine et LRRK2 ont notamment été mis en évidence. Il est intéressant de noter que la région HLA a également été rapportée comme facteur de risque de la maladie (Hamza et coll., 2010 ; International Parkinson Disease Genomics et coll., 2011). Cette observation est particulièrement intéressante au regard des fonctions de ce gène dans le système immunitaire et les processus neuroinflammatoires qui seront développés dans les chapitres suivants (Taneja et David, 1998).

En conclusion, l'étude des formes génétiques de MP a ouvert de nouvelles voies de recherche qui devraient permettre de mieux comprendre cette pathologie complexe. Elles ont en outre permis de proposer de nouvelles hypothèses physiopathologiques et de développer de nouveaux modèles d'investigation préclinique. De plus l'identification de facteurs de risque de la maladie de Parkinson suggère une combinaison de sensibilités

génétiques et d'autres facteurs étiologiques tels que les facteurs environnementaux que nous allons aborder dans le paragraphe suivant.

2.3. Facteurs environnementaux

En 1983 plusieurs personnes ont développé des signes typiques de MP après injection intraveineuse de drogue contaminée par la 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP). La mise en évidence d'une dégénérescence sélective des NDA induite par le MPTP a conduit de nombreux chercheurs à proposer que des toxines environnementales pourraient augmenter le risque de développer la MP (Langston et coll., 1983). Ainsi plusieurs études épidémiologiques ont porté sur l'association possible entre pesticides, herbicides et maladie de Parkinson. La majorité de ces études ont montré une association positive entre MP et exposition aux pesticides, la moitié d'entre elles se révélant significatives. Parmi ces phytosanitaires, la roténone et le paraquat ont été particulièrement étudiés chez l'homme et l'animal (Brooks et coll., 1999 ; Betarbet et coll., 2000 ; Cicchetti et coll., 2009 ; Greenamyre et coll., 2010). Malgré de nombreuses études sur le paraquat dans l'étiologie de la MP son rôle reste encore fortement débattu (Berry et coll., 2010). Les données épidémiologiques sur la roténone montrent en revanche une association plus claire avec la MP. Ceci est conforté par des études chez l'animal montrant qu'une intoxication par la roténone permet de récapituler plusieurs caractéristiques observées chez les patients parkinsoniens (Greenamyre et coll., 2010).

D'autres études épidémiologiques portant sur le mode de vie, notamment le fait de vivre en milieu rural, ont également été réalisées. Les résultats suggèrent une augmentation du risque de développer la MP dans les milieux ruraux mais ces données restent toutefois controversées (Lai et coll., 2002).

Les facteurs diminuant le risque de développer la MP apportent également des informations importantes concernant l'étiologie. Ainsi les données épidémiologiques montrent que le tabagisme et la consommation de caféine constituent des facteurs protecteurs (Ascherio et Chen, 2003 ; Thacker et coll., 2007).

Les études chez l'homme mettent donc en évidence un rôle de l'environnement et du mode de vie sur les risques de développer une MP.

2.4. Autres causes

Outre les facteurs génétiques et environnementaux, d'autres causes ont été évoquées, en particulier le rôle d'agents infectieux et de mécanismes auto-immuns (Boîte 2).

Boîte 2

Origine infectieuse

L'hypothèse infectieuse fut notamment énoncée suite à l'augmentation des cas de parkinsonisme chez des personnes atteintes d'encéphalopathie de von Economo entre 1916 et 1927. En effet, l'apparition quasi-simultanée d'une pandémie d'influenza a amené certains auteurs à relier les deux phénomènes (Casals et coll., 1998). Plusieurs équipes ont montré que certaines souches d'influenza A sont neurotropiques et peuvent se retrouver dans le SNC après infection systémique (Takahashi et coll., 1995 ; Tanaka et coll., 2003 ; Klopfleisch et coll., 2006 ; Rigoni et coll., 2007). De la même manière, Jang et coll. ont mis en évidence une altération des neurones dopaminergiques transitoire avec persistance d'une microgliose jusqu'à 90 jours après infection intranasale de souris par une souche de H5N1 (Jang et coll., 2012 ; Jang et coll., 2009). Ces données supportent en partie l'hypothèse initialement formulée par Braak et coll. d'un lien possible entre un épisode infectieux et la synucléinopathie caractéristique de la MP. En effet, les systèmes entérique et olfactif étant particulièrement exposés à l'environnement, il est intéressant de noter que les premières anomalies morphologiques associées à la MP, notamment la présence de corps et neurites de Lewy, sont observées dans ces ceux sites anatomiques (Braak et coll., 2003). En outre, des neurites de Lewy et une perte neuronale ont récemment été mis en évidence au niveau du système nerveux entérique du colon de patients parkinsoniens (Lebouvier et coll., 2010). Ces données suggèrent qu'une infection débutant au niveau entérique ou olfactif pourrait propager la maladie jusqu'au cerveau. De plus, une étude récente indique la présence de virus de l'influenza A dans les macrophages de SN de patients, supportant l'hypothèse d'une action cérébrale de ce virus, cependant ces données demandent à être confirmées (Rohn et Catlin, 2011).

Origine auto-immune

Autre hypothèse souvent évoquées mais pas encore totalement démontrée, celle des mécanismes auto-immuns. L'auto-immunité a lieu lorsque les mécanismes de tolérance immunitaire sont déficients et que des auto-antigènes sont reconnus par des auto-anticorps ou des cellules. Ainsi la mise en évidence d'une maladie d'étiologie auto-immune nécessite la démonstration d'un ou plusieurs auto-antigènes et de leurs auto-anticorps associés ou de cellules auto-réactives spécifiques. De plus, ces réponses immunitaires doivent être responsables de la maladie. Un argument fort en faveur de l'auto-immunité s'obtient en transférant la maladie à un modèle expérimental. Par exemple en injectant des auto-anticorps ou des cellules auto-réactives qui vont ensuite conduire au développement de la pathologie. Ainsi, une étude a montré que des auto-anticorps réagissant par immunohistochimie avec les neurones dopaminergiques de la SN étaient présents dans le LCR chez 78% des patients et 3% des contrôles, suggérant la présence d'une population de cellules B productrice d'anticorps dirigés contre ces neurones dans la MP (Carvey et coll., 1991). A l'appui de ces données, Orr et coll. ont également rapporté la présence d'anticorps sur les neurones dopaminergiques de la SN et une forte immunoréactivité contre les IgG sur les corps de Lewy (Orr et coll., 2005). La présence d'anticorps anti-α-synucléine a par ailleurs été détectée dans les formes familiales de MP (Papachroni et coll., 2007). Le rôle de ces immunoglobulines a par ailleurs été étudié en culture et chez l'animal. Ainsi Chen et coll. ont purifié des immunoglobulines de patients puis les ont injectées dans la SN de rats, entraînant une dégénérescence dopaminergique (Chen et coll., 1998). De plus Le et coll. ont montré que le LCR de patients parkinsoniens jouait un rôle cytotoxique sur des lignées cellulaires dopaminergiques sans cependant préciser le facteur impliqué (Le et coll., 1999). En résumé, plusieurs auteurs ont détecté la présence d'auto-anticorps chez les patients et ces immunoglobulines semblent jouer un rôle toxique sur les neurones dopaminergiques. Cependant un nombre plus important d'études semble nécessaire pour confirmer ces données.

En résumé, les données concernant l'étiologie de la MP sont nombreuses. Une cause unique n'a pu être mise en évidence que dans les cas ayant une origine génétique clairement identifiée. Mis à part ces formes de MP, une combinaison de susceptibilités

génétiques et de facteurs environnementaux sont probablement à l'origine de la majorité des cas. D'autre part, il semble aujourd'hui de plus en plus évident qu'il existe plusieurs sous-types de maladies de Parkinson (Selikhova et coll., 2009). Le poids de chaque facteur étiologique et les mécanismes sous-tendant la pathologie pourraient donc être différents d'un patient à un autre, demandant ainsi un traitement spécifique (Obeso et coll., 2010). Cette médecine dite « personnalisée » est le grand défit de demain (Livre Blanc Parkinson).

II. Hypothèses concernant les mécanismes de mort des neurones dopaminergiques

Les données obtenues dans la pathologie réelle sont essentielles. S'agissant des analyses *post-mortem* sur le tissu cérébral, elles reflètent cependant un stade tardif de la maladie. Les études réalisées sur des échantillons biologiques périphériques (par exemple les analyses sanguines) peuvent permettre, quant à elles, d'obtenir des données à des stades plus précoces d'évolution mais ne reflètent pas nécessairement les mécanismes physiopathologiques centraux. La compréhension des mécanismes pathologiques repose donc sur l'utilisation de modèles de la maladie. Ces modèles peuvent alors être utilisés pour tester de nouvelles stratégies thérapeutiques avant leur application chez l'homme.

1. Modèles animaux de la maladie de Parkinson

Un bon modèle de maladie constitue un outil précieux dans la compréhension de la pathophysiologie et le développement de nouvelles thérapies. Quatre-vingt dix pourcent des cas de maladie de parkinson étant d'étiologie inconnue sa modélisation reste difficile. De fait, beaucoup de modèles ont été développés afin de récapituler les caractéristiques neuropathologiques et biochimiques de la maladie, cependant aucun ne reproduit l'ensemble de ces aspects. Certains, comme les modèles génétiques, permettent d'étudier plus en détails la synucléinopathie ou les dysfonctions mitochondriales. D'autres, comme les modèles toxiques, apportent plus d'information sur la neurodégénérescence et les mécanismes inflammatoires ainsi que les altérations mitochondriales. Par conséquent pour chaque question posée le modèle le plus approprié doit être choisi (Figure 3).

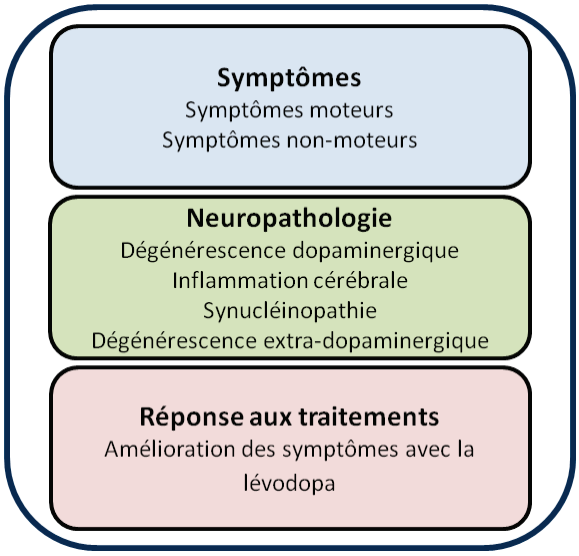


Figure 3 : Critères de choix d'un modèle de maladie de Parkinson. En fonction de la question posée le modèle choisi reproduit différentes caractéristiques de la maladie de Parkinson, tant sur le plan de la symptomatologie que de la neuropathologie ou de la réponse au traitement.

1.1. Modèles toxiques

Plusieurs modèles toxiques ont été développés. Chez l'animal, l'administration du toxique peut être soit systémique, comme pour le MPTP ou la roténone, soit intracérébrale comme pour la 6-hydroxydopamine (6-OHDA).

1.1.1 Modèle d'intoxication par le MPTP

Comme indiqué précédemment, la mise en évidence de syndromes parkinsoniens provoqués par le MPTP a conduit à l'utilisation de cette neurotoxine chez l'animal pour modéliser la pathologie humaine (Jackson-Lewis et coll., 2012 ; Braungart et coll., 2004). L'utilisation du MPTP permet notamment de reproduire la dégénérescence dopaminergique, la réaction gliale et l'entrée cérébrale de cellules immunitaires périphériques. Ce modèle peut donc nous apporter des informations essentielles sur les mécanismes sous-tendant la pathologie.

a) Mécanisme d'action du MPTP

Son mécanisme d'action a été en partie décrit : après administration systémique, le MPTP, très lipophile, passe la barrière hémato-encéphalique en quelques minutes. Dans le cerveau, le MPTP est oxydé en 1-méthyl-4-phényl-2,3-dihydropyridinium (MPDP+) par la monoamine oxydase B (MAO-B) présente dans les astrocytes et les neurones sérotoninergiques (Markey et coll., 1984).

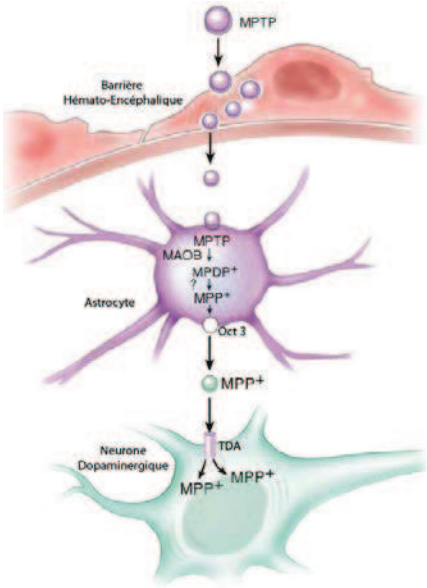


Figure 4. Représentation schématique du métabolisme du MPTP. Adapté de Dauer et Przedborski, 2003.

Le MPDP+ est alors converti en MPP+ (1-méthyl-4-phénylpiridinium), métabolite toxique du MPTP, et redistribué dans le milieu extracellulaire via le transporteur OCT-3 (Cui et coll., 2009). Le MPP+ étant une molécule polaire, un transporteur membranaire est nécessaire pour le faire entrer dans les cellules. Du fait de la très forte affinité du MPP+ pour le transporteur de la dopamine (TDA) celui-ci s'accumule essentiellement dans les neurones dopaminergiques (Javitch et coll., 1985 ; Gainetdinov et coll., 1997) (Figure 4).

Au sein des neurones, le MPP+ peut : *i)* se lier au transporteur vésiculaire des monoamines 2 (VMAT-2) et être ainsi concentré dans les vésicules synaptiques (Takahashi et coll., 1997), *ii)* intéragir avec les enzymes cytosoliques telle que l'aldéhyde déhydrogénase (Klaidman et coll., 1993), *iii)* se concentrer dans la mitochondrie (Ramsay et Singer, 1986) où il bloque l'activité du complexe I de la chaîne de transport des électrons (Nicklas et coll., 1985). Ceci a pour conséquence : *i)* une diminution des taux d'adénosine triphosphate (ATP) (Fabre et coll., 1999) et *ii)* une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Hasegawa et coll., 1997) (Figure 5). Ces deux phénomènes pourraient ainsi contribuer au dysfonctionnement de voies moléculaires et conduire à la mort des neurones dopaminergiques.

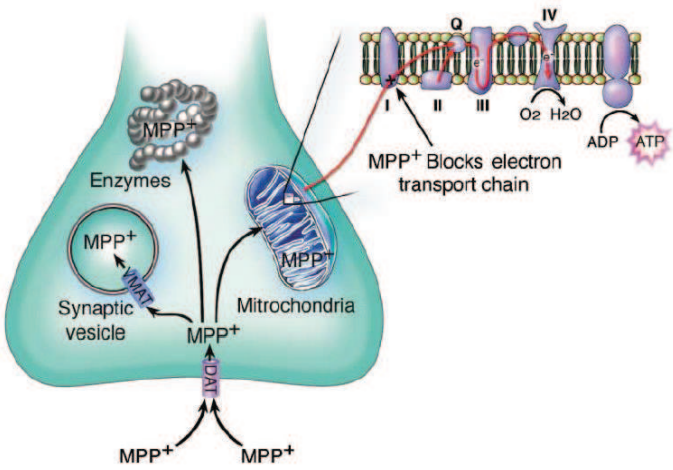


Figure 5. Représentation schématique des voies d'action intracellulaire du MPP+. Adapté de Dauer et Przedborski, 2003.

b) Modèles animaux

Le MPTP a été essentiellement utilisé pour développer des modèles de MP chez le primate non humain (PNH) et la souris.

Un intérêt majeur des modèles de PNH est la modélisation des déficits moteurs observés chez les patients. Ainsi l'akinésie, la bradykinésie, et les anomalies posturales sont couramment présentes bien que le tremblement de repos soit rarement observé (Hantraye et coll., 1993). Plusieurs voies d'administration ont été testées, depuis l'injection intra-carotidienne produisant une lésion unilatérale en passant par de faibles doses multiples pour reproduire la dégénérescence progressive ou encore l'utilisation de très faibles doses de MPTP afin de produire des modèles présymptomatiques de la maladie (Guttman et coll., 1990 ; Bezard et coll., 1997 ; Blanchet et coll., 1998). Le patron de mort neuronale dopaminergique ressemble à celui observé dans la MP : sensibilité supérieure de la SN par rapport à l'ATV et perte préférentielle dans les zones ventrales et latérales de la SNpc (Sirinathsinghji et coll., 1992 ; Varastet et coll., 1994). De plus des zones extra-dopaminergiques telles que le *locus cœruleus* sont également touchées par le processus neurodégénératif (Forno et coll., 1986 ; Miyoshi et coll., 1988). Toutefois, l'un des défauts de ces modèles reste la dégénérescence dopaminergique rapide et massive, reproduisant des stades plutôt tardifs de MP. Par ailleurs, la formation de corps de Lewy n'est pas observée dans ce modèle (Halliday et coll., 2009). L'intérêt de ce modèle repose également sur l'excellente réponse des symptômes moteurs aux médications dopaminergiques utilisées chez les patients. D'où son intérêt pour la recherche de nouveaux traitements symptomatiques (Jenner, 2009). Il a également permis la mise en évidence d'une suractivation du noyau sous-thalamique conduisant au développement de la stimulation cérébrale profonde (Bergman et coll., 1990), une approche thérapeutique permettant d'améliorer les fonctions motrices des patients lorsque les symptômes moteurs ne peuvent plus être corrigés par les traitements symptomatiques classiques (Limousin et coll., 1998).

Bien que le modèle PNH soit essentiel dans le développement de stratégies thérapeutiques, la dissection des mécanismes fins de la mort dopaminergique est réalisée chez la souris pour des raisons éthiques et pratiques. La souris est préférée au rat qui est quasiment insensible au MPTP lorsque celui-ci est administré par voie systémique (Chiueh et coll., 1984). Elément important, la sensibilité au MPTP varie en fonction du fond génétique. Ainsi les souris C57BL/6 sont plus sensibles que les souris BALB/c aux injections systémiques

de MPTP (Hoskins et Davis, 1989). Bien que différentes voies d'administration du MPTP existent, la plus commune, fiable et reproductible reste l'injection systémique par voie sous-cutanée ou intrapéritonéale. Néanmoins la souris ne développe pas de parkinsonisme classique. Le premier phénotype examiné est par conséquent la lésion de la voie nigrostriée associée à une gliose réactionnelle dépendants de la dose et du délai entre les injections (Sonsalla et Heikkila, 1986 ; Kohutnicka et coll., 1998). Si les inclusions protéiques intraneuronales ne sont en général pas observées dans ce modèle, certains auteurs ont rapporté leur présence notamment lorsque le MPTP est administré à l'aide de pompes osmotiques (Fornai et coll., 2005) ou lorsqu'il est utilisé en combinaison avec le probénécide, un agent uricosurique diminuant l'excrétion de certains médicaments (Meredith et coll., 2002). Toutefois ces résultats restent à l'heure actuelle controversés (Alvarez-Fischer et coll., 2008).

Plusieurs régimes d'intoxication sont couramment utilisés. Ainsi, le mode dit aigu est l'un des plus employé. Il permet de produire une chute des taux de dopamine striatale de 40% et plus ainsi qu'une perte neuronale d'au moins 30% (Jackson-Lewis et coll., 1995). Un autre modèle, développé entre autre par Tatton et Kish, consiste en une injection journalière pendant cinq jours. Ce régime dit « subchronique » produit une perte de dopamine striatale d'au moins 40% chez la souris C57BL/6 jeune, une mort dopaminergique par apoptose et une lésion stable 21 jours après administration du MPTP (Tatton et Kish, 1997). Du point de vue micro-anatomique la vulnérabilité différentielle entre ATV et SN est également observée chez la souris (German et coll., 1996). De plus, des atteintes du *locus cœruleus* chez la souris intoxiquée au MPTP ont été rapportées. Cependant, l'atteinte de structures extra-dopaminergiques dépend du mode d'intoxication et de l'âge des animaux (Gupta et coll., 1986 ; Seniuk et coll., 1990).

En résumé, les modèles d'intoxication par le MPTP permettent l'étude des mécanismes conduisant à la dégénérescence dopaminergique et au développement d'une réaction neuroinflammatoire.

1.1.2 Autres modèles toxiques

En dehors du modèle MPTP, d'autres modèles toxiques utilisant notamment la 6-OHDA et la roténone ont été développés et sont exposés dans la boîte 3.

Boîte 3

Autres modèles toxiques de maladie de Parkinson

6-OHDA

La 6-hydroxydopamine (6-OHDA) fut le premier modèle animal de MP associé avec une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNpc (Ungerstedt, 1968). La structure de la 6-OHDA est très similaire à celle de la dopamine. Cependant, la présence d'un groupe hydroxyle rend cette molécule toxique pour les neurones dopaminergiques (Blum et coll., 2001). La 6-OHDA serait capable d'entrer dans les neurones catécholaminergiques via le transporteur de la dopamine et de la noradrénaline bien que ce mécanisme reste débattu (Blum et coll., 2001). Au sein des neurones, la 6-OHDA s'accumule dans le cytosol, elle serait alors auto-oxydée et produirait un stress oxydant à l'origine de la dégénérescence dopaminergique (Sachs et Jonsson, 1975). La 6-OHDA ne passe pas la barrière hémato-encéphalique et doit donc être injectée dans le cerveau par stéréotaxie. Les modèles les plus communs consistent à l'injecter de manière unilatérale dans le faisceau médian du télencéphale, la substance noire ou le striatum de rat (Javoy et coll., 1976 ; Jonsson, 1983). Les deux premières voies d'injection entraînent une mort rapide des NDA en 24h alors que l'injection striatale produit une dégénérescence plus progressive en une à trois semaines (Sauer et Oertel, 1994 ; Przedborski et coll., 1995). Un avantage majeur de ce modèle est la possibilité d'utiliser chaque animal comme son propre contrôle du côté non lésé. Ces injections unilatérales entraînent un comportement moteur circulaire asymétrique et quantifiable après administration de drogues dopaminergiques en raison du déséquilibre entre le striatum lésé et le striatum intact (Hefti et coll., 1980). Ce modèle est donc particulièrement utile pour développer des drogues ciblant le système dopaminergique (Jiang et coll., 1993). Cependant les inclusions cytoplasmiques et les lésions extra-dopaminergiques observées dans la MP ne le sont pas dans ce modèle.

Roténone

La roténone est un composé naturel, inhibiteur sélectif du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (Ravanel et coll., 1984). Etant très lipophile la roténone passe aisément la barrière hémato-encéphalique (Talpade et coll., 2000). Contrairement au MPTP qui induit une inhibition du complexe I spécifiquement dans les neurones catécholaminergiques, la roténone l'inhibe de manière systémique. De manière intéressante, cette inhibition généralisée a également été observée chez les patients (Parker et coll., 1989; Schapira et coll., 1989). Betarbet et coll. ont montré que l'administration intraveineuse de faibles doses de roténone chez le rat produit une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SN associée à des inclusions de type corps de Lewy (Betarbet et coll., 2000). De plus ces animaux développent une rigidité et une hypokinésie. Etant donné que la roténone peut librement entrer dans les cellules, ces données suggèrent que les NDA sont plus sensibles à l'inhibition du complexe I. Néanmoins, des études sur des rats infusés de façon chronique avec la roténone montrent que les neurones cholinergiques du striatum dégénèrent également dans ce modèle (Hoglinger et coll., 2003). De nouvelles études confortent l'intérêt du modèle de dégénérescence induit par l'injection de roténone. En effet, les animaux présentent plusieurs critères pathologiques de la MP : une activation microgliale, la translocation de DJ-1 à la mitochondrie, une altération du système ubiquitine-protéasome, une pathologie α-synucléine au niveau du système entérique et des dysfonctions intestinales (Betarbet et coll., 2002 ; Drolet et coll., 2004 ; Cannon et coll., 2009 ; Greene et coll., 2009).

Il est intéressant de noter que toutes les toxines utilisées chez l'animal pour modéliser la MP ont une action sur la mitochondrie en inhibant les complexes I ou III de la chaîne respiratoire (Schober, 2004) et qu'une inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire est également observé dans le cerveau des sujets parkinsoniens. Ces données suggèrent que des processus similaires pourraient être impliqués dans ces deux conditions.

Un avantage majeur du MPTP est son utilisation chez la souris, il est donc aisé d'étudier des combinaisons d'altérations génétique et toxique chez des animaux génétiquement modifiés.

Plus récemment de nombreux auteurs ont développé de nouveaux modèles en reproduisant chez l'animal les modifications génétiques observées chez les patients atteints de formes familiales de MP.

1.2. Modèles génétiques

L'identification de mutations de gènes responsables de formes génétiques de MP a conduit au développement de nouveaux modèles animaux.

De nombreux modèles de MP basés sur l'introduction de gènes mutés responsables des formes familiales ont été développés. Ils utilisent soit *i)* une surexpression de formes mutées (LRRK2 et α-synucléine notamment) ou sauvages (α-synucléine pour récapituler les duplications et triplications) pour modeliser les formes familiales autosomiques dominantes de MP (Figure 6), *ii)* des stratégies de recombinaison homologue visant à inactiver un gène pour modéliser les formes récessives de maladie de parkinson (Parkin et PINK1 ; Figure 7).

	Promoter	Cells in which gene expressed	Corresponding human genetics	DA neuron loss in SN	Striatal DA loss	aSyn aggregation in SN	Motor phenotype	Non-motor phenotype					L-dopa-reversible deficits
								Olfactory	Cognitive	Gastrointestinal	Autonomic	Anxiety	
WT *SNCA*[24,28]	PDGFβ	Neurons (3-fold increase in expression)	Multiplication/ polymorphisms	NP	Mild	Mild	Mild	–	Mild	–	–	–	–
WT *SNCA* (Thy1-aSyn mice)[29,30]	mThy-1	Neurons (2–3-fold increase in expression)	Multiplication/ polymorphisms	NP	Moderate	Strong	Strong	Strong	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate	Moderate
WT *SNCA*[37]	CaM-tTA	Neurons (≤1·12-fold increase in expression)	Multiplication/ polymorphisms	NP	NP	NP*	Mild	–	Mild	–	–	–	–
WT *SNCA*[34,35]	CaM-tTA	Neurons (2–3-fold increase in expression)	Multiplication/ polymorphisms	–	–	–	–	–	Moderate	–	–	–	–
A53T *SNCA*[40]	mThy-1	Neurons	Dominant mutation	NP	NP	NP	Moderate†	–	–	–	–	–	–
A30P *SNCA*[41–43]	mThy-1	Neurons	Dominant mutation	NP	NP	NP*	Moderate	–	Mild	–	–	Moderate	–
A30P and A53T *SNCA*[44]	hThy-1	Neurons	Dominant mutation	–	Moderate	Mild*	Moderate	–	–	–	–	–	–
A53T *SNCA*[45,46]	mPrion	Neurons	Dominant mutation	NP	NP	NP	Moderate†	–	–	–	–	–	–
A53T *SNCA*[47–49]	mPrion	Neurons	Dominant mutation	NP	NP	NP‡	Moderate†	–	Mild	–	–	Moderate	–
A53T *SNCA*[50,51]	mPrion	Neurons	Dominant mutation	NP	NP§	NP*	Moderate	–	–	–	–	–	–
A30P *SNCA*[52]	mPrion	Neurons	Dominant mutation	NP	NP¶	NP	Mild	–	–	–	–	–	NP
A30P and A53T *SNCA*[53,54]	Rat TH	TH+ neurons	Dominant mutation	Mild	Moderate	NP*	Mild	–	–	–	–	–	Mild
A53T *SNCA*[55]	aSyn (PAC)	aSyn+ neurons	Dominant mutation	NP	NP	NP	Moderate	NP	–	Moderate	NP	–	–
Y39C *SNCA*[56]	mThy-1	Neurons	NP	NP	–	NP	Moderate	–	Mild	–	–	–	–
Truncated 1-120 *SNCA*[57,58]	Rat TH	TH+ neurons	Found in brain of patients with PD	NP	Mild‡	Moderate	Mild	–	–	–	–	–	Mild
Truncated 1-130 *SNCA*[59]	Rat TH	TH+ neurons	Found in brain of patients with PD	Mild	Mild	Moderate	Mild	–	–	–	–	–	Mild

Figure 6 : Modèles transgéniques murins exprimant une forme humaine d'α-synucléine. D'après Chesselet et Richter, 2011.

	Promoter	Cells in which expressed	Corresponding human genetics	DA neuron loss in SN	Striatal DA loss	aSyn aggregation in SN	Motor phenotype	Non-motor phenotype					L-dopa-reversible deficits
								Olfactory	Cognitive	Gastrointestinal	Autonomic	Anxiety	
Park2 KO[60,61]	NA	NA	Recessive mutations	NP	NP*	NP	Mild	–	Mild	–	–	Mild	–
Park2[Ex3]/Ex3[62]	NA	NA	Recessive mutations	Moderate	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Q311X *Park2*[63]	DAT-BAC	DA neurons	Recessive mutations	Mild	Moderate	Mild	Moderate	–	–	–	–	–	–
Park7 KO[64-66]	NA	NA	Recessive mutations	NP	NP†	NP	Mild	–	Mild	–	–	–	–
Pink1 KO[67,68]	NA	NA	Recessive mutations	NP	Mild	NP	Mild	–	–	–	–	–	–
Park2/*Park7*/ *Pink1* KO[69]	NA	NA	3 recessive mutations	NP	NP†	–	–	–	–	–	–	–	–
R1441G *Lrrk2*[70]	BAC	LRRK2+ neurons	Dominant mutation	NP	NP*	–	Moderate	–	–	–	–	–	Mild
R1441C *Lrrk2* KO[71]	NA	LRRK2+ neurons	Dominant mutation	NP	NP‡	NP	NP	–	–	–	–	–	–
G2019S *Lrrk2*[72]	BAC	LRRK2+ neurons	Dominant mutation	NP	Mild*	NP	NP	–	–	–	–	–	–
G2019S *Lrrk2*[73]	CMVE-PDGFβ	Neurons	Dominant mutation	Mild	NP	NP	NP	–	–	–	–	–	–

Figure 7 : Autres modèles de MP. D'après Chesselet et Richter, 2011.

Les résultats issus de l'analyse phénotypique de ces modèles sont globalement décevants puisqu'une dégénérescence dopaminergique chronique et massive n'est jamais observée. Toutefois, certains d'entre eux permettent de récapituler la synucléinopathie caractéristique de la MP et sont en ce sens utiles pour comprendre les mécanismes à l'origine de cette synucléinopathie et pour en définir le rôle dans la pathogenèse. En marge de ces modèles, l'utilisation de vecteurs viraux, permettant de conduire l'expression de formes mutées des gènes responsables de formes familiales de MP, a en revanche permis de développer de nouveaux modèles récapitulant à la fois la dégénérescence dopaminergique et la synucléinopathie (Kirik et coll., 2002). Bien que l'utilisation de ces modèles reste lourde (elle nécessite des approches stéréotaxiques), elle permet néanmoins une modélisation plus fidèle de la pathologie réelle.

En résumé les modèles génétiques nous apportent une meilleure compréhension de la pathophysiologie de la MP notamment de la synucléinopathie. Cependant un modèle permettant notamment de reproduire la synucléinopathie et la dégénérescence dopaminergique de manière concomitante constitue encore à l'heure actuelle un réel défi. Malgré l'intérêt de la classification de Braak cette difficulté pose aussi la question du rôle de la synucléinopathie dans les mécanismes de dégénérescence. Le facteur liant les deux phénomènes, s'il existe, reste élusif.

1.3. Combinaison des modèles toxiques et génétiques

Pour tenter de montrer l'importance des interactions gène/environnement dans le développement de la MP, plusieurs groupes ont utilisé des modèles combinant à la fois des approches génétiques et toxiques.

Ainsi, certains auteurs ont intoxiqué des souris déficientes pour la synucléine avec du MPTP. Ces animaux présentaient une résistance vis-à-vis de la neurotoxicité suggérant une action combinée de ces deux facteurs dans la dégénérescence dopaminergique (Dauer et coll., 2002 ; Drolet et coll., 2004 ; Robertson et coll., 2004).

Cependant, des modèles de souris intoxiquées au MPTP ou au paraquat et surexprimant l'α-synucléine humaine normale ou mutée ont produit des résultats contradictoires probablement en raison des différentes voies d'administration du MPTP et des différentes modifications génétiques utillisées (Rathke-Hartlieb et coll., 2001 ; Dong et coll., 2002 ; Song et coll., 2004 ; Nieto et coll., 2006 ; Fernagut et coll., 2007).

D'autres auteurs se sont intéressés à la combinaison de modèles toxiques et de modification des gènes impliqués dans les formes autosomiques récessives de la MP. La déficience de Parkin chez la souris n'a pas permis de modifier la susceptibilité au MPTP de ces animaux malgré l'utilisation de différents régimes d'intoxication (Thomas et coll., 2007). En revanche, des souris déficientes pour DJ-1 présentaient une hypersensibilité au MPTP alors que la surexpression de cette protéine protégeait les animaux du stress oxydant et de la mort neuronale (Kim et coll., 2005a). Enfin des souris recevant des injections intra-striatales de vecteurs viraux conduisant à l'expression de PINK1 présentaient moins de dégénérescence dopaminergique après intoxication par le MPTP (Haque et coll., 2008).

L'ensemble de ces résultats confirme l'intérêt de ces approches combinées dans l'étude des mécanismes de la maladie de parkinson. Le rôle possible d'une interaction entre facteurs génétiques et environnementaux semble également conforté par la majorité de ces études.

L'utilisation de ces modèles animaux combinée aux études humaines a déjà permis de dégager plusieurs mécanismes potentiellement impliqués dans la pathologie. Des altérations mitochondriales, une augmentation du stress oxydant, des modifications d'activité électrique des neurones ainsi que des dysfonctions de la voie

ubiquitine/protéasome conduisant à l'apoptose et à l'autophagie pourraient notamment être impliqués dans la MP.

2. Hypothèses de la mort neuronale

2.1. Altérations mitochondriales

Les mitochondries sont ubiquitaires dans les cellules eucaryotes. Elles ont de multiples fonctions en particulier la production d'adénosine triphosphate (ATP) par phosphorylation oxydative via la chaîne de transport d'électrons mais aussi la signalisation pour la mort cellulaire par apoptose (Schapira, 2007). Il est très intéressant de noter qu'au cours des dernières années les études génétiques et biochimiques dans la MP ont convergé vers les altérations mitochondriales et le métabolisme des radicaux libres comme voies de dégénérescence dopaminergique (Schapira, 2011).

2.1.1 Déficience des complexes de la chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire mitochondriale est composée de quatre complexes protéiques associés à une ATP synthase permettant la production d'énergie par la cellule. Les premiers travaux de Schapira et coll. ont mis en évidence une déficience du complexe I de la chaîne respiratoire dans la substance noire de patients parkinsoniens (Schapira et coll., 1989). Mann et coll. en 1994 ont confirmé ce résultat et quantifié la diminution d'activité du complexe I à 35% dans la substance noire (Mann et coll., 1994). Par ailleurs, cette altération n'a pas été retrouvée dans d'autres régions cérébrales comme le putamen, le noyau caudé ou le cervelet (Schapira et coll., 1990). Une déficience en complexe I de 20% environ a également été mise en évidence dans les plaquettes de patients (Parker et coll., 1989 ; Krige et coll., 1992 ; Haas et coll., 1995). Bien que controversée, cette altération a également été retrouvée dans le muscle squelettique des malades (Taylor et coll., 1994 ; Penn et coll., 1995). Des investigations menées dans le modèle d'intoxication par le MPTP chez la souris et sur des mitochondries isolées ont montré que les modifications d'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale sensibilisent la cellule à l'apoptose (Perier et coll., 2005).

Outre ces altérations biochimiques, des modifications dans le génome mitochondrial ont été détectées. Etant donné que l'ADN mitochondrial (ADNmt) code pour 13 des 83 sous-unités protéiques de la chaîne respiratoire dont 7 pour le complexe I, des mutations dans

l'ADNmt constituaient une hypothèse prometteuse. Bien qu'un taux de délétion de 45% de l'ADNmt ait été mis en évidence dans la SN de sujets parkinsoniens, ce taux est toutefois similaire chez les individus âgés (Kraytsberg et coll., 2006 ; Bender et coll., 2006). Suite à ces résultats, Ekstrand et coll. ont mis au point une souris déficiente pour un facteur de transcription mitochondrial spécifiquement dans les neurones dopaminergiques. Ces souris présentaient une délétion d'ADNmt, un déficit de la chaîne respiratoire, une perte dopaminergique progressive, des symptômes moteurs répondant à la lévodopa et des inclusions intraneuronales α-synucléine négatives (Ekstrand et coll., 2007). Ces données confirment donc un rôle central de la mitochondrie dans la dégénérescence neuronale déjà suggéré par les toxines dopaminergiques.

Cette hypothèse est enfin confortée par une méta-analyse pangénomique récente qui a mis en évidence dix gènes associés à la MP et impliqués dans la chaîne de transport d'électrons, la biogenèse de la mitochondrie et du métabolisme du glucose (Zheng et coll., 2010).

L'ensemble de ces données suggère donc un rôle important de la mitochondrie dans la genèse de la MP et notamment des altérations de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire. En outre, plusieurs gènes impliqués dans des formes familiales de MP codent pour des protéines qui semblent réguler les fonctions et l'homéostasie mitochondriale comme nous allons le voir dans le chapitre suivant.

2.1.2 Fonction des gènes mutés dans les formes familiales de maladie de Parkinson

Plusieurs gènes mutés dans les formes familiales de MP codent pour des protéines localisées à la mitochondrie ou jouant un rôle dans sa fonction. Ainsi, la Parkin est une protéine ubiquitaire intracellulaire pouvant se lier au réticulum endoplasmique, à l'appareil de Golgi, aux vésicules synaptiques et à la mitochondrie (Shimura et coll., 1999 ; Stichel et coll., 2000 ; Kubo et coll., 2001). Sa fonction reste mal connue mais elle possède des domaines de liaison aux protéines et une activité E3 ligase impliquée dans la voie ubiquitine-protéasome (Shimura et coll., 2000 ; Zhang et coll., 2000). Chez les patients présentant une mutation du gène *parkin*, l'activité des complexes I et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale est diminuée dans les leucocytes périphériques (Muftuoglu et coll., 2004). De

plus, des souris déficientes pour le gène *parkin* présentent une diminution d'activité des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale (Palacino et coll., 2004). Plus récemment des altérations mitochondriales sévères ont été observées dans les cellules gliales de souris génétiquement modifiées pour la Parkin (Schmidt et coll., 2011). Cependant les souris déficientes pour la Parkin ne développent pas de perte neuronale dopaminergique ni de formation d'inclusions intracytoplasmiques (Goldberg et coll., 2003).

PINK1 est localisée à la mitochondrie (Silvestri L Hum Mol Gen 2005). Les souris déficientes pour PINK1 ne présentent pas d'anomalie majeure et le nombre de neurones dopaminergiques reste inchangé. Néanmoins, ces souris présentent des altérations mitochondriales modérées (Gautier et coll., 2008) potentiellement liées à une modification de l'homéostasie calcique mitochondriale (Gandhi et coll., 2009 ; Akundi et coll., 2011).

DJ-1, quant à elle, est exprimée de façon ubiquitaire et localisée dans le cytosol et la mitochondrie (Zhang et coll., 2005a). Au niveau mitochondrial cette protéine joue un rôle protecteur contre le stress oxydatif (Andres-Mateos et coll., 2007). Si l'absence de DJ-1 chez la souris ne produit pas en soi de phénotype majeur, les animaux déficients pour DJ-1 montrent une sensibilité accrue au stress oxydant après intoxication par le MPTP (Andres-Mateos et coll., 2007 ; Goldberg et coll., 2005 ; Kim et coll., 2005a).

Au total, plusieurs modèles génétiques de la MP pointent vers un rôle de la mitochondrie dans la MP. Un nombre important de travaux montre par ailleurs que ces altérations mitochondriales peuvent notamment conduire à l'augmentation du stress oxydant, un phénomène observé chez les patients et dans de nombreux modèles de MP.

2.2. Stress oxydatif

Un nombre assez important d'études a mis en évidence la présence d'un stress oxydant dans les échantillons biologiques de patients atteints de MP. Dans ces études, différents types de marqueurs ont été étudiés pour mesurer l'importance du stress oxydatif. Ces marqueurs révèlent la présence de modifications oxydatives des lipides, des acides nucléiques et des protéines. S'agissant des modifications lipidiques, une diminution des acides gras polyinsaturés très sensibles à l'oxydation, une augmentation du malondialdéhyde et du 4-hydroxy-2-nonénal, marqueurs d'oxydation lipidique, ont été mis en évidence dans la SN de patients parkinsoniens (Dexter et coll., 1989 ; Yoritaka et coll., 1996). Des marqueurs de l'oxydation protéique ont également été détectés. Ainsi, les taux

de carbonyls, marqueurs des protéines solubles oxydées, sont également augmentés dans la SN de patients (Alam et coll., 1997a ; Floor et Wetzel, 1998). Enfin, la 8-hydroxydeoxyguanosine, un marqueur de l'ADN oxydé (Shigenaga et Ames, 1991), est elle aussi très augmentée dans la SN des patients (Alam et coll., 1997b ; Nakabeppu et coll., 2007).

Plusieurs études ont également mis en évidence des altérations oxydatives dans le sang périphérique et le liquide céphalo-rachidien de patients (Selley, 1998 ; Kikuchi et coll., 2002 ; Abe et coll., 2003 ; Buhmann et coll., 2004 ; Sohmiya et coll., 2004 ; Prigione et coll., 2006 ; Nakabeppu et coll., 2007).

Outre ces modifications oxydatives, des modifications de protéines impliquées dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène ont pu être détectées. En effet, l'activité de la SOD2 est augmentée dans le cerveau des patients (Saggu et coll., 1989 ; Poirier et coll., 1994). L'expression de cette isoforme mitochondriale est inductible en réponse à une augmentation du stress oxydant, suggérant une augmentation d'ERO mitochondriales dans la MP. A l'inverse, l'activité de la glutathion peroxydase et de la catalase, deux autres enzymes de détoxification, est diminuée dans le cerveau des patients suggérant une augmentation de sensibilité au stress oxydant (Ambani et coll., 1975 ; Kish et coll., 1985).

En outre, plusieurs auteurs ont tenté d'identifier l'origine de ce stress oxydatif. Ainsi, l'augmentation d'activité de la SOD2 et l'inhibition du complexe I dans le cerveau des patients constituent des arguments en faveur d'une production mitochondriale d'ERO. De fait, plusieurs études menées sur des mitochondries isolées de rat ou de souris ont montré que la diminution d'activité du complexe I par la roténone ou le MPTP engendre une augmentation d'ERO (Hasegawa et coll., 1990 ; Ramsay et Singer, 1992 ; Barrientos et Moraes, 1999 ; Perier et coll., 2005).

La production d'ERO pourrait également être cytosolique. En effet, la capacité de la dopamine à s'auto-oxyder en dehors du compartiment vésiculaire synaptique supporte cette hypothèse (Lotharius et O'Malley, 2000). A noter que le MPP+ pourrait favoriser ce mécanisme en chassant du compartiment vésiculaire la dopamine lorsque celui-ci, transporté par le VMAT, s'accumule dans les vésicules synaptiques. Il est intéressant de noter que les neurones contenant de la neuromélanine, un produit d'auto-oxydation de la dopamine, dégénèrent préférentiellement dans la MP (Hirsch et coll., 1988).

Outre la production intraneuronale de ce stress oxydatif, de nombreuses études suggèrent également que les cellules gliales réactives environnantes constituent une source importante d'ERO et d'espèces réactives de l'azote (ERA) comme cela sera présenté dans les chapitres suivants.

L'ensemble de ces travaux suggère un rôle important du dysfonctionnement mitochondrial et du stress oxydant dans la dégénérescence dopaminergique.

2.3. Déficit d'excitabilité des neurones

Une autre hypothèse intéressante se base sur les propriétés électriques particulières des neurones dopaminergiques du mésencéphale. Etudiés *in vivo* chez la souris, les NDA présentent différents types de patrons de décharge spontanée allant du type pacemaker (émission régulière de potentiels d'action) au mode en bouffées (émission phasique de potentiels d'action) en passant par un mode aléatoire (Sanghera et coll., 1984 ; Kita et coll., 1986). Ces modes de décharge sont contrôlés par une combinaison complexe de flux ioniques au travers de récepteurs canaux (Wolfart et Roeper, 2002 ; Komendantov et coll., 2004) qui permettent aux neurones dopaminergiques d'optimiser la libération striatale de dopamine (Gonon et Buda, 1985). Outre ce rôle, l'activité électrique des neurones dopaminergiques pourrait jouer une fonction majeure dans leur survie tant au niveau embryonnaire (Murer et coll., 1999 ; Douhou et coll., 2001) que chez l'adulte. De façon intéressante l'utilisation du MPTP a permis de mieux comprendre l'importance de l'activité électrique dans la survie des neurones dopaminergiques chez l'adulte. En effet, des souris déficientes pour Kir6.2, une sous-unité d'un canal potassique permettant l'hyperpolarisation des neurones, présentent une vulnérabilité moindre aux effets neurotoxiques du MPTP (Liss et coll., 2005). Des études de patch-clamp sur des tranches de mésencéphale de souris contrôles ont permis de montrer que le MPP+ entraînait l'activation des canaux potassiques et l'hyperpolarisation des NDA (Liss et coll., 2005). En utilisant un autre inhibiteur du complexe I, la roténone, les auteurs ont montré que l'activation du canal potassique et l'hyperpolarisation des NDA de la SN dépendait de la production d'espèces réactives de l'oxygène. De manière intéressante, les concentrations en inhibiteurs du complexe I entraînant une activation des canaux potassiques dans les NDA de la SN n'avaient, en revanche, pas d'effet sur ceux de l'ATV connus pour être moins vulnérables dans la MP (German et coll., 1988 ; Liss et coll., 2005).

Au total, ces résultats montrent l'importance de l'activité électrique des neurones dopaminergiques dans leur survie et mettent en évidence un lien potentiel entre ce processus et le stress oxydant.

2.4. Dysfonction des voies de dégradation protéique

Comme pour d'autres maladies neurodégénératives, la présence d'agrégats protéiques caractéristiques a alimenté l'hypothèse selon laquelle un déficit des voies de dégradation protéique pourrait jouer un rôle majeur dans la genèse de la MP. L'homéostasie des protéines cellulaires est rendue possible par des systèmes de réparation et des mécanismes de dégradation efficaces assurés entre autres par les voies ubiquitine/protéasome et autophagie/lysosome.

L'implication de la voie ubiquitine/protéasome a été suspectée depuis la mise en évidence de taux très importants d'ubiquitine dans les corps de Lewy (Kuzuhara et coll., 1988) et, plus tard, la découverte de l'activité E3 ubiquitine-protéine ligase de la Parkin (Imai et coll., 2000 ; Zhang et coll., 2000). Plusieurs travaux mettant en évidence une altération des sous-unités du protéasome et une diminution de son activité dans la SN de patients ont également porté cette hypothèse (McNaught et Jenner, 2001 ; McNaught et coll., 2002 ; Furukawa et coll., 2002 ; McNaught et coll., 2003). Chez l'animal, une première étude de McNaught et coll. avait mis en évidence une dégénérescence dopaminergique progressive et la présence d'inclusions intracytoplasmiques chez des rats traités par des inhibiteurs du protéasome (McNaught et coll., 2004). Cependant, des travaux consécutifs dans d'autres laboratoires ont produit des résultats contradictoires (Schapira et coll., 2006 ; Zeng et coll., 2006 ; BBove et coll., 2006 ; Kordower et coll., 2006 ; Landau et coll., 2007 ; Mathur et coll., 2007). Il faut également noter que de nombreuses études effectuées tant chez l'homme que chez l'animal remettent en cause l'implication dans la MP des fonctions de dégradation protéique de la Parkin *via* le système ubiquitine/protéasome en faveur de ses autres fonctions (Corti et coll., 2011).

Les mécanismes d'autophagie permettent également de dégrader les protéines et les organelles via les lysosomes (Luzio et coll., 2007). Les premières études d'Anglade et coll. ont montré la présence d'autophagosomes, des structures à double membrane, fusionnant avec les lysosomes dans les NDA de patients (Anglade et coll., 1997b). Ce résultat fut confirmé

très récemment par les travaux d'Alvarez-Erviti et coll. qui montrent que l'expression de deux protéines impliquées dans l'autophagie, LAMP2A et hsc70, est fortement diminuée dans la SNpc des patients parkinsoniens. En outre l'absence de LAMP2A dans des lignées cellulaires augmente la demi-vie de l'α-synucléine suggérant que la diminution de son expression chez les patients pourrait favoriser une accumulation de l'α-synucléine (Alvarez-Erviti et coll., 2010). Dehay et coll. ont par ailleurs montré une diminution du nombre de lysosomes et l'accumulation subséquente d'autophagosomes dans les neurones dopaminergiques des souris intoxiquées au MPTP et chez les patients (Dehay et coll., 2010).

Ces données suggèrent donc que des déficits des voies de dégradation des protéines pourraient favoriser leur accumulation et donc la dégénérescence dopaminergique.

2.5. Rôle de l'α-synucléine

Les mécanismes conduisant à l'agrégation de l'α-synucléine ont été et restent le sujet d'une importante recherche. Les données actuelles montrent que des fibrilles d'α-synucléine peuvent être formées *via* un processus multi-étapes qui débute avec la formation d'oligomères résultant de plusieurs monomères partiellement repliés en feuillet β. Ces oligomères catalyseraient ensuite la formation d'intermédiaires plus stables, les protofibrilles (Li et coll., 2001 ; Uversky et coll., 2001 ; Fink, 2006). Enfin, ces protofibrilles s'agrégeraient en fibrilles pour donner naissance à des structures plus larges notamment retrouvées dans les corps de Lewy (Fink, 2006). Au total, des défauts de dégradation d'α-synucléine pourraient donc conduire à l'accumulation de ces formes multimériques.

Plusieurs études suggèrent que les formes pré-fibrillaires mais aussi les protofibrilles pourraient jouer un rôle toxique pour les NDA (Volles et coll., 2001 ; Volles et Lansbury, 2002 ; Volles et Lansbury, 2003 ; Danzer et coll., 2007 ; Outeiro et coll., 2008 ; Karpinar et coll., 2009 ; Wright et coll., 2009).

L'ensemble de ces modifications mitochondriales, électriques et d'agrégation protéique pourraient conduire à la mort cellulaire par apoptose des neurones dopaminergiques telle qu'elle a été décrite par plusieurs études (Boîte 4).

Boîte 4

Mécanismes de mort des neurones dopaminergiques par apoptose

Un mécanisme de mort des neurones dopaminergiques par apoptose a été suggéré par plusieurs études. Ainsi, Mochizuki et coll. ont tout d'abord détecté, par la technique TUNEL, une augmentation de l'ADN fragmenté dans la substance noire de patients. Ce résultat fut ensuite confirmé chez l'homme et la souris intoxiquée au MPTP par Tatton et coll. en utilisant des doubles marquages fluorescents et par Anglade et coll. par microscopie électronique (Mochizuki et coll., 1996 ; Anglade et coll., 1997a ; Tatton et Kish, 1997 ; Tatton et coll., 1998). L'apoptose peut impliquer 3 voies différentes *i)* la voie intrinsèque *via* la mitochondrie mettant en jeu des caspases et des protéines de la famille Bcl2, *ii)* la voie extrinsèque suite à la liaison de ligands spécifiques de récepteurs de la famille du TNF (*tumor necrosis factor*), *iii)* une voie réticulaire faisant également intervenir des caspases mais au niveau du réticulum endoplasmique. Cette dernière voie est mise en jeu lorsque le taux de protéines mal conformées devient trop élevé (Burke, 2008). Plusieurs études ont démontré l'implication de ces trois cascades apoptotiques dans la dégénérescence dopaminergique. Ainsi, des marqueurs de la voie intrinsèque tels que Bax, Bcl2 ou les caspases 3 et 9 activées ont été impliqués dans la mort des NDA chez les patients (Hirsch et coll., 1999 ; Hartmann et coll., 2000 ; Simunovic et coll., 2009). L'implication de la voie extrinsèque a été révélée par l'augmentation d'expression de la caspase 8 activée dans les NDA de patients (Hartmann et coll., 2001). Des modifications d'expression de Fas, de FADD et du TNF *receptor* 1 ont également été détectées (Mogi et coll., 1996 ; Ferrer et coll., 2000 ; Mogi et coll., 2000 ; Hartmann et coll., 2002). Enfin, des marqueurs de la voie réticulaire tels que pPERK (*phosphorylated pancreatic ER kinase*) sont augmentés dans les NDA de patients (Hoozemans et coll., 2007). Confortant également l'hypothèse d'une mort par apoptose des NDA, l'expression de p53, un facteur pro-apoptotique, n'est pas modifiée dans la substance noire de patients mais sa forme phosphorylée, potentiellement active, est augmentée (Mogi et coll., 2007 ; Nair et coll., 2006). Outre ces données chez l'homme, les études chez l'animal ont montré que l'administration de MPTP selon un mode subaigu entraîne une mort dopaminergique apoptotique (Tatton et Kish, 1997). Dans ces conditions l'expression de Bax et de la caspase 8, facteurs pro-apoptotiques est augmentée et celle de Bcl2, facteur anti-apoptotique, est diminuée dans les neurones dopaminergiques de la SN (Vila et coll., 2001 ; Viswanath et coll., 2001). Enfin, les souris déficientes en Bax sont plus résistantes aux effets toxiques du MPTP, confirmant un rôle de l'apoptose dans les mécanismes de dégénérescence dopaminergique (Vila et coll., 2001).

Les mécanismes intracellulaires conduisant à la mort des NDA sont probablement multiples et leur importance respective dans les différents modèles de MP et chez chaque patient pourrait être différente mais ils convergent vraisemblablement vers un mécanisme de mort cellulaire par apoptose.

Parallèlement aux dysfonctions neuronales, de nombreuses études suggèrent dorénavant un rôle essentiel de mécanismes non autonomes de la mort neuronale faisant intervenir les cellules environnantes et en particulier les cellules gliales et des cellules du système immunitaire périphérique. Ces mécanismes sont présentés dans le chapitre suivant.

III. Neurodégénérescence et neuroinflammation : mécanismes non autonomes de la mort neuronale

Les mécanismes non autonomes de la mort neuronale suggèrent que les processus neurodégénératifs ne sont pas l'unique conséquence d'altérations intrinsèques aux

neurones mais peuvent être aussi modulés par des interactions avec les cellules voisines, en particulier les cellules gliales et les cellules immunitaires périphériques qui éventuellement infiltrent le parenchyme cérébral. Ces mécanismes sont à l'origine de processus neuroinflammatoires et reposent sur deux types de réponses immunitaires : innée et adaptative.

1. Immunité innée et neuroinflammation

1.1. Qu'est ce que l'immunité innée ?

L'immunité innée constitue la première ligne de défense de l'organisme contre les épisodes infectieux ou lésionnels répondant rapidement aux dérèglements de l'homéostasie tissulaire. En périphérie, après activation, les macrophages initient le recrutement d'autres cellules immunitaires pour éliminer les pathogènes et restaurer l'intégrité tissulaire (Gordon et Taylor, 2005 ; Mosser et Edwards, 2008). Ces mécanismes s'appuient sur la production de nombreux médiateurs inflammatoires représentant les effecteurs moléculaires de cette réponse immunitaire innée.

1.2. Les acteurs moléculaires

Plusieurs acteurs moléculaires, dont les cytokines et les enzymes oxydatives, sont impliqués dans la réponse inflammatoire.

1.2.1 Cytokines

Les cytokines constituent une famille de molécules de faible poids moléculaire permettant la communication cellulaire. Dans le système nerveux central elles ont des fonctions diverses dont la modulation de la réponse immunitaire, de la prolifération gliale ou encore de la libération de neurotransmetteurs (Merrill et Benveniste, 1996 ; Hanisch, 2002 ; Zalcman et coll., 1994). On peut classer les cytokines en huit familles principales (Table 2).

Table 2		
Famille des cytokines (d'après Hopkins et Rothwell, 1995).		
Famille de cytokines	**Membres**	**Effets majeurs**
Interleukines	IL-1, IL-2, …, IL-15	Immunorégulation
Chimiokines	CCL5, CXCL7, CXCL10 …	Chimio-attraction des leucocytes
Facteurs de nécrose tumorale	TNF-a, TNF-b	Immunorégulation, cytotoxicité tumorale
Interférons	INF- a, INF- b, INF- g	Immunorégulation, inhibiteur de réplication virale
Facteurs stimulateurs de colonies	G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IL-13	Croissance et différenciation des cellules progénitrices de la moelle osseuse, activation des fonctions des leucocytes matures
Facteurs de croissance	EGF, FGF, PDGF, TGF, ECGF	Croissance cellulaire et différentiation
Neurotrophines	BDNF, NGF, NT-3, NT-6, GDNF	Croissance neuronale et différentiation
Neuropoïétines	LIF, CNTF, OM, IL-6	Régénérescence dans le système nerveux

Ces molécules activent des récepteurs membranaires couplés à des voies de signalisation intracellulaires mettant en jeu notamment des protéines kinases, des phosphatases et des facteurs de transcription.

La plupart des types cellulaires du SNC peuvent exprimer les récepteurs aux cytokines et les microglies et les astrocytes semblent constituer la source majeure de ligands cytokiniques. Etant particulièrement hydrophiles, les cytokines passent difficilement la barrière hémato-encéphalique (Hopkins et Rothwell, 1995). Les cellules immunitaires périphériques pénétrant le parenchyme cérébral peuvent cependant constituer une source alternative et importante de cytokines dans le SNC (Merrill et Benveniste, 1996).

Ces molécules ont également été classées selon leur activité biologique. Alors que des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFNγ (interféron gamma) peuvent promouvoir une réponse immunitaire, les cytokines anti-inflammatoires comme l'interleukine (IL)-10 peuvent diminuer cette réponse. L'intensité de la réponse inflammatoire va donc dépendre de l'équilibre subtil entre ces deux classes de cytokines afin de permettre une réponse efficace mais limitée dans le temps et l'espace.

1.2.2 Les systèmes catalytiques du « burst » oxydatif

Outre les cytokines, la réaction inflammatoire repose également sur l'expression de systèmes enzymatiques qui sont à l'origine d'une production importante d'ERO ou d'ERA et

qui participe à l'élimination, par exemple, des pathogènes dans un contexte infectieux. L'expression de ces systèmes catalytiques est notamment importante dans les macrophages activés.

Ainsi la nicotinamide adenine dinucléotide (NADPH) oxydase est l'enzyme majeure de production de superoxyde (O_2^-) par les microglies activées (Babior, 1999 ; Gao et coll., 2003 ; Wu et coll., 2003 ; Wu et coll., 2005).

La cyclooxygénase (COX) est également exprimée dans le cerveau, la COX-1 étant essentiellement microgliale et la COX-2 neuronale (Yamagata et coll., 1993 ; Schwab et Schluesener, 2003). L'expression de la cyclooxygénase 2 est généralement induite par les cytokines (Vane 1998) et conduit à la production de prostaglandines qui permettent d'initier l'inflammation. La cytotoxicité de cette enzyme est en partie médiée par la production d'ERO (Hastings, 1995 ; Teismann et coll., 2003).

La myéloperoxydase (MPO), notamment exprimée par les cellules phagocytaires (Hampton et coll., 1998), permet l'utilisation de produits de dégradation du NO afin de produire des ERA (van der Vliet et coll., 1997). L'utilisation de souris déficientes en MPO a permis de mettre en évidence son rôle majeur dans la production de 3-nitrotyrosine durant les processus inflammatoires aigus (Gaut et coll., 2002).

Enfin, l'isoforme inductible de l'enzyme de synthèse du monoxyde d'azote (NOSi), peu exprimée dans le cerveau à l'état physiologique normal, voit son expression augmenter considérablement dans les cellules gliales en condition pathologique (Simmons et Murphy, 1992).

1.3. Les acteurs cellulaires

Dans le système nerveux central les acteurs cellulaires de cette immunité innée sont, pour l'essentiel, les cellules microgliales capables de monter une réponse inflammatoire.

1.3.1 Les microglies

Dans le système nerveux central, les macrophages tissulaires résidents sont représentés par les cellules microgliales et les macrophages périvasculaires. Les microglies sont d'origine myéloïde et représentent, chez la souris, 5 à 12% des cellules du SNC selon les régions cérébrales (Lawson et coll., 1990). Il a été suggéré que des progéniteurs microgliaux

pouvaient être recrutés en périphérie en condition pathologique (Ladeby et coll., 2005). En condition physiologique ce processus serait toutefois rare. Par ailleurs, les cellules microgliales résidentes sont en général capables de s'autorenouveller et d'augmenter leur nombre par mitose (Ajami et coll., 2007 ; Mildner et coll., 2007). Dans le cerveau adulte, les microglies sont considérées dans un état dit « quiescent » et présentent une morphologie extrêmement ramifiée (Hanisch et Kettenmann, 2007 ; Ransohoff et Perry, 2009). Cependant, des études d'imagerie *in vivo* montrent que les prolongements microgliaux explorent continuellement leur environnement à l'état physiologique (Davalos et coll., 2005 ; Nimmerjahn et coll., 2005). Etant particulièrement sensibles aux modifications de leur microenvironnement, elles peuvent passer rapidement d'un état « quiescent » à un état « activé » lors d'une lésion ou dans un contexte pathologique, par exemple, en présence de lipopolysaccharide (LPS), une endotoxine bactérienne (Zielasek et Hartung, 1996). Elles se caractérisent alors par des prolongements raccourcis et extrêmement ramifiés et un corps cellulaire hypertrophié. Ces modifications morphologiques s'accompagnent également de modifications moléculaires à travers la production de nombreuses molécules membranaires et cytoplasmiques et notamment des médiateurs inflammatoires (Kreutzberg, 1996).

Certains auteurs suggèrent qu'en condition pathologique, les microglies peuvent adopter un large panel phénotypique dépendant du contexte inflammatoire (Perry et coll., 2010). De façon extrêmement simplifiée, deux phénotypes majeurs se dégagent : un phénotype dit M1, ou pro-inflammatoire et un phénotype dit M2, ou anti-inflammatoire. Cette distinction phénotypique a été initialement étudiée et caractérisée au niveau des macrophages périphériques et est désormais évoquée pour les cellules microgliales (Martinez et coll., 2008 ; Saijo et Glass, 2011).

Comme les macrophages périphériques, les cellules microgliales sont capables de reconnaître un nombre limité de molécules conservées au cours de l'évolution et partagées par de nombreux agents infectieux tels que le LPS ou des peptidoglycanes. Pour ce faire, les macrophages et microglies utilisent des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires tels que les *Toll-like receptors* (TLRs). De nombreuses données *in vivo* et *in vitro* concernant l'activation microgliale ont été recueillies en utilisant le LPS qui se fixe sur le TLR4 (Jack et coll., 2005). En présence de LPS, les microglies produisent de nombreuses cytokines telles que l'interleukine (IL)-1β, le tumor necrosis factor-α (TNF-α) ou des chimiokines (Kim et de Vellis, 2005). De manière inattendue, des travaux récents ont montré que ces

récepteurs peuvent également être activés par des signaux de danger libérés par les cellules eucaryotes en souffrance (Gris et coll., 2010 ; Zhang et coll., 2010b).

En condition pathologique, les cellules microgliales peuvent présenter des antigènes via le CMH pour activer le système immunitaire adaptatif. La production de cytokines par ces cellules permet de moduler le comportement des cellules environnantes, en particulier les astrocytes et les cellules endothéliales vasculaires. En outre, les microglies peuvent également produire des ERO et des ERA *via* notamment la NADPH oxydase et la NOSi (Block et coll., 2007 ; Saijo et Glass, 2011). Enfin, une des fonctions majeure des cellules microgliales, tout comme les macrophages périphériques activés, est d'éliminer les débris cellulaires ou les pathogènes *via* leurs fonctions phagocytaires très efficaces (Neumann et coll., 2009).

1.3.2 Les astrocytes

Les astrocytes sont présents dans l'ensemble du système nerveux central. Ils sont en moyenne cinq fois plus nombreux que les neurones et leur réseau couvre l'ensemble du cerveau (Bushong et coll., 2002 ; Hamby et Sofroniew, 2010). Ces cellules jouent un rôle crucial dans le fonctionnement normal du SNC notamment au niveau de la régulation du flux sanguin, de l'apport d'énergie et de métabolites aux neurones, de la fonction et la plasticité des synapses et de l'équilibre en ions et neurotransmetteurs extracellulaires (Nedergaard et coll., 2003 ; Seifert et coll., 2006 ; Pellerin et coll., 2007 ; Barres, 2008 ; Sofroniew, 2009). D'autre part, les astrocytes répondent à toutes les formes de lésion du SNC telles que les infections, les traumas, les ischémies et les maladies neurodégénératives selon un processus habituellement appelé « astrogliose » (Pekny et Nilsson, 2005 ; Sofroniew, 2009). Ce phénomène d'astrogliose constitue un élément essentiel de la régulation de l'inflammation et de la réparation tissulaire (Sofroniew, 2005 ; Sofroniew, 2009 ; Sofroniew et Vinters, 2010). Comme la réaction microgliale, la réaction astrocytaire se développe selon un processus graduel de modifications moléculaires et morphologiques conduisant à des phénotypes astrocytaires différents en fonction des signaux reçus (Sofroniew, 2009). D'un côté du spectre, les astrocytes peuvent produire des facteurs antioxydants comme le glutathion (Vargas et coll., 2008 ; Chen et coll., 2001), faciliter la réparation de la barrière hémato-encéphalique (BHE ; Bush et coll., 1999) ou internaliser des quantités potentiellement toxiques de glutamate (Rothstein et coll., 1996 ; Bush et coll.,

1999). D'un autre côté, ils peuvent exacerber l'inflammation en produisant des cytokines telles que CXCL10 ou CCL2 (Brambilla et coll., 2005 Brambilla et coll., 2009), produire des quantités neurotoxiques d'ERO (Hamby et coll., 2006) ou altérer la fonction de la BHE en produisant du VEGF (Argaw et coll., 2009). Cette fonction ambivalente contribue à alimenter le débat sur le rôle neuroprotecteur ou neurotoxique de ces cellules en condition pathologique.

2. Immunité adaptative

L'immunité adaptative, ou acquise, repose sur la mobilisation des cellules B, T et des cellules *natural killers T* (NKT). Ces cellules possèdent un large répertoire de récepteurs modifiés et sélectionnés au cours de la vie de l'individu leur permettant en théorie de reconnaître n'importe quel antigène rencontré. Après une première interaction avec l'antigène étranger, ces cellules peuvent persister chez l'hôte et constituent la mémoire immunitaire qui permet à l'organisme de répondre plus rapidement et efficacement à une nouvelle exposition de cet antigène étranger. Les lymphocytes T sont les effecteurs de la réponse cellulaire de cette immunité. Ils sont générés dans la moelle osseuse et maturent dans le thymus (Figure 8 ; Jenkinson et coll., 2006 ; Takahama, 2006 ; Hedrick, 2008). En revanche, les lymphocytes B, producteurs d'anticorps, sont les effecteurs de la réponse humorale et se développent et maturent dans la moelle osseuse.

Concernant l'immunité cellulaire, les lymphocytes T subissent des réarrangements génomiques indépendants de la présence d'antigène au sein du thymus. Ceux-ci permettent de créer des TCR (T Cell Receptor) fonctionnels exprimant soit les chaînes αβ ou γδ. Les cellules exprimant un TCR subissent ensuite un processus de sélection. D'une part une sélection positive, les lymphocytes possédant un TCR capable de se lier aux molécules du CMH reçoivent un signal de survie. D'autre part une sélection négative, les lymphocytes liant fortement les peptides du soi présentés par le CMH meurent par apoptose créant ainsi une tolérance vis-à-vis du soi. Les lymphocytes exprimant un TCR αβ se liant au CMH de classe I deviendront $CD8^+$ et sont appelés lymphocytes cytotoxiques (Tc). Ceux qui se lient au CMH de classe II deviendront $CD4^+$ et sont appelés auxiliaires ou *helpers* (Th) (Bonilla et Oettgen, 2010).

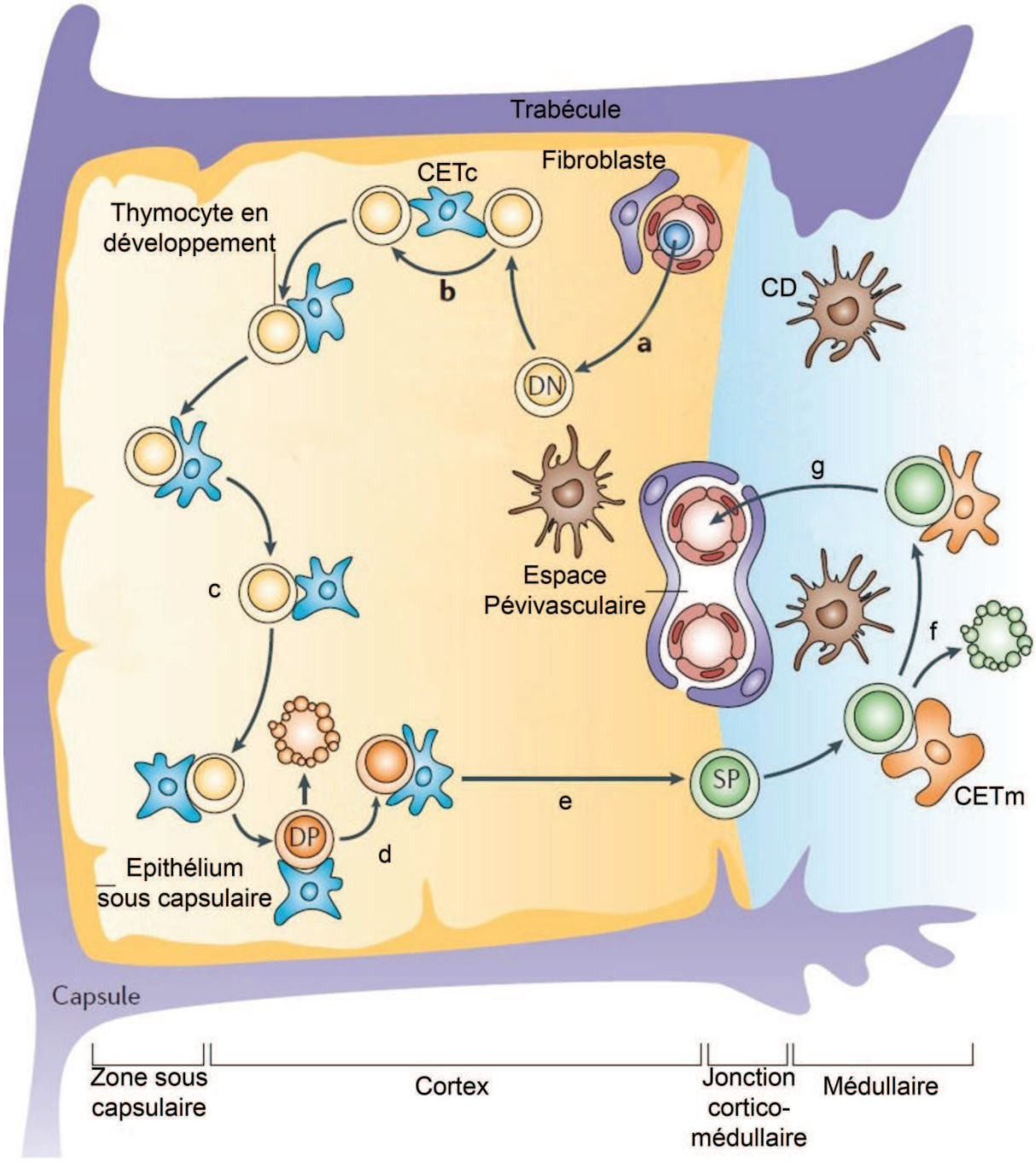


Figure 8 : Développement et sélection des thymocytes en lymphocytes T dans le thymus. a : Les progéniteurs T provenant de la moelle osseuse migrent dans le parenchyme du thymus à travers les vaisseaux enrichis au niveau de la jonction cortico-médullaire. b : Les thymocytes $CD4^-CD8^-$ double négatifs (DN), migrent vers la zone sous capsulaire et développent leur TCR au contact des cellules épithéliales thymiques corticales (CETc) pour devenir double positifs $CD4^+CD8^+$(DP). c : Les thymocytes DP interagissent avec les CETc ou les cellules dendritiques (CD) et subissent à la fois une sélection positive, ils survivent s'ils possèdent un TCR (T Cell Receptor) reconnaissant un antigène présenté par le CMH, et une sélection négative, ils subissent un processus de mort s'ils reconnaissent un antigène du soi. e : Les thymocytes DP sélectionnés se différencient en thymocytes simple positifs (SP) $CD4^+$ ou $CD8^+$. f : Au sein de la médullaire, les thymocytes SP interagissant avec les cellules épithéliales thymiques médullaires (CETm) subissent une seconde sélection éliminant les cellules autoréactives. Les cellules T régulatrices sont également produites dans la médullaire. g : Après un processus de maturation dans la médullaire d'approximativement 12 jours, les cellules T matures naïves retournent à la circulation générale. Adapté de Takahama, 2006.

Après s'être développés dans les deux organes lymphoïdes primaires, moelle osseuse et thymus, les lymphocytes circulent jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires, en particulier les ganglions lymphatiques et la rate (Figure 9). Les réponses immunes adaptatives sont en grande partie générées dans ces organes sous l'influence de pathogènes circulants *via* des interactions avec les cellules du système immunitaire inné, en particulier les cellules présentatrices d'antigène (CPA) telles que les cellules dendritiques (Figure 9). Ces lymphocytes peuvent alors émigrer de la rate et des ganglions lymphatiques vers les différents organes pour exercer leur activité effectrice (Bonilla et Oettgen, 2010).

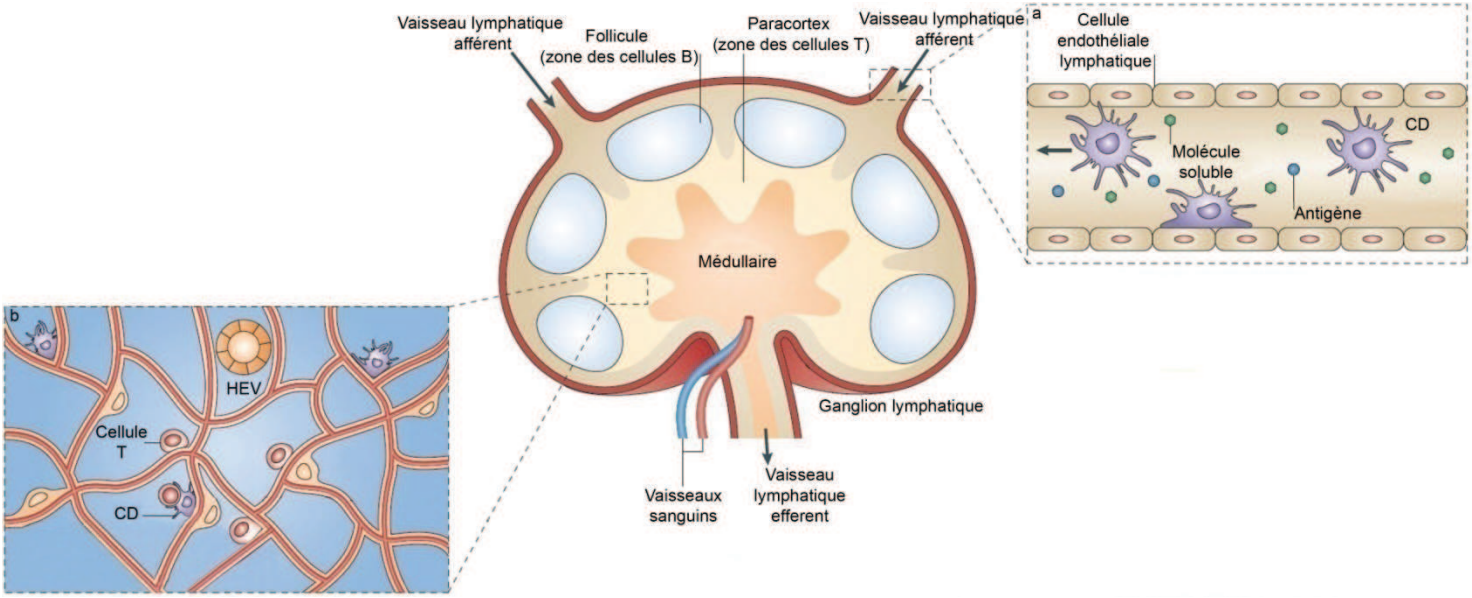


Figure 9 : Interaction entre les lymphocytes naïfs T et les cellules dendritiques au sein des ganglions lymphatiques. a : Les cellules présentatrices d'antigènes migrantes telles que les cellules dendritiques (CD) portant un antigène entrent par les vaisseaux lymphatiques afférents et migrent vers les zones cellulaires B et T. Les antigènes libres entrent également par cette voie mais sont ensuite présentés par les cellules présentatrices d'antigènes résidentes. b : Les lymphocytes pénètrent dans les ganglions lymphatiques par des vaisseaux sanguins spécialisés, les HEV (High Endothelial Venules). Au sein du paracortex, les lymphocytes T matures naïfs reconnaissent leur antigène présenté par les cellules dendritiques entraînant leur prolifération et leur différentiation en cellules T effectrices. Ces lymphocytes quittent ensuite le ganglion lymphatique par les vaisseaux lymphatiques efferents et rejoignent la circulation sanguine. Adapté de Turley et coll., 2010.

L'immunité humorale est médiée par les anticorps produits par les plasmocytes qui se développent à partir des lymphocytes B sous le contrôle entre autre des lymphocytes T et des cellules dendritiques (Bonilla et Oettgen, 2010).

Les lymphocytes $CD8^+$ peuvent être activés par la liaison de leur TCR avec des peptides présentés par le CMH de classe I exprimé par la quasi-totalité des cellules. Ces lymphocytes sont capables d'éliminer les cellules infectées par des pathogènes intracellulaires en entraînant notamment leur mort par apoptose (Bonilla et Oettgen, 2010).

Pour ce faire ils utilisent principalement la sécrétion de perforines et de granzymes d'une part, et l'expression d'autre part, de Fas ligand (FasL), une molécule membranaire ou sécrétée entraînant un signal de mort en se fixant à son récepteur Fas sur la cellule cible (Kagi et coll., 1994 ; Lowin et coll., 1994).

Les lymphocytes T $CD4^+$ sont activés suite à la liaison entre leur TCR et un antigène présenté généralement par le CMH de classe II des cellules présentatrices d'antigène telles que les cellules dendritiques ou les macrophages. Leurs fonctions sont multiples : en produisant différentes cytokines ils peuvent aider les lymphocytes B à générer des anticorps, inciter les macrophages à augmenter leur activité antimicrobienne ou encore recruter des granulocytes au site inflammatoire.

Quatre grandes voies de différenciation des lymphocytes $CD4^+$ naïfs ont été décrites. Elles dépendent des signaux que ces cellules reçoivent lors de leur interaction initiale avec un antigène présenté par les CPA. Ces voies de différentiation conduisent au développement de lymphocytes effecteurs de type Th1, Th2, Th17 ou Treg (lymphocyte T régulateur).

Dans un contexte d'expression d'IFNγ et d'IL-12, les lymphocytes se différencient en Th1. Ces lymphocytes Th1 sont impliqués dans la réponse aux pathogènes intracellulaires et dans l'induction de maladies auto-immunes (Mosmann et Coffman, 1989 ; Paul et Seder, 1994). Ils produisent essentiellement l'IL-2, l'IFNγ et la lymphotoxine α ce qui leur permet de moduler la réaction immunitaire innée. De plus, il a été montré que certains lymphocytes Th1 peuvent avoir une activité cytotoxique via l'expression de FasL (Hahn et Erb, 1999).

Les lymphocytes Th2 sont activés en présence d'IL-4 et d'IL-2. Ils interviennent dans la réponse immunitaire contre les parasites extracellulaires et produisent notamment de l'IL-4 et de l'IL-10 (Mosmann et Coffman, 1989 ; Paul et Seder, 1994). Ils sont impliqués dans les pathologies allergiques chroniques.

Les lymphocytes Th17 sont impliqués dans la réponse aux bactéries extracellulaires et aux champignons (Weaver et coll., 2006). Ils interviennent également dans de nombreuses maladies auto-immunes. Les lymphocytes naïfs se différencient en Th17 en présence de TGF-β et d'IL-21. Ils produisent notamment de l'IL-17 et de l'IL-21.

Enfin les lymphocytes T régulateurs se développent en présence de TGF-β et d'IL-2. Ils jouent un rôle crucial dans la régulation de la réponse immunitaire et le maintien de la tolérance au soi (Sakaguchi, 2004). L'augmentation de leur nombre ou de leur fonction pourrait ainsi s'avérer bénéfique dans un contexte auto-immun. Au niveau moléculaire, ils

peuvent agir par contact cellulaire ou en produisant des cytokines telles que le TGF-β ou l'IL-10 (Asseman et coll., 1999 ; Asseman et coll., 2003 ; Li et coll., 2006 ; Li et coll., 2007).

Ces deux versants de la réponse immunitaire sont essentiels en conditions physiologique et pathologique. Un nombre croissant d'études tant épidémiologiques, neuropathologiques que biochimiques chez l'homme et des expériences chez l'animal montrent des dérégulations de ces processus non autonomes dans la MP.

3. Neuroinflammation et maladie de Parkinson

Trois types d'études indiquent que les processus neuroinflammatoires peuvent contribuer au risque de développer la MP.

Dans les études sur échantillons sanguins, des concentrations élevées de la cytokine proinflammatoire Il-6 corrélaient avec une augmentation du risque de MP. Cependant en raison du nombre limité de participants ces données demandent confirmation (Chen et coll., 2008).

Plusieurs études génétiques ont analysé la relation entre un polymorphisme de gènes associés à la neuroinflammation et le risque de développer une maladie de Parkinson. Ainsi des polymorphismes dans le gène codant pour le TNFα, son promoteur ou le récepteur TNFR1 sont associés à une augmentation ou une diminution du risque de développer la pathologie (Kruger et coll., 2000 ; Wu et coll., 2007). Les études d'association portant sur l'IL-1α et l'IL-1β ont produit des résultats plus contrastés. En effet, les recherches de Wahner et coll. ont mis en évidence une augmentation du risque de développer la MP associée à des polymorphismes de ces gènes mais d'autres équipes n'ont pas reproduit ces résultats (Mattila et coll., 2002 ; Schulte et coll., 2002 ; Moller et coll., 2004 ; Wahner et coll., 2007).

En outre, certains polymorphismes n'augmenteraient le risque de développer la maladie que dans une sous-population de patients. Par exemple, un polymorphisme dans le promoteur du récepteur monocytaire CD14 augmenterait le risque chez les femmes mais pas chez les hommes (Lin et coll., 2006).

Enfin d'autres allèles, sans affecter directement le risque de MP, pourraient affecter l'âge de début de la maladie comme l'allèle 122 de l'IFNγ (Mizuta et coll., 2001).

Au cours des dernières années, l'utilisation de nouvelles techniques d'association pangénomique ont permis de mettre en évidence plusieurs variants associés à la MP dans le gène HLA (Hamza et coll., 2010 ; Hill-Burns et coll., 2011 ; International Parkinson Disease

Genomics et coll., 2011). Bien que les premières études d'association aient été effectuées sur un nombre restreint de patients, les dernières études sur le gène HLA comptaient plusieurs milliers de personnes et constituent donc un argument fort en faveur d'un rôle de l'inflammation et en particulier de la réponse immune adaptative dans la MP.

Les données épidémiologiques tendent également à démontrer un rôle des processus inflammatoires dans cette pathologie. L'implication des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), connus pour diminuer l'activité de la COX et les taux d'ERO (Dubois et coll., 1998), dans le risque de développer la MP a ainsi été l'objet de plusieurs études. Une étude prospective sur les utilisateurs chroniques d'AINS indiquait une diminution du risque de développer la MP chez ces personnes (Chen et coll., 2003 ; Bower et coll., 2006). Des données similaires ont été retrouvées dans une large cohorte de personnes utilisant l'ibuprofène, un inhibiteur non sélectif de la COX-2 (Chen et coll., 2005 ; Stone et coll., 2009). Cependant d'autres études n'ont pas répliqué ces résultats ou ont montré un bénéfice chez les hommes mais un risque augmenté chez les femmes (Hernan et coll., 2006 ; Ton et coll., 2006 ; Hancock et coll., 2007). Récemment, une méta-analyse réalisée sur des études publiées entre 1966 et 2008 indiquait que globalement les AINS ne modifiaient pas le risque développer une MP (Samii et coll., 2009). Toutefois, une analyse restreinte à l'ibuprofène confirmait un rôle protecteur partiel de ce médicament (Samii et coll., 2009). Gao et coll., ont également retrouvé cet effet spécifique de l'ibuprofène lors d'une large étude prospective (Gao et coll., 2011).

Au total ces données suggèrent un rôle pathogénique de l'inflammation dans la MP sans toutefois en apporter la preuve formelle. Néanmoins, des données *post-mortem* obtenues sur le cerveau des patients ainsi que des études chez l'animal ou en culture cellulaire viennent conforter l'hypothèse d'un rôle des réponses immunes à la neurodégénérescence dans cette pathologie.

3.1. Immunité innée dans la maladie de Parkinson

Plusieurs études ont rapporté l'existence d'une réaction microgliale dans la substance noire chez les patients atteints de MP et dans de nombreux modèles animaux de la maladie.

Associée à cette réaction microgliale, on note par ailleurs une augmentation d'expression de certains médiateurs inflammatoires classiquement exprimés par les cellules microgliales activées tels que le TNF-α, l'IL-6 et l'IL-1β (Boka et coll., 1994 ; Mogi et coll., 1994a ; Hunot et coll., 1999 ; Imamura et coll., 2003). Ces caractéristiques neuroinflammatoires ont également été observée chez des patients intoxiqués accidentellement avec le MPTP qui, non seulement, ont développé une maladie qui progressait malgré l'absence du facteur étiologique et qui de plus, présentaient à l'autopsie de nombreuses cellules microgliales activées dans la SNpc, suggérant un processus neurodégénératif toujours actif. Cette observation surprenante a été récapitulée chez le singe intoxiqué par le MPTP où là encore des microglies activées ont été détectées parfois 14 ans après l'initiation de la maladie (McGeer et coll., 2003 ; Barcia et coll., 2004 ; Kanaan et coll., 2008 ; Vazquez-Claverie et coll., 2009). Par ailleurs, de nombreux modèles murins de MP présentent une activation microgliale. Ainsi, chez des souris intoxiquées par le MPTP on a pu observer une augmentation rapide du nombre de microglies activées (Kohutnicka et coll., 1998 ; Kurkowska-Jastrzebska et coll., 1999b ; Kurkowska-Jastrzebska et coll., 1999a). Quarante huit heures après injection de 6-OHDA dans le striatum de rat, une activation microgliale et une production d'ERO par la NADPH oxydase ont également été rapportées (Rodriguez-Pallares et coll., 2007). Cette activation microgliale a aussi été reproduite chez des rats traités à la roténone (Sherer et coll., 2003). Enfin, des souris double mutantes pour l'α-synucléine présentaient une augmentation du nombre de microglies activées et d'expression de facteurs pro-inflammatoires (Su et coll., 2009).

Afin de définir le rôle de cette réaction microgliale dans la pathogénèse de la MP, plusieurs équipes ont cherché à réprimer cette activation cellulaire ou à inhiber la composante toxique de cette réponse à l'aide d'approches génétiques et pharmacologiques Ainsi l'utilisation de minocycline et de pioglitazone a permis de montrer le rôle délétère ce ces cellules vis-à-vis des NDA dans différents modèles de MP (Du et coll., 2001 ; He et coll., 2001 ; Breidert et coll., 2002 ; Wu et coll., 2002 ; Swanson et coll., 2011). Autre exemple, des souris déficientes pour la NADPH oxydase ou la NOSi montrent une résistance vis à vis des effets toxiques du MPTP suggérant que la fonction inflammatoire des microglies activées joue vraisemblablement un rôle pathogénique (Liberatore et coll., 1999 ; Wu et coll., 2003).

Une autre série d'études s'intéressant aux mécanismes d'activation des cellules microgliales par la souffrance et/ou la mort des NDA renforce l'hypothèse selon laquelle l'activation microgliale joue un rôle délétère dans la MP. En effet, des expériences de culture cellulaire ont montré que plusieurs molécules produites par les neurones dopaminergiques au cours de la pathologie peuvent activer la microglie. Ainsi l'α-synucléine nitrée, oxydée ou agrégée stimulerait les microglies engendrant une inflammation et un stress oxydant (Ischiropoulos et Beckman, 2003 ; Croisier et coll., 2005). De plus, la phagocytose par les microglies de l'α-synucléine extracellulaire agrégée favoriserait également leur activation et la mort des neurones (Zhang et coll., 2005b). La neuromélanine et la MMP-3 libérées par les neurones dopaminergiques en conditions de stress conduisent également à l'activation microgliale (Wilms et coll., 2003 ; Kim et coll., 2005b). En outre, des souris déficientes pour la MMP-3 ne présentaient pas d'activation microgliale et une moindre dégénérescence dopaminergique après intoxication par le MPTP (Kim et coll., 2007).

Au total, l'ensemble de ces données suggère un rôle de la réponse immunitaire innée, médiée notamment par les cellules microgliales, dans la mort neuronale au cours de la MP. Plus récemment, un rôle du système immunitaire adaptatif dans ces processus a également été évoqué et sera abordé dans le chapitre suivant.

3.2. Immunité adaptative dans la maladie de Parkinson

Outre les études *post-mortem* sur tissu humain décrivant la présence de lymphocytes dans la SN des sujets parkinsoniens, des modifications inflammatoires périphériques ont également été observées chez ces patients. Ainsi, des anticorps reconnaissant différents composants des neurones dopaminergiques ont été détectés dans le sérum et le LCR de quelques patients (McRae-Degueurce et coll., 1988 ; Rowe et coll., 1998). Une diminution de lymphocytes T naïfs $CD4^+/CD45RA^+$ et une augmentation du nombre de lymphocytes activés $CD4^+/CD45RO^+$, ont été mises en évidence dans le sérum des patients suggérant une activation périphérique des cellules T (Bas et coll., 2001). Une augmentation de lymphocytes T régulateurs révélée par les marqueurs FOXP3 et CD25 a également été détectée dans le sérum de malades bien que Baba et coll. aient observé une diminution du nombre de ces cellules, une diminution de la quantité de $CD4^+$ et une augmentation de la quantité de $CD8^+$ circulantes (Chiba et coll., 1995 ; Bas et coll., 2001 ; Baba et coll., 2005 ; Rosenkranz et coll.,

2007). En outre, le ratio de lymphocytes T positifs pour l'IFNγ par rapport à ceux positifs pour l'IL-4 était augmenté, suggérant un changement phénotypique de type proinflammatoire de type Th1 et/ou Tc1. Par ailleurs, une augmentation de lymphocytes $CD4^{+bright}/CD8^{+dull}$ a été observée dans le sérum des patients (Hisanaga et coll., 2001). Le taux de ces lymphocytes augmente en général suite à une infection virale, suggérant qu'une telle infection pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse ou que les patients sont plus sensibles aux infections en raison d'une modification de leur statut immunitaire. Bien qu'intéressantes, ces données obtenues à partir d'échantillons sanguins restent toutefois difficilement interprétables sagissant notamment du rôle physiopathologique de la réponse immune adaptative au niveau central. Toutefois, plusieurs études récentes ont permis d'obtenir les premiers éléments suggérant un lien entre les processus immunitaires adaptatifs et neurodégénératifs et sont par conséquent à l'origine de nouvelles hypothèses physiopathologiques qui font l'objet d'un intérêt croissant.

Ces processus ont fait l'objet d'études dans les modèles expérimentaux de MP. Une première étude de Kurkowska-Jastrzebska et coll. en 1999, puis confirmée par Brochard et coll. en 2009, a mis en évidence une infiltration de lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ dans la substance noire de souris après intoxication par le MPTP (Kurkowska-Jastrzebska et coll., 1999b ; Brochard et coll., 2009). De manière intéressante, l'utilisation de souris immunodéficientes SCID (*severe combined immunodeficiency*), $rag1^{-/-}$ et $TCR\beta^{-/-}$ a montré que les lymphocytes T jouaient un rôle délétère dans le processus de dégénérescence dopaminergique (Benner et coll., 2008 ; Brochard et coll., 2009). En outre, Brochard et coll. ont précisé que les lymphocytes $CD4^+$ constituaient la population toxique *via* un mécanisme impliquant la signalisation FasL (Brochard et coll., 2009).

Un lien entre cette réponse immunitaire adaptative et les mécanismes physiopathologiques à l'œuvre dans la MP a été proposé. Ainsi, selon l'hypothèse formulée par le groupe d'Howard Gendelman, la modification oxydative de l'α-synucléine (nitration de résidus tyrosines dans la partie C terminale de la protéine) augmente l'immunogénicité de cette protéine qui est alors capable d'échapper à la tolérance immunitaire (Hodara et coll., 2004 ; Ohmori et Kanayama, 2005 ; Uversky et coll., 2005). Ces formes pathologiques d'α-synucléine semblent être extrêmement efficaces pour induire une réponse immunitaire adapatative comme l'ont montré des protocoles d'immunisation chez la souris (Benner et coll., 2008). La réponse immunitaire adaptative dirigée contre l'α-synucléine nitrée, mais pas

l'α-synucléine sauvage, est caractérisée par une réponse de type Th1 et Th17 proinflammatoire qui, transférée à des souris hôte, exacerbe la lésion nigro-striée provoquée par le MPTP (Reynolds et coll., 2010). Ainsi, un lien direct entre la réponse immunitaire innée, notamment supportée par les cellules microgliales, et la réponse immunitaire adaptative peut-être établi. Les cellules microgliales activées étant en partie à l'origine du stress oxydatif qui peut conduire à la formation de néo-épitopes pathologiques.

Au regard du rôle pathogénique de la réponse immunitaire adaptative à la neurodégénérescence, des stratégies visant à moduler cette réponse pourraient avoir un intérêt thérapeutique. Et de fait, cette stratégie a été testée par le groupe de Gendelman et montre que, chez des souris intoxiquées par le MPTP, le transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques du copolymère I, confère une protection significative contre la mort neuronale (Benner et coll., 2004). Par ailleurs, Laurie et coll., en utilisant des injections de lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ de souris immunisées avec le copolymère I, ont montré que les cellules $CD4^+$ jouaient le rôle protecteur au niveau dopaminergique (Laurie et coll., 2007). Ces résultats suggéraient un rôle des lymphocytes T régulateurs. Reynolds et coll. ont vérifié cette hypothèse en injectant des lymphocytes T régulateurs aux souris avant intoxication par le MPTP. Ce transfert de lymphocytes entrainait une très forte protection au niveau neuronal (Reynolds et coll., 2007).

L'ensemble de ces données met en évidence les multiples facettes de l'immunité adaptative potentiellement protectrice mais également fortement délétère selon les conditions d'activation lymphocytaire.

Au total, l'ensemble de ces données suggère un rôle pathogénique de la réponse immune adaptative à la neurodégénérescence dans la MP. Cette réponse immunitaire pourrait donc constituer une cible thérapeutique potentiellement intéressante. Deux stratégies principales peuvent être évoquées. D'une part, des stratégies visant à moduler ou antagoniser cette réponse délétère (par exemple *via* l'utilisation de copolymère I comme présenté précédemment). D'autre part, des stratégies permettant d'empêcher l'infiltration cérébrale de ces populations lymphocytaires. C'est notamment sur cette dernière stratégie qu'un effort important a été apporté dans le traitement de la sclérose en plaque, une maladie du système nerveux central dont on pense qu'elle est d'origine auto-immune et qui est caractérisée par d'importants infiltrats lymphocytaires cérébraux.

Ainsi, le blocage de cette infiltration par un anticorps anti-intégrine α_4 permettant aux cellules immunitaires de passer de la circulation sanguine au cerveau, a permis de ralentir l'évolution de la maladie dans des modèles animaux et chez l'homme (Engelhardt et Kappos, 2008). La compréhension des mécanismes moléculaires qui sous-tendent le processus d'infiltration cérébrale des lymphocytes constitue donc une voie de recherche prometteuse.

IV. Mécanismes d'infiltration cérébrale des leucocytes

Les leucocytes regroupent plusieurs populations cellulaires du système immunitaire inné dont les granulocytes, les monocytes, les macrophages ainsi que les cellules du système immunitaire adaptatif. Ces cellules peuvent entrer dans le parenchyme cérébral à l'état physiologique pour effectuer une surveillance immunitaire mais également lors de lésions aigues ou de pathologies inflammatoires chroniques. Nous allons maintenant présenter les différentes voies d'entrée des leucocytes dans le système nerveux central, le processus de passage des leucocytes à travers la barrière hémato-encéphalique et enfin les interactions moléculaires permettant cette infiltration cérébrale.

1. Voies d'entrée principales

Afin d'obtenir une vision cohérente de l'entrée des leucocytes dans le système nerveux central, il est important de rappeler l'anatomie vasculaire de cet organe. Le SNC est protégé par un squelette osseux, le crâne, et entouré des méninges, constitués d'une triple membrane, la plus externe étant la dure-mère, puis l'arachnoïde et la plus interne, la pie-mère (Figure 10). Le système artériel suit la surface du cerveau dans l'espace sous-arachnoïdien contenant le LCR et situé entre l'arachnoïde et la pie-mère. Ces vaisseaux artériels peuvent pénétrer dans le parenchyme cérébral (Figure 10). Ils sont alors entourés des espaces périvasculaires de Virchow-Robin assurant une continuité avec l'espace sous-arachnoïdien et le LCR (Figure 10). Chez l'homme, ce LCR est produit dans les plexus choroïdes situés dans les quatre ventricules cérébraux. Le LCR circule des ventricules à l'espace sous-arachnoïdien puis est résorbé dans la circulation générale à travers les villosités arachnoïdiennes qui s'étendent dans le sinus veineux de la dure-mère (Figure 8). Le système artériel cérébral est également connecté aux veines superficielles corticales et aux veines cérébrales profondes permettent le retour du sang à la circulation générale. Il est

généralement admis que le cerveau est un organe dans lequel les réactions immunitaires sont bien plus contrôlées qu'en périphérie. Ce contrôle est réalisé à plusieurs niveaux. Au niveau anatomique la barrière sang-LCR et la BHE régulent les capacités d'échange entre le système immunitaire et le SNC. On distingue trois zones principales d'entrée des leucocytes dans le cerveau : *i)* du sang au LCR au niveau des plexus choroïdes, *ii)* du sang à l'espace sous-arachnoïdien dans les méninges, *iii)* du sang au parenchyme cérébral à travers la barrière hémato-encéphalique (Figure 8 ; Ransohoff et coll., 2003 ; Cipolla, 2009).

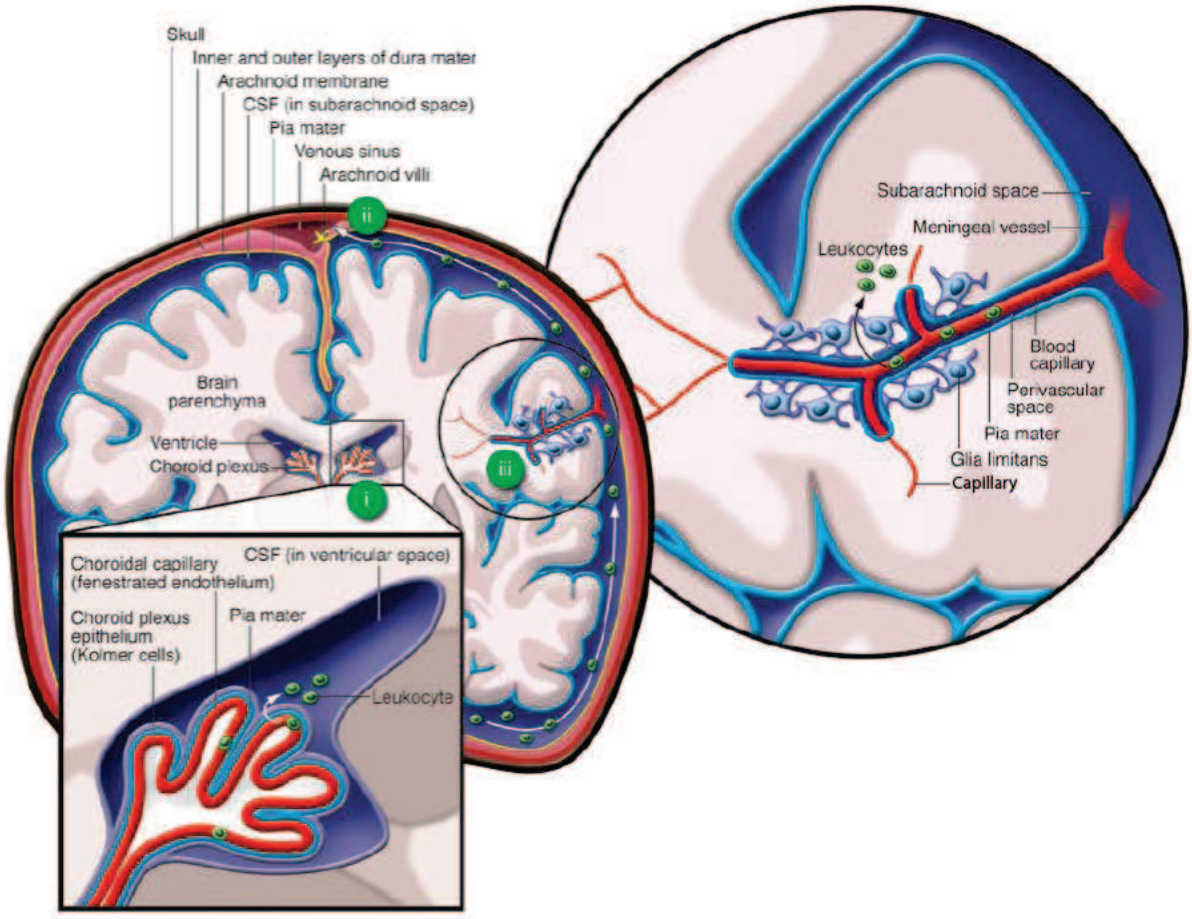


Figure 10 : Voies d'entrée des leucocytes dans le parenchyme cérébral. *i)* Plexus choroïdes, *ii)* Voie méningée, *iii)* Barrière hémato-encéphalique. D'après Wilson et coll., 2010.

1.1. Plexus choroïdes

Cette première voie d'entrée des leucocytes dans le cerveau est soumise aux contraintes de la barrière sang-LCR. Le fait que le LCR contienne près de 3000 leucocytes par millilitre suggère qu'elle constitue une voie d'entrée importante. Lors de ce processus d'entrée dans le cerveau, les leucocytes passent à travers l'endothélium fenestré du stroma

des plexus choroïdes puis migrent dans le stroma jusqu'aux villosités épithéliales non fenestrées et traversent cet épithélium pour passer dans le LCR ventriculaire (Ransohoff et coll., 2003). Cette voie semble être utilisée par les lymphocytes en condition physiologique pour surveiller le SNC (Carrithers et coll., 2002). De façon intéressant les leucocytes dans le LCR humain présentent un phénotype différent des leucocytes sanguins pointant vers un mécanisme d'extravasation spécifique pour certaines populations leucocytaires. En effet, les neutrophiles qui constituent la population majoritaire de leucocytes sanguins sont rarement retrouvés dans le LCR. Au contraire les lymphocytes T constituent 80% des cellules du LCR alors qu'ils représentent au maximum 45% des leucocytes sanguins (Svenningsson et coll., 1995).

1.2. Les méninges

En périphérie du parenchyme cérébral les leucocytes peuvent entrer dans le LCR au niveau des vaisseaux de la pie-mère et se retrouvent dans l'espace sous-arachnoïdien. De là ils doivent passer une barrière dite *glia limitans superficialis*, composée des podocytes ou des corps cellulaires astrocytaires pour entrer dans le parenchyme cérébral (Figure 11 ; Owens et coll., 2008).

Tout comme la voie choroïdienne, la voie méningée jouerait un rôle majeur dans la surveillance immunitaire du cerveau en condition physiologique. Il a ainsi été proposé que les lymphocytes T $CD4^+$ mémoire cherchent des antigènes présentés par les nombreux macrophages présents dans l'espace sous-arachnoïdien (McMenamin, 1999 ; Engelhardt et Ransohoff, 2005).

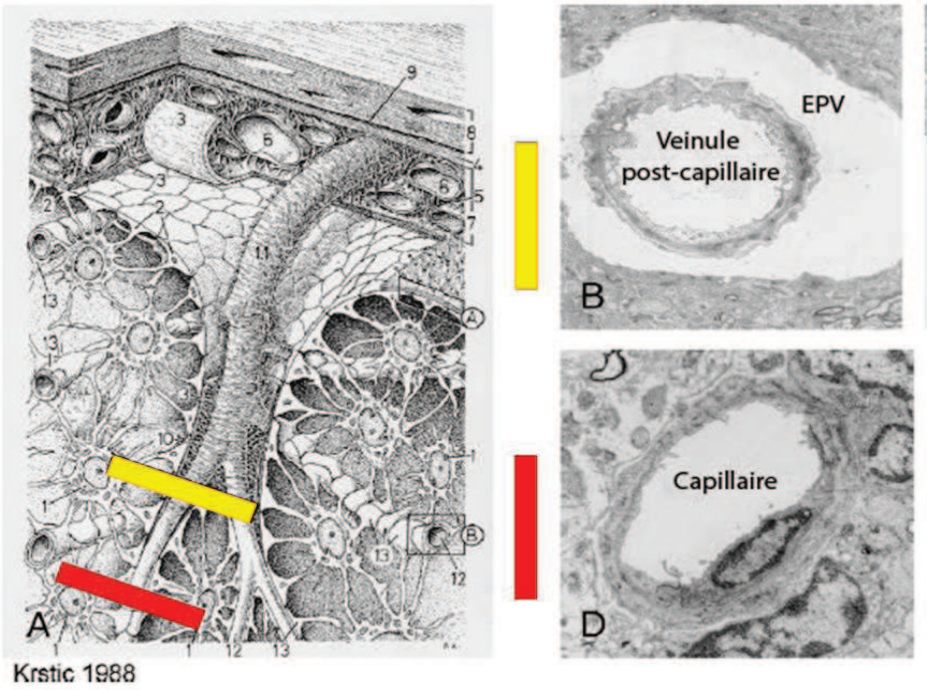


Figure 11 : Architecture des vaisseaux sanguins pénétrant dans le paranchyme cérébral. A : Les vaisseaux superficiels situés dans l'espace sous-arachnoïdien (6) pénètrent dans le parenchyme. Les leucocytes pénètrent dans le parenchyme au niveau des veinules post-capillaires de différents diamètres (jaune et entre les zones jaune et rouge). Les veinules post-capillaires et les capillaires sont séparés du neuropile par 2 membranes basales et la glia limitans formée par les pieds astrocytaires. B : Les veinules post-capillaires sont entourées d'un espace périvasculaire de Virchow-Robin. C : Les solutés pénètrent préférentiellement au niveau des capillaires qui ne possèdent pas d'expace périvasculaire entre la membrane basale des cellules endothéliales vasculaires et la *glia limitans perivascularis* (rouge). EPV : Espace périvasculaire de Virchow-Robin. Adapté d'Owens et coll., 2008.

1.3. La barrière hémato-encéphalique

Les vaisseaux sanguins présents dans l'espace sous arachnoïdien pénètrent dans le parenchyme cérébral formant des vaisseaux intermédiaires entre l'espace sous arachnoïdien et les vaisseaux cérébraux (Figure 11). Nous utiliserons le terme de barrière hémato-encéphalique pour regrouper d'une part les capillaires, de diamètre inférieur à 6 µm au niveau desquels a lieu la diffusion de solutés, et d'autre part les veinules post-capillaires, de diamètre inférieur à 50 µm au niveau desquelles les leucocytes entrent dans le parenchyme cérébral (Zhang, 1999 ; Bechmann et coll., 2007). La distinction entre ces deux types des vaisseaux est parfois difficile car il existe une continuité entre ces deux types de vaisseaux avec par conséquent l'existence de zones intermédiaires (Owens et coll., 2008). La BHE, au niveau des veinules post-capillaires, est constituée de trois compartiments distincts : la paroi vasculaire, l'espace périvasculaire de Virchow-Robin et la *glia limitans perivascularis* (Figure 11). La paroi vasculaire constitue la première barrière à franchir par les leucocytes. Elle est formée de cellules endothéliales possédant une membrane basale et liées par des jonctions

serrées formant ainsi un endothélium non fenestré empêchant la diffusion passive de molécules. L'espace périvasculaire, situé entre la membrane basale de la paroi vasculaire et la membrane basale du neuropile contient des cellules périvasculaires qui peuvent être des CPA et des péricytes. Enfin, la *glia limitans perivascularis* formée par les pieds astrocytaires et sa membrane basale constituent une seconde barrière entre le sang et le parenchyme cérébral (Owens et coll., 2008).

Au niveau du mésencéphale ventral, la voie d'entrée la plus probable des leucocytes semble être la BHE étant donné la présence de nombreux vaisseaux sanguins et l'éloignement des ventricules et de la pie-mère.

Nous pensons donc que les lymphocytes parenchymateux observés dans la SN de patients et de souris intoxiquées par le MPTP ont passé cette BHE. Par conséquent, il est important de comprendre les différentes étapes permettant l'entrée des lymphocytes dans le parenchyme cérébral à travers cette BHE.

2. Cascade moléculaire conduisant à la diapédèse dans le système nerveux central

Le passage des cellules endothéliales en tant que tel, la diapédèse, est précédé de plusieurs étapes faisant intervenir des signaux moléculaires permettant aux leucocytes de détecter leur site d'entrée et de ralentir leur vitesse dans le flux sanguin.

2.1. Un processus multi-étapes

Quatre étapes majeures mettant en jeu différentes molécules ont été mises en évidence (Figure 12).

Nos connaissances sur le processus d'infiltration leucocytaire dans le SNC ont beaucoup bénéficié des nombreuses études réalisées chez les patients atteints de SEP (sclérose en plaque) et dans *l'experimental autoimmune encephalomyelitis* (EAE), son modèle animal. Ces études ont notamment permis de montrer que deux grandes familles de molécules sont impliquées dans l'infiltration cérébrale des leucocytes, à savoir les molécules d'adhésion et les chimiokines.

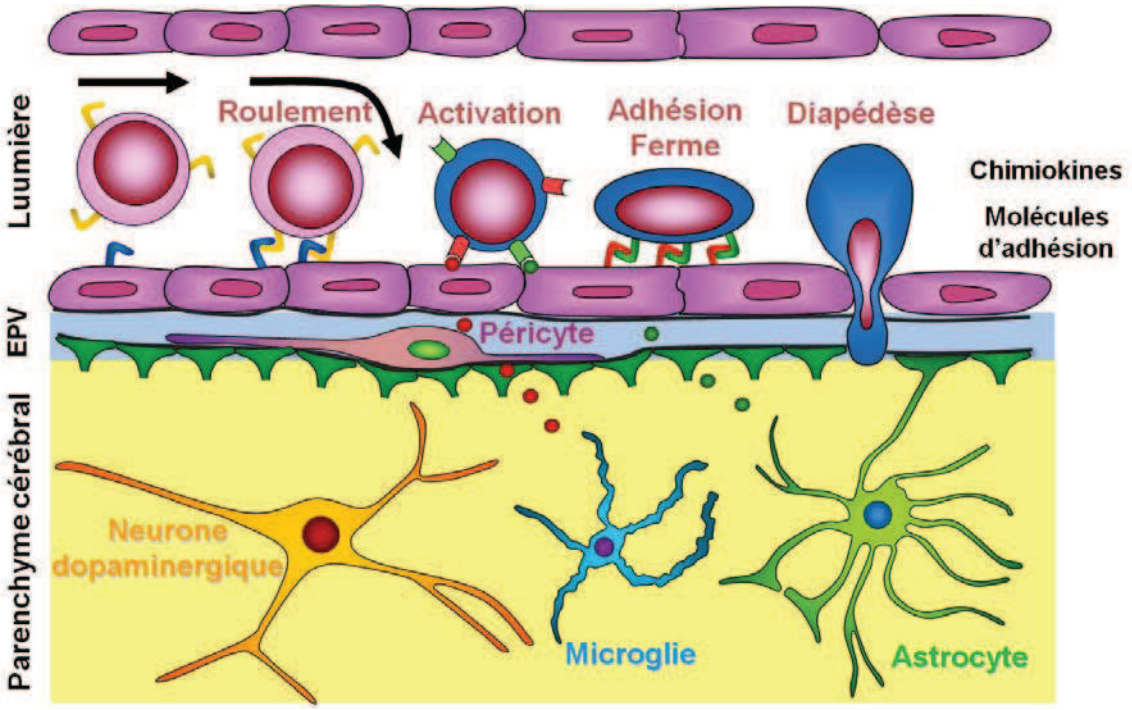


Figure 12 : L'inflammation cérébrale induit la production de cytokines dont des chimiokines (points rouges et verts) par les cellules parenchymateuses et endothéliales. Les signaux inflammatoires induisent l'expression de sélectines (crochets bleus) et de CAMs, en particulier ICAM-1 et VCAM-1 par les cellules endothéliales. Les chimiokines sont produites par, ou transloquées à travers, les cellules endothéliales et présentées dans la lumière du vaisseau. Les leucocytes exprimant les récepteurs au ligands correspondants effectuent une cascade d'adhésion en 3 étapes : 1) le roulement faisant intervenir des sélectines 2) l'activation *via* des chimiokines 3) l'adhésion forte grâce à l'interaction de CAMs (crochets rouges) présentées par l'endothélium et d'intégrines à la surface des leucocytes (crochets verts). Ils passent alors à travers la paroi vasculaire lors d'un processus appelé diapédèse. Après être passés à travers la membrane basale endothéliale les leucocytes atteignent l'espace périvasculaire. Des signaux d'activation supplémentaires probablement fournis par les macrophages périvasculaires ou les péricytes leurs permettent de passer la membrane basale du parenchyme et la *glia limitans perivascularis* (Engelhardt et Ransohoff, 2005 ; Luster et coll., 2005 ; Ley et coll., 2007 ; Owens et coll., 2008). EPV : Espace périvasculaire de Virchow-Robin.

Des signatures moléculaires locales, constituées par une combinaison de chimiokines et de molécules d'adhésion, favorisent ainsi l'extravasation des leucocytes exprimant les ligands aux récepteurs correspondants au niveau du site inflammatoire (Owens et coll., 2008). Ces deux familles de molécules ainsi que leur rôle dans le phénomène d'infiltration leucocytaire sont présentés dans le chapitre suivant.

2.2. Implication des molécules d'adhésion

2.2.1. Description de la famille des molécules d'adhésion et de leurs rôles physiologiques

Les molécules d'adhésion sont des protéines membranaires impliquées dans l'adhésion de cellules entre elles ou avec la matrice extracellulaire. Elles sont classées en quatre groupes dans lesquels on distingue les cadhérines, les intégrines, les *cell adhesion molecules* (CAMs) et les sélectines.

Les cadhérines jouent des rôles majeurs dans le développement embryonnaire, la formation de feuillets épithéliaux ou endothéliaux et le développement axonal dans le SNC (Takeichi, 1993). Ces molécules sont généralement responsables d'interactions homophiliques entre cellules adjacentes (Takeichi, 1995 ; Yap et coll., 1997).

Les intégrines jouent un rôle dans de nombreux processus biologiques tels que l'organogenèse, la thrombose ou encore la migration leucocytaire (Hynes, 1992 ; Springer, 1994 ; Shattil et Ginsberg, 1997). Ces protéines sont composées de deux sous-unités, α et β. Les intégrines constituent une famille de plus de vingt hétérodimères différents. Elles sont capables de lier certaines molécules de la matrice extracellulaire ainsi que des CAMs. Celles jouant un rôle important dans la migration leucocytaire sont les membres de la famille β_2 [notamment LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$)] et les deux intégrines α_4, VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) et $\alpha_4\beta_7$.

Les CAMs appartiennent à la famille des immunoglobulines. Elles jouent un rôle essentiel dans le développement du système nerveux, le développement embryonnaire et la réponse immunitaire (Springer, 1990 ; Tessier-Lavigne et Goodman, 1996). Les CAMs les mieux caractérisées pour leur rôle dans la migration des leucocytes sont les *intercellular cell adhesion molecules* (ICAMs) qui lient les intégrines β_2, la *vascular cell adhesion molecule* (VCAM-1) qui est le ligand majoritaire pour l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ et la *mucosal addressin cell adhesion molecule* (MAdCAM-1) qui intéragit avec VLA-4 (Johnston et coll., 1996 ; Artis et coll., 2000 ; Constantin et coll., 2000 ; Rivera-Nieves et coll., 2005).

Les sélectines, quant à elles, comportent trois membres : les E-sélectines (endothéliales), les L-sélectines (leucocytaires) et les P-sélectines (plaquettaires et endothéliales). Elles se lient à des glycoprotéines de surface telles que le *P-selectin glycoprotein ligand 1* (PSGL-1). L'adhésion médiée par les sélectines ne dure que quelques secondes. La L-sélectine est exprimée par la majorité des leucocytes circulants et constitue le

récepteur clé initiant la capture des cellules immunitaires au niveau des organes lymphoïdes et des tissus inflammés ou lésés (Rosen, 2004). L'expression des P- et E-sélectines par les cellules endothéliales est essentiellement inductible et ces protéines sont importantes dans le recrutement de la majorité des leucocytes dont les lymphocytes T aux sites d'inflammation (McEver, 2002). Les propriétés adhésives des sélectines et de leurs ligands peuvent notamment être régulées par leur distribution membranaire et leur association avec le cytosquelette d'actine (Hafezi-Moghadam et coll., 2001).

2.2.2 Fonctions des molécules d'adhésion dans les pathologies inflammatoires

Le blocage de molécules d'adhésion par des anticorps monoclonaux a déjà été testé en clinique pour plusieurs pathologies inflammatoires périphériques ou centrales. En effet, le blocage de l'intégrine α_L qui, avec l'intégrine β_2, forme le complexe LFA-1, s'est révélé prometteur en clinique avec l'utilisation de l'Odulimomab pour le rejet des greffes et l'Efaluzimab pour le psoriasis (Ulbrich et coll., 2003). De même le Natalizumbab, un anticorps bloquant l'intégrine α_4 s'est avéré très efficace en clinique. Il a notamment permis d'inhiber l'infiltration cérébrale de cellules Th1 dans la SEP et la maladie de Crohn en bloquant respectivement l'interaction $\alpha_4\beta_1$-VCAM1 et la liaison $\alpha_4\beta_7$-MADCAM1 (Ghosh et coll., 2003 ; Miller et coll., 2003). Cependant, le blocage du trafic leucocytaire médié par l'intégrine α_4 a conduit à l'augmentation de susceptibilité aux infections chez certains patients atteints de SEP. En effet près d'un patient sur 1000 développait une leuco-encéphalopathie multifocale progressive, une maladie potentiellement mortelle du SNC (Yousry et coll., 2006).

Ces nouveaux traitements ciblant les molécules d'adhésion impliquées dans l'infiltration leucocytaire sont donc très encourageants. Néanmoins une meilleure connaissance des sous-populations leucocytaires infiltrant le cerveau dans chaque pathologie et des mécanismes moléculaires impliqués s'avère indispensable. De plus une meilleure compréhension des pathologies opportunistes contrôlées par ces cellules sera également importante pour prévenir l'apparition d'effets secondaires graves.

Dans un objectif thérapeutique il peut également être intéressant de cibler les molécules de la famille des chimiokines dont beaucoup sont impliquées dans le recrutement de leucocytes aux sites inflammatoires.

2.3. Implication des chimiokines

2.3.1. Description de la famille des chimiokines

Les chimiokines sont de petites molécules de 7 à 10 kDa appartenant à la famille des cytokines et comprenant approximativement cinquante ligands (Laing et Secombes, 2004) et vingt récepteurs (Murphy, 2002). Elles ont été séparées en quatre groupes selon la position de quatre cystéines situées dans leur région N-terminale. Les deux groupes les plus larges sont les CXC et les CC. Les deux premières cystéines du groupe CXC sont séparées par un acide aminé alors que celles du groupe CC sont adjacentes (Rossi et Zlotnik, 2000 ; Fernandez et Lolis, 2002). Les deux derniers groupes contiennent d'une part les chimiokines C ne possédant que la première et la quatrième cystéine, et d'autre part le groupe CX_3C dans lequel les deux premières cystéines sont séparées par trois acides aminés (Rossi et Zlotnik, 2000). Les récepteurs aux chimiokines sont nommés en fonction du groupe de ligands auquel ils se lient préférentiellement (Figure 13). Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). En général les RCPGs peuvent lier de nombreux types de protéines G cependant la majorité des réponses induites par les chimiokines sont inhibées par la toxine pertussique, indiquant un effet essentiellement médié par les protéines $G_{\alpha i}$ (Murphy, 1996 ; Neves et coll., 2002).

Les chimiokines sont également classées en chimiokines proinflammatoires ou homéostatiques selon leur fonction préférentielle dans des processus infectieux et inflammatoires ou en condition physiologique.

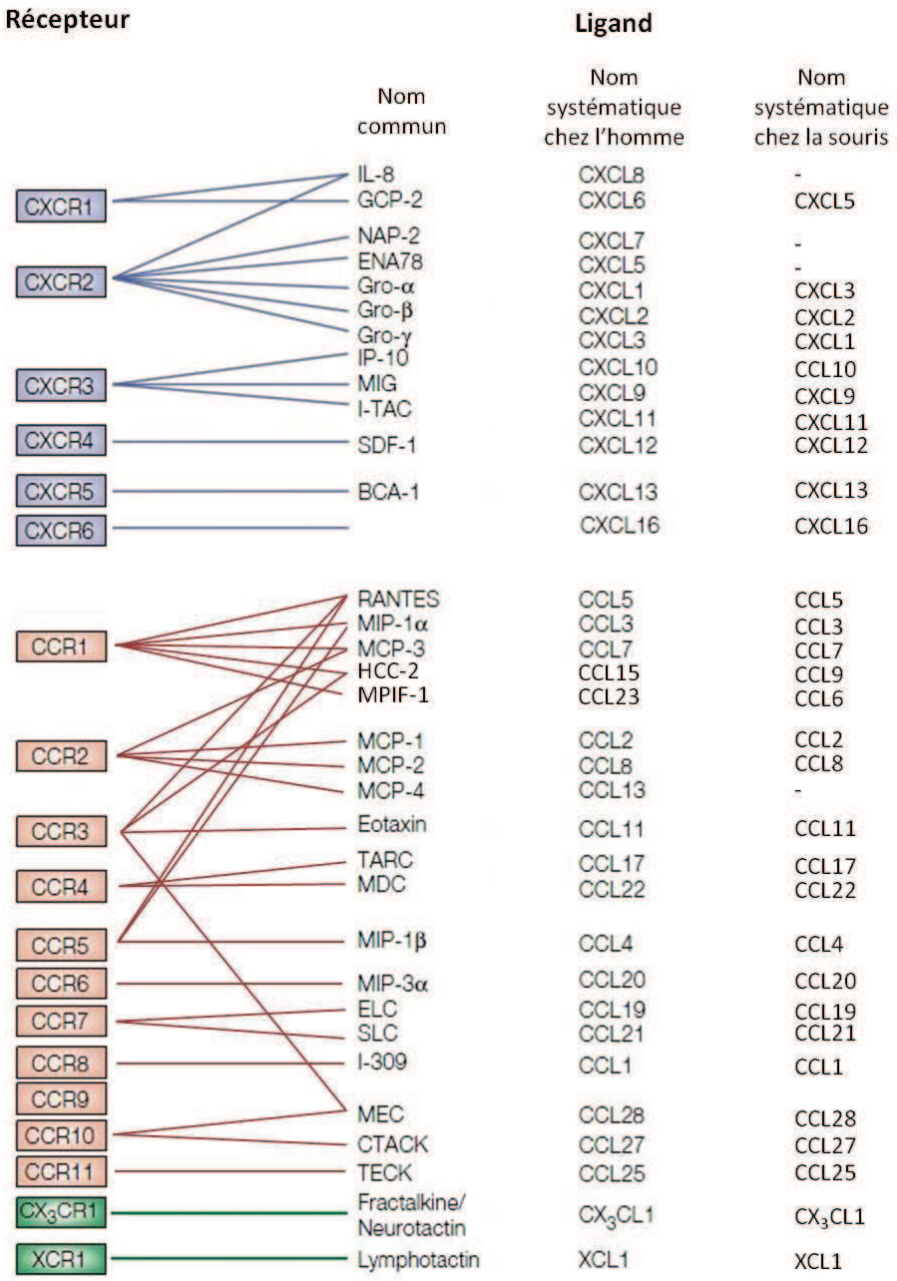


Figure 13 : Représentation de la famille des chimiokines et de leurs récepteurs chez l'homme et la souris. Les chimiokines peuvent en général se lier à plusieurs récepteurs et un même récepteur peut souvent fixer plusieurs ligands. Malgré la redondance apparente de ce système, l'action de deux chimiokines sur un même récepteur entraîne en général l'activation de voies de signalisation différentes. D'après Proudfoot, 2002 et Nomiyama et coll., 2010.

Les chimiokines sont bien décrites pour leur rôle dans le trafic des cellules immunitaires périphériques en condition physiologique et pathologique (Baggiolini, 1998 ; Rot et von Andrian, 2004). Cependant, elles ont été impliquées dans bien d'autres fonctions cellulaires telles que la formation des organes lymphoïdes, la modification des molécules d'adhésion, l'angiogenèse, le développement des lymphocytes Th1 et Th2, la croissance tumorale et les métastases ou encore la liaison entre un virus et sa cellule cible (Huber et

coll., 1991 ; Cocchi et coll., 1995 ; Forster et coll., 1996 ; Campbell et coll., 1999 ; Benelli et coll., 2006 ; Zlotnik, 2006). Outre leurs rôles en périphérie, les chimiokines agissent également dans le SNC dans des processus tels que la transmission synaptique et la neuroinflammation (Bertollini et coll., 2006 ; Ubogu et coll., 2006).

2.3.2. Fonctions des chimiokines dans la neuroinflammation.

Le rôle des chimiokines dans l'infiltration cérébrale des leucocytes a été largement étudié dans le modèle EAE (Constantin, 2008). A la lumière de ces études, il est clair que cette famille de molécules est essentielle à l'infiltration de l'ensemble des grandes populations immunitaires circulantes (cellules myéloïdes, granulocytes, lymphocytes). De ces données se dégage également l'idée que certains groupes de chimiokines sont préférentiellement utilisés pour le recrutement de sous populations leucocytaires spécifiques même si ceci n'est pas toujours le cas. Elles sont notamment impliquées dans le processus d'activation des leucocytes leur permettant d'adhérer fortement à l'endothélium vasculaire. Après l'étape de roulement, les leucocytes peuvent être stimulés par les chimiokines exposées à la surface de l'endothélium vasculaire. Une signalisation intracellulaire entraîne alors une adhésion forte du leucocyte à travers deux mécanismes de modification des intégrines (Dustin et Springer, 1989). D'une part, des changements conformationnels dans les domaines extracellulaires des intégrines augmentent leur affinité pour leurs ligands endothéliaux lors d'un processus appelé régulation d'affinité (Carman et Springer, 2003). D'autre part, les intégrines se regroupent alors à la surface du leucocyte, un phénomène appelé régulation de la valence (Bazzoni et Hemler, 1998).

a) Recrutement des cellules myéloïdes

Dans le SNC de souris développant l'EAE où des monocytes s'accumulent en grand nombre, ceux-ci se différencient en macrophages et participent à la pathogénèse. Ces monocytes utilisent préférentiellement le récepteur CCR2 pour entrer dans le cerveau (Geissmann et coll., 2003). De plus ce récepteur joue un rôle en condition pathologique. En effet, des souris déficientes en CCL2 ou recevant un anticorps bloquant anti-CCR2 sont résistantes à l'EAE (Izikson et coll., 2000 ; Huang et coll., 2001 ; Gaupp et coll., 2003 ; Mahad et Ransohoff, 2003). L'utilisation d'autres modèles d'inflammation cérébrale a également confirmé que

l'interaction CCR2-CCL2 permet le recrutement des monocytes dans le SNC inflammé (Mildner et coll., 2007 ; Ransohoff, 2007).

b) Recrutement des granulocytes

En général, les neutrophiles ne semblent pas être recrutés dans le parenchyme cérébral. Cependant dans les phases précoces de certains modèles d'EAE, un nombre substantiel de neutrophiles semblent pouvoir infiltrer le SNC (McColl et coll., 1998). Dans ces conditions, l'inactivation de CXCR2 est associée à une absence de neutrophile intracérébrale et à un score clinique extrêmement abaissé dans le modèle EAE. A l'inverse, le transfert de quelques neutrophiles possédant CXCR2 restaure le phénotype inflammatoire dans ce modèle d'étude (Carlson et coll., 2008).

c) Recrutement des lymphocytes

L'infiltration lymphocytaire est également un phénomène majeur dans la sclérose en plaque et son modèle l'EAE.

Plusieurs chimiokines (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL17, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CXCL10 et CXCL12) sont capables d'induire l'activation des intégrines β_1, β_2 et β_7 dans les lymphocytes leur permettant d'adhérer à l'endothélium vasculaire et préparant ainsi le processus de diapédèse (Laudanna et coll., 2002).

En fonction de la signature cytokinique présente au site inflammatoire, différentes chimiokines vont être induites permettant le recrutement de populations leucocytaires spécifiques. Par exemple, CXCR3, CXCR6 et CCR5 sont préférentiellement exprimés par les Th1 (Figure 14 ; Viola et Luster, 2008 ; Qin et coll., 1998) alors que CCR3, CCR4 et CCR8 sont principalement exprimés par les Th2 (Sallusto et coll., 1998 ; Nagata et coll., 1999 ; Viola et Luster, 2008). Plus récemment, il a été montré que les lymphocytes Th17 expriment CCR4 et CCR6 et potentiellement CCR2 et CCR9 (Acosta-Rodriguez et coll., 2007 ; Sato et coll., 2007 ; Singh et coll., 2008 ; Webb et coll., 2008). Les lymphocytes T régulateurs, quant à eux, ont la capacité d'exprimer différentes combinaisons de récepteurs aux chimiokines en fonction de leur localisation. Ainsi ils peuvent exprimer CCR4 et CCR7 pour migrer aux organes lymphoïdes ou CCR5 pour entrer aux sites d'inflammation (Yurchenko et coll., 2006 ; Kang et coll., 2007 ; Schneider et coll., 2007 ; Yuan et coll., 2007).

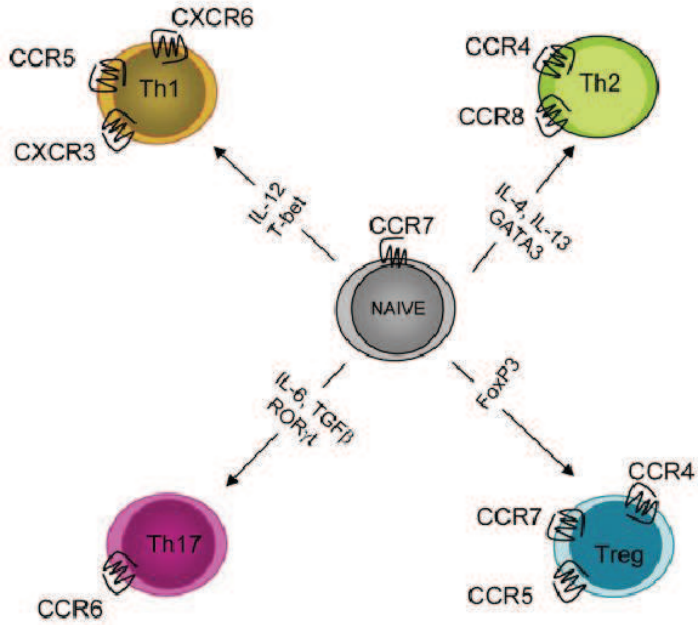


Figure 14 : Expression des récepteurs aux chimiokines par les sous-types de lymphocytes T CD4$^+$. Les lymhocytes T CD4$^+$ naïfs peuvent se différencier plusieurs sous-types lymphocytaires selon les facteurs présents dans l'environnement celulaire notamment Th1, Th2, Th17 et Treg et exprimer préférentiellement différentes combinaisons de récepteurs aux chimiokines. D'après Ward et Marelli-Berg, 2009.

Les chimiokines lymphoïdes CCL19 et CCL21, connues pour leur rôle dans l'arrêt des lymphocytes naïfs aux veinules des organes lymphoïdes secondaires, sont aussi exprimées par les veinules cérébrales inflammées. Ceci explique en partie l'accumulation de cellules CCR7$^+$ dans les lésions inflammatoires caractéristiques du modèle EAE (Kivisakk et coll., 2004). Par ailleurs, ces données corroborent d'autres résultats plus récents montrant une augmentation d'expression de CCL19 au niveau des sites lésionnels chez les patients atteints de sclérose en plaque (Krumbholz et coll., 2007).

Parfois, certaines chimiokines contribuent, non pas à l'infiltration cérébrale et parenchymateuse, mais au contraire restreignent certaines cellules immunitaires dans l'espace périvasculaire. Par exemple, CXCL12 qui est exprimée sur les cellules endothéliales de la moelle épinière en condition normale et au début de l'EAE, limite l'entrée dans le parenchyme cérébral des cellules mononuclées CXCR4$^+$ comme le montre l'infiltration très étendue de ces cellules dans la substance blanche de souris traitées avec un antagoniste spécifique de CXCR4 (McCandless et coll., 2006).

Des expériences de microscopie intravitale effectuées au début de l'EAE ont montré que CCL2 et CCL5 sont impliquées dans l'arrêt des leucocytes sur les veinules inflammées (dos Santos et coll., 2005). De manière intéressante l'expression de CCL2 et CCL5 est abondante dans les lésions de SEP (Sorensen et coll., 1999 ; Sorensen et coll., 2004). Au

regard de l'expression de CCR5 détectée sur des lymphocytes présents dans les lésions, il a été suggéré que le couple CCR5-CCL5 jouait un rôle essentiel dans la migration lymphocytaire cérébrale au cours de la SEP (Sorensen et coll., 1999).

Autre récepteur potentiellement important dans la migration lymphocytaire dans le SNC, CXCR3, spécifique des chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11 peut initier une adhésion rapide des lymphocytes au niveau des parois vasculaires. Toutefois des données parfois contradictoires ont été obtenues concernant son rôle dans l'extravasation lymphocytaire dans le SNC (Liu et coll., 2005 ; Muller et coll., 2010). Si l'administration d'anticorps anti-CXCL10 diminue l'incidence de l'EAE, sa sévérité et l'infiltration de cellules mononucléées (Fife et coll., 2001), des souris $Cxcl10^{-/-}$ ou traitées avec un anticorps dirigé contre CXCL10 ne présentaient pas ce phénotype dans d'autres études (Narumi et coll., 2002 ; Klein et coll., 2004). Par ailleurs, les souris déficientes pour CXCR3 présentent un phénotype aggravé dans le modèle EAE (Liu et coll., 2006). Une étude de Müller et coll. a contribué à interpréter ces différences en montrant que l'augmentation de sévérité observée chez les souris $Cxcr3^{-/-}$ pouvait être expliquée par un rôle de barrière moléculaire joué par CXCL10 qui, disparaissant, permettrait aux lymphocytes d'accéder plus facilement au parenchyme cérébral et de délivrer leur fonction effectrice délétère (Muller et coll., 2007). Pour mieux comprendre les différences observées par ces différents auteurs il est par ailleurs important de noter que les modèles d'EAE utilisés n'étaient pas identiques que ce soit au niveau de l'espèce (rat ou souris) ou au niveau de la voie d'immunisation. Ces résultats pourraient également être interprétés à la lumière de données récentes montrant que CXCL10 peut subir des modifications post-traductionnelles changeant son action d'agoniste de CXCR3 à une action antagoniste via un clivage N-terminal par la protéase DPP4 (Rot et von Andrian, 2004 ; Casrouge et coll., 2011). Ces données nous montrent que les fonctions d'une même chimiokine peuvent être différentes en fonction des conditions pathologiques et nous invitent à la prudence avant de pouvoir transférer ces connaissances à d'autres pathologies du SNC telle que la MP.

Des données concernant l'infiltration lymphocytaire au niveau de l'épithélium des plexus choroïdes ont également montré que la production de CCL20 est nécessaire pour le recrutement des lymphocytes Th17 au niveau cérébral et l'initiation de l'EAE (Reboldi et coll., 2009).

En conclusion, les chimiokines jouent un rôle majeur dans l'infiltration des leucocytes à travers la BHE en condition inflammatoire. De plus, de nombreux antagonistes des récepteurs aux chimiokines sont actuellement développés en clinique, ouvrant une voie prometteuse pour réguler la neuroinflammation (Proudfoot et coll., 2010).

L'expression des chimiokines dans des modèles de MP a elle aussi été rapportée par plusieurs groupes, néanmoins leur fonction dans cette pathologie reste globalement méconnue.

2.3.3. Expression des chimiokines dans la maladie de Parkinson.

Quelques études ont été réalisées sur les fluides de patients. Par exemple, l'expression de CX3CL1 était augmentée dans le LCR d'individus atteints de MP (Shi et coll., 2011). Au niveau du compartiment sanguin, une augmentation d'expression de CCL3 a également été mise en évidence notamment dans les cellules mononuclées (Reale et coll., 2009). Enfin, un taux élevé de CCL5 a été rapporté dans le sérum des patients atteints de MP (Rentzos et coll., 2007). Toutefois, cette augmentation pourrait être liée à la dopathérapie (Gangemi et coll., 2003).

Si les études chez les sujets parkinsoniens restent rares, plusieurs équipes ont en revanche analysé l'expression de ces ligands dans les modèles de maladie de parkinson chez l'animal. Ces études mettent en avant une expression augmentée des ARNm codant pour plusieurs ligands et notamment CCL2, CCL3, CCL4 et CXCL10 dans le striatum ou mésencéphale ventral de souris intoxiquées par le MPTP (Pattarini et coll., 2007 ; L'Episcopo et coll., 2011).

Les quelques études fonctionnelles menées chez le rat ou la souris se sont intéressées à définir le rôle de récepteurs aux chimiokines préférentiellement monocytaires et microgliaux. En outre, des souris déficientes pour CCL2 étaient tout aussi vulnérables aux effets neurotoxiques du MPTP que leurs congénères sauvages (Sriram et coll., 2006 ; Pattarini et coll., 2007 ; O'Callaghan et coll., 2008). Par contr, des souris déficientes pour le gène Cx_3cr1 présentaient une exacerbation de la dégénérescence dopaminergique causée par le MPTP (Cardona et coll., 2006). Une étude récente chez le rat recevant des injections intranigrales de MPP+ et de CX3CL1 a confirmé ces données (Shan et coll., 2011). Cependant

dans une autre étude, l'injection striatale de CX3CL1 protégeait les neurones dopaminergiques et diminuait l'activation microgliale dans un modèle de rat recevant de la 6-OHDA (Pabon et coll., 2011).

En conclusion, ces données suggèrent qu'il existe une modification du réseau chimiokinique dans la MP et ses modèles expérimentaux chez le rongeur. Toutefois, ces données restent parcellaires. En outre, aucune équipe à notre connaissance ne s'est intéressée, jusqu'à présent, à définir le rôle des chimiokines dans les phénomènes d'infiltration cérébrale des leucocytes. Pour répondre à cette problématique les objectifs de mon projet ont été les suivants.

Notre hypothèse de travail est qu'une réaction neuroinflammatoire consécutive à la dégénérescence dopaminergique modifierait les propriétés de la barrière hémato-encéphalique au niveau de la substance noire des patients parkinsoniens, facilitant l'entrée de cellules du système immunitaire adaptatif. Parmi ces modifications de la BHE, l'expression de molécules de la famille des chimiokines et des molécules d'adhésion a été montrée dans de nombreuses pathologies inflammatoires et neuroinflammatoires.

Plusieurs travaux ont mis en évidence une augmentation d'expression d'une molécule d'adhésion, ICAM1, dans la SNpc de patients et de singes et de souris intoxiqués par le MPTP (Kurkowska-Jastrzebska et coll., 1999a ; Imamura et coll., 2003 ; Miklossy et coll., 2006 ; Brochard et coll., 2009). En outre, plusieurs auteurs ont montré une augmentation d'expression de quelques chimiokines dans la SNpc et le striatum de souris intoxiquées par le MPTP (un modèle de lésion des neurones dopaminergiques) (Pattarini et coll., 2007 ; L'Episcopo et coll., 2011). Ces résultats suggèrent que ces molécules pourraient être impliquées dans le recrutement des lymphocytes T pathogéniques dans le modèle MPTP. Une étude détaillée de l'expression des chimiokines et de leur rôle dans les processus d'infiltration cérébrale des lymphocytes T n'avait toutefois, à notre connaissance, jamais été réalisée.

Afin de tester notre hypothèse de travail, le projet de thèse a eu plusieurs objectifs :

I. Caractériser l'expression des chimiokines et des molécules d'adhésion dans un contexte lésionnel de la voie nigro-striée chez la souris

Afin d'étudier l'expression de l'ensemble des molécules de la famille des chimiokines et de molécules d'adhésion lors d'une lésion dopaminergique nigro-striée, nous avons effectué des analyses transcriptomiques sur le mésencéphale ventral de souris intoxiquées par le MPTP.

Ayant montré une augmentation d'expression transcriptionnelle très importante de trois chimiokines en particulier CCL3, CCL4 et CXCL10 après intoxication par le MPTP, nous avons étudié leur expression au niveau protéique par la technique ELISA.

Enfin, ayant détecté une augmentation d'expression de ces chimiokines au niveau protéique, nous avons utilisé des immunomarquages en fluorescence afin de préciser leur source cellulaire dans la substance noire d'animaux intoxiqués par le MPTP.

II. Déterminer le rôle des chimiokines dans l'infiltration lymphocytaire et la dégénérescence dopaminergique dans un contexte lésionnel de la voie nigro-striée

Ayant mis en évidence l'expression d'une signature chimiokinique particulière dans la substance noire de souris intoxiquées par le MPTP, nous avons cherché à étudier le rôle du réseau chimiokinique dans les processus d'infiltration lymphocytaire et de dégénérescence dopaminergique en manipulant des souris déficientes pour les récepteurs des chimiokines identifiées : souris $Ccr1^{-/-}$, $Ccr5^{-/-}$ et $Cxcr3^{-/-}$.

Toutefois, n'ayant observé qu'un faible impact de la délétion de ces récepteurs sur l'infiltration lymphocytaire et la dégénérescence dopaminergique, nous avons formulé deux hypothèses non exclusives : *i)* des phénomènes de compensation pourraient masquer l'effet d'une délétion, *ii)* des effets en dehors du contexte lymphocytaire pourraient limiter ou masquer l'impact de cette délétion.

Pour répondre à ces questions nous avons utilisé deux stratégies : *i)* un blocage multiple des récepteurs aux chimiokines par une combinaison d'approches génétique et pharmacologique, *ii)* une délétion des récepteurs aux chimiokines à l'échelle leucocytaire.

III. Etudier l'expression des chimiokines dans le tissu humain post-mortem de patients parkinsoniens

Enfin, pour confronter nos résultats obtenus dans un modèle murin à la pathologie réelle, nous avons analysé l'expression des chimiokines candidates par la technique de PCR quantitative dans la substance noire de patients parkinsoniens et de sujets contrôles.

I. Cerveaux humains *post-mortem*

1. Description des pièces anatomiques

Les pièces autopsiques ont été recueillies dans le service de neuropathologie du professeur Charles Duyckaerts à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière et dans la banque de cerveau de l'ex-unité Inserm U975. Les informations disponibles étaient le dossier clinique, les conditions de décès et le délai entre le décès du sujet et la congélation des échantillons (délai *post mortem*, DPM). Néanmoins, le DPM n'était pas disponible pour tous les patients. Un résumé de ces données est présenté Table 2. Les sujets témoins étaient exempts de pathologie neurologique ou psychiatrique. Un examen anatomopathologique sur le second hémisphère fixé au formol avant congélation a permis de vérifier l'absence de stigmates neuropathologiques évocateurs de maladies neurodégénératives chez ces sujets.

L'étude a été réalisée sur les prélèvements de 24 sujets parkinsoniens et 20 sujets témoins. La moyenne d'âge au décès n'était pas significativement différente entre les deux groupes (test t de Student). Cependant le DPM était significativement inférieur chez les sujets contrôles (p=0,025, Mann Whitney Rank Sum Test).

Table 2

Caractéristiques des patients analysés

N° Patient	Diagnostic	DPM (h)	Âge au décès (années)	Sexe
167	Contrôle	19	90	F
254	Contrôle	8,5	82	F
255	Contrôle	25	76	F
257	Contrôle	7	85	F
259	Contrôle	7	86	F
262	Contrôle	6	98	F
272	Contrôle	6,5	75	F
330	Contrôle	27	81	F
374	Contrôle	7,5	66	F
4078	Contrôle	10	73	H
3356	Contrôle	-	86	F
4984 *	Contrôle	31	70	H
8401	Contrôle	28	60	F
T859	Contrôle	-	-	-
T1044	Contrôle	-	-	-
T1042	Contrôle	22,5	88	H
T1040	Contrôle	-	-	-
T961	Contrôle	-	-	-
T902	Contrôle	-	-	-
T922	Contrôle	-	-	-

* Lésions d'Alzheimer stade III de Braak.
Maladie d'Alzheimer potentielle.

N° Patient	Diagnostic	DPM (h)	Âge au décès (années)	Sexe
166	Parkinsonien	20	71	H
195	Parkinsonien	-	68	H
217	Parkinsonien	9,5	73	H
258	Parkinsonien	24	71	H
324	Parkinsonien	18	72	F
360	Parkinsonien	19,5	84	F
397	Parkinsonien	10	65	H
398	Parkinsonien	34	82	H
433	Parkinsonien	24	74	H
469	Parkinsonien	48	62	F
5874	Parkinsonien	40	76	H
3490	Parkinsonien	55	78	F
3392	Parkinsonien	23	73	H
5393	Parkinsonien	26	82	H
4899	Parkinsonien	28	83	H
7330	Parkinsonien	24	79	H
7939	Parkinsonien	44	67	H
7366	Parkinsonien	40	84	F
P1081	Parkinsonien	15,5	78	F
P1050	Parkinsonien	12,8	62	F
P893	Parkinsonien	-	76	-
P1007	Parkinsonien	10,5	-	H
P913	Parkinsonien	-	76	H
P775	Parkinsonien	-	79	F

2. Préparation du tissu humain

Deux types d'échantillons ont été obtenus. Les premiers se présentaient sous forme de coupes congelées de mésencéphale de 20 µm d'épaisseur montées sur lame de verre. A partir de ces lames, la SNpc a été grattée et la poudre de tissu récupérée dans des tubes. Les frontières anatomiques correspondant à la SNpc sont indiquées dans la Figure 15. Les seconds se présentaient sous forme de blocs de SNpc disséqués et étaient donc directement utilisables.

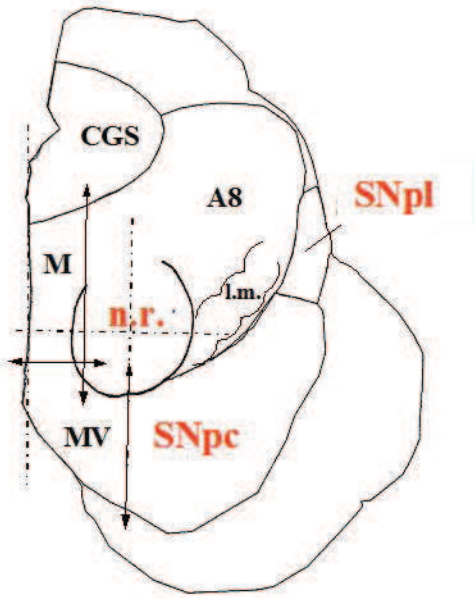


Figure 15 : Subdivision du mésencéphale en groupes de neurones dopaminergiques. SNpc: substance noire *pars compacta*; SNpl: substance noire *pars lateralis*; M: région médiane; MV: région médio-ventrale; A8: groupe dopaminergique A8; CGS: substance grise périaqueducale; n.r.: noyau rouge; l.m.: lemnisque médian.

II. Modèles expérimentaux in vivo

1. Animaux

Des souris mâles C57BL/6J (JANVIER, France) âgées de 8 à 12 semaines et pesant entre 25 et 30 grammes ont été utilisées. Les lignées transgéniques déficientes en récepteurs aux chimiokines ou en lymphocytes ont été obtenues auprès des laboratoires Jackson (Bar Harbor, ME) ou nous ont été fournies par le docteur Combadière (INSERM UMRS 945, Immunité et Infection, Hôpital de la Salpêtrière). Toutes ces lignées sont sur fond génétique C57BL/6J et sont décrites dans la table 3.

Table 3 Description des lignées de souris utilisées	
Lignée	**Description**
CCR1$^{-/-}$	Souris déficientes en récepteur CCR1
CCR5$^{-/-}$	Souris déficientes en récepteur CCR5
B6.129P2-Cxcr3^{tm1Dgen}/J	Souris déficientes en récepteur CXCR3
B6.129S7-Rag1^{tm1Mom}/J	Souris déficientes en lymphocytes T et B
B6.129P2-Ccl3^{tm1Unc}/J	Souris déficientes en CCL3
B6.129S4-Cxcl10^{tm1Adl}/J	Souris déficientes en CXCL10

Les souris ont été hébergées dans les centres d'exploration fonctionnelle (CEF) du site de la Pitié-Salpêtrière (23±1°C) et étaient nourries *ad libitum* avec accès libre et permanent à une source d'eau. Un cycle de 12 heures de luminosité et de 12 heures d'obscurité leur était imposé.

L'ensemble des expérimentations ont été réalisées en conformité avec la directive européenne de 1986 (86 / 609 EEC).

2. Intoxication des animaux par le MPTP

Un protocole d'intoxication aigu par le MPTP a été utilisé. Les souris ont reçu 4 injections intrapéritonéales à 2 heures d'intervalle de MPTP-HCl dilué dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%) à une concentration de 2,5 mg/ml (Sigma-Aldrich, France). Les doses cumulatives de MPTP étaient de 80 mg/kg ou 94 mg/kg. Des groupes de souris contrôles recevaient le même nombre d'injections avec des volumes équivalents de NaCl 0,9%.

3. Méthode de transfert passif de leucocytes

Une suspension cellulaire a été préparée à partie de rates des souris suivantes :

- Ccr1$^{-/-}$
- Ccr5$^{-/-}$
- Cxcr3$^{-/-}$
- C57BL/6J

Les rates sont prélevées et homogénéisées sur un filtre de nylon de 70 µm puis resuspendues dans une solution de PBS contenant 10% de sérum de veau fœtal. Les splénocytes ainsi obtenus sont ensuite centrifugés 5 minutes à 1500 rpm pour obtenir un culot cellulaire. Après élimination du surnageant, les cellules sont resuspendues dans une

solution de lyse des hématies et laissées sur glace 5 minutes. Cette étape est réalisée deux fois afin d'éliminer complètement les hématies. La réaction est alors stoppée par addition d'une solution de PBS et sérum de veau fœtal. Les splénocytes sont ensuite lavés 3 fois par centrifugation (5 minutes à 1500 rpm) et resuspension successive dans du PBS. Enfin, les cellules sont passées à nouveau sur un filtre de nylon de 70 µm afin d'éliminer d'éventuels agrégats. Les cellules sont alors comptées à l'aide d'une cellule de Malassez et leur concentration ajustée à 50.10^6/ml avant leur transfert dans les souris immunodéficientes $rag1^{-/-}$.

Chaque souris déficiente reçoit 2 injections intraveineuses, par voie rétro-orbitale, à 4 heures d'intervalle, de 10 millions de splénocytes chacune. Les souris sont alors laissées au repos pendant 5 semaines afin que leur système immunitaire se reconstitue (Figure 16).

Un prélèvement de sang a été effectué le jour du sacrifice afin d'analyser les lymphocytes circulants par *fluorescence-activated cell sorting* (FACS).

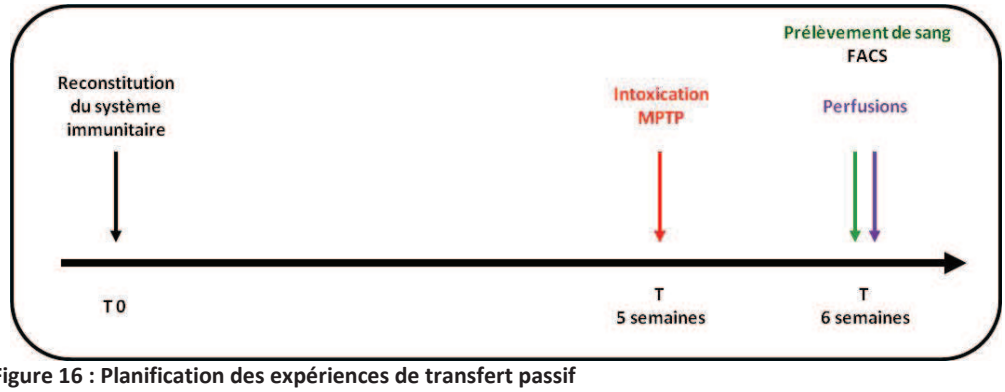


Figure 16 : Planification des expériences de transfert passif

4. Injection du Met-RANTES

Le Met-RANTES est un inhibiteur compétitif des récepteurs CCR1, CCR5 et CCR3. Il est obtenu par la conservation du résidu méthionine en N-terminal du ligand CCL5 (Proudfoot et coll., 1996).

Les souris ont reçu 3 injections intrapéritonéales de Met-RANTES à une dose de 100 µg par animal et par injection. Ces injections étaient réalisées 1, 3 et 5 jours après l'intoxication par le MPTP (Figure 17). Les souris ne recevant pas l'antagoniste ont été injectées avec un volume équivalent de PBS.

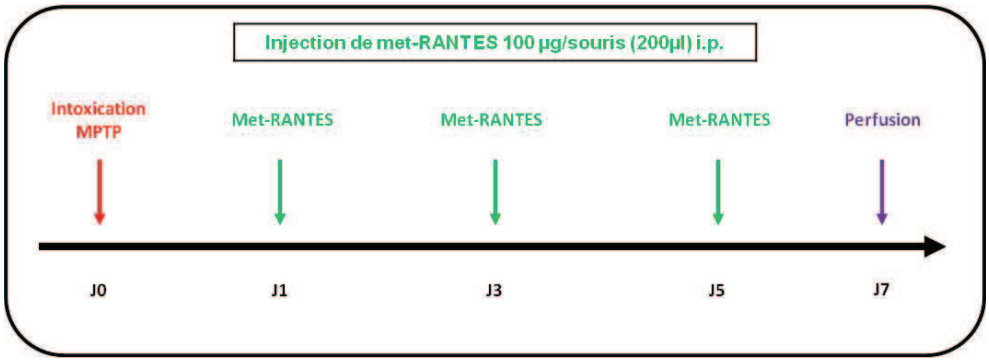


Figure 17 : Planification des injections de MPTP et de Met-RANTES.

5. Chirurgie stéréotaxique

Des souris C57BL/6J, Ccl3$^{-/-}$, Ccl5$^{-/-}$ et Cxcl10$^{-/-}$ ont été anesthésiées avec une solution de kétamine (66 mg/kg, CEVA Santé Animale, Bruxelles) et de xylazine (6,6 mg/kg, Bayer, Allemagne). A l'aide d'un cadre de stéréotaxie, les souris ont reçu une injection intracérébrale unilatérale d'1 µg de LPS d'*Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, France) dans un volume total d'1 µl. Les coordonnées étaient : médio-latéral : 1,30 mm ; antéro-postérieur : 2,90 mm ; dorso-ventral : 4,60 mm. Les souris ont été sacrifiées 24 heures après cette injection de LPS.

6. Prélèvement de sang et cytométrie en flux

Cent à deux cent µl de sang ont été prélevés sur héparine par ponction rétro-orbitale, le jour du sacrifice, chez les souris sauvages et rag1$^{-/-}$.

La détection simultanée de plusieurs antigènes a été effectuée sur ces échantillons sanguins par cytométrie en flux avec des anticorps couplés à des fluorochromes. Des marquages membranaires, cytokiniques et pour un facteur de transcription ont été réalisés.

Les leucocytes ont été activés avant les marquages de cytokines (IFNγ, IL-12 et IL-17 ; Table 4). Brièvement, les cellules sont incubées 3 heures à 37°C avec une solution d'activation [Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM) + 10% de sérum de veau fœtal + Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) + Inomycine + Bréfeldine A ; BD Biosciences, NJ] puis centrifugées (3 min à 1700 rpm) et lavées avec une solution de PBS + BSA 0,5% (PBS-BSA) puis centrifugées à nouveau.

Des marquages pour les molécules membranaires CD3, CD4, CD25, CD45RA et CD25 (Table 4) ont été réalisés. Brièvement, les cellules sont culotées par centrifugation (3 min à 1700 rpm), lavées avec une solution de PBS-BSA et à nouveau centrifugées. Afin de prévenir

une fixation non spécifique des anticorps de détection, elles sont alors incubées 20 minutes à 4°C avec un anticorps dirigé contre le récepteur des immunoglobulines RFcγA (CD16/32). Après une nouvelle étape de centrifugations et de lavage, les cellules sont incubées à 4°C, à l'obscurité pendant 20 minutes avec les anticorps de détection. Une troisième étape de centrifugations et de lavage est effectuée puis les cellules sont lysées en présence d'un tampon ACK Lysis Buffer (BD Biosciences, NJ) pendant 10 minutes à 4°C.

Lorsqu'un marquage cytokinique a été réalisé, le tampon ACK Lysis Buffer a été remplacé par une perméabilisation de la membrane plasmique avec un tampon Perm/Wash (BD Biosciences, NJ) pendant 20 minutes à 4°C. Après une étape de centrifugation, suivie d'un lavage avec un tampon PBS et d'une seconde centrifugation, les cellules sont incubées dans le tampon Perm/Wash en présence d'anticorps dirigés contre les cytokines pendant 20 minutes à 4°C. Les cellules sont à nouveau lavées avec un tampon PBS et centrifugées avant resuspension dans un tampon PBS-BSA.

Lors d'un marquage du facteur de transcription T-bet, le tampon ACK Lysis Buffer a été remplacé par un tampon Lyse/Fix Buffer (BD Biosciences, NJ). Une perméabilisation des membranes, plasmique et nucléaire, est ensuite réalisée en incubant les cellules pendant 30 minutes à 4°C dans un tampon Perm Buffer III (BD Biosciences, NJ). Les cellules sont ensuite lavées avec un tampon PBS et centrifugées 3 fois puis incubées pendant 20 minutes à 4°C avec un anticorps dirigé contre le T-bet ou un anticorps isotypique. Enfin, les cellules sont lavées avec un tampon PBS, centrifugées et resuspendues dans un tampon PBS-BSA.

L'ensemble des marquages cellulaires sont détectés à l'aide d'un cytomètre de flux LSR II (BD Biosciences ; NJ) et analysés avec le logiciel FlowJo software (Tree Star, OR).

Table 4

Description des anticorps utilisés en FACS chez la souris

Marqueur	Expression cellulaire ou immunogène	Fournisseur	Clone	Type	Espèce hôte	Temps d'incubation
CD3e	Lymphocytes T	BD Biosciences	145-2C11	Monoclonal	Hamster Arménien	20 minutes
CD4	Lymphocytes Th	BD Biosciences	RM4-5	Monoclonal	Rat	20 minutes
CD8a	Lymphocytes Tc	BD Biosciences	53-6.7	Monoclonal	Rat	20 minutes
CD25	Lymphocytes Treg	BD Biosciences	PC61	Monoclonal	Rat	20 minutes
CD45RA	Lymphocytes naïfs	BD Biosciences	14.8	Monoclonal	Rat	20 minutes
IFNγ	Lymphocytes Th1 ou Tc1	BD Biosciences	XMG.12	Monoclonal	Rat	20 minutes
IL-12	Lymphocytes Th2	BD Biosciences	C15.6	Monoclonal	Rat	20 minutes
IL-17A	Lymphocytes Th17	BD Biosciences	TC11-18H10	Monoclonal	Rat	20 minutes
T-bet	Lymphocytes Th1 ou Tc1	BD Biosciences	OA-46	Monoclonal	Souris	20 minutes
Isotype IgG1,κ (pour T-bet)	-	BD Biosciences	MOPC-21	Monoclonal	Souris	20 minutes

7. Sacrifice et préparation des tissus

Pour les études immunohistochimiques les souris ont été anesthésiées par injection i.p. d'une dose léthale de pentobarbital sodique 6% (6 ml/kg, Sanofi, France) 24 heures, 48 heures ou 7 jours après intoxication par le MPTP. Après perte de réaction aux stimuli physiologiques, les animaux ont ensuite été perfusés par voie cardiaque avec une solution d'héparine (5 UI/ml diluée dans du NaCl 0,9% ; 25 ml au total à un débit de 5 ml/min), suivie d'une solution de paraformaldéhyde 4% dilué dans du PB 0,1M (100 ml au total à un débit de 5 ml/min). Le cerveaux et la rate des souris ont alors été prélevés et placés successivement dans une solution de paraformaldéhyde 4% pendant 12 heures, puis de saccharose 10%, 20% et 30% chacune pendant 24 heures afin de les cryoprotéger. Ces organes ont ensuite été congelés par immersion dans de l'isopentane porté à -30°C et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Des coupes de cerveau de 20 µm d'épaisseur ont été obtenues à l'aide d'un microtome à congélation. Les niveaux anatomiques récupérés étaient le striatum et le mésencéphale. Les coupes ont été conservées dans du PBS contenant 0,2% d'azide de sodium afin de prévenir toute contamination microbienne.

Pour les études de biologie moléculaire les souris étaient sacrifiées, 2 jours, 5 jours ou 7 jours après intoxication, par dislocation cervicale. Le mésencéphale ventral a été disséqué, l'un des hémisphères étant destiné aux études biochimiques, l'autre aux études transcriptomiques (Figure 18). Ces échantillons ont été directement congelés dans l'azote liquide pour prévenir la dégradation des protéines et des ARN puis conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

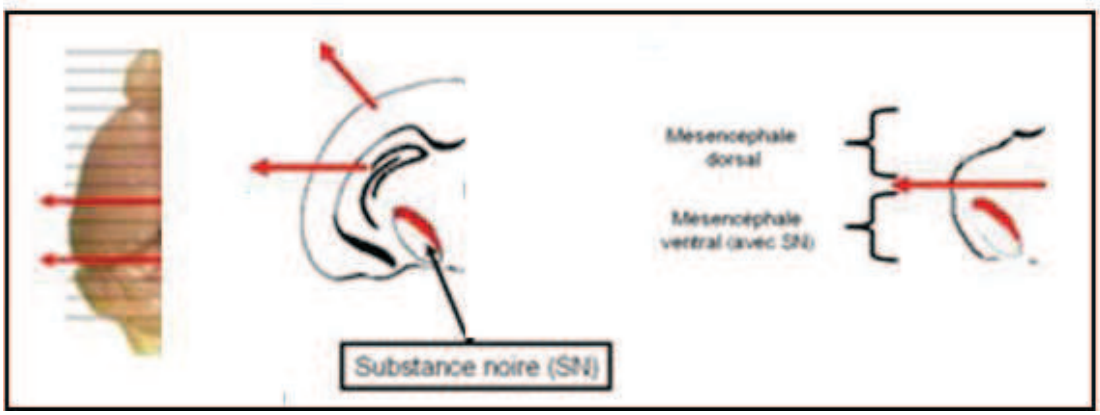


Figure 18 : Dissection du mésencéphale ventral contenant la substance noire.

III. Techniques de biologie moléculaire

1. Préparation de l'ARN

Pour l'ensemble des études de biologie moléculaire, le protocole d'extraction, de dosage et de contrôle de la qualité étaient les suivants :

1.1. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN à partir de demi-mésencéphales ventraux a été effectuée avec le kit *RNeasy Lipid Tissue Mini Kit* (Qiagen, Pays-Bas). Toutes les étapes ont été effectuées dans des conditions permettant de limiter au maximum la dégradation des ARN. La première étape consiste à homogénéiser mécaniquement les tissus et extraire les ARN dans une solution de phénol à l'aide d'un Ultraturax (Imlab, France). L'ajout d'une solution de chloroforme permet de récupérer, après centrifugation, une phase contenant les acides nucléiques. L'ARN est alors purifié sur des colonnes d'affinité. Au cours de cette purification, l'ADN est digéré sur colonne grâce à un traitement enzymatique par la DNase I (Qiagen, Pays-Bas). Les ARN sont alors élués et récupérés dans une solution d'eau stérile, puis congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

1.2. Dosage et contrôle qualité des ARN

Les ARN totaux sont ensuite dosés par spectrométrie ultraviolet à l'aide d'un Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, MA). La qualité des ARN, mesurée par l'indice *RNA integrity number* (RIN) a, quant à elle, été déterminée à l'aide d'un Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA).

Pour les études chez l'animal la qualité des échantillons était considérée satisfaisante lorsque les valeurs suivantes étaient respectées :

- A260/280 ≥ 2,0 (faible contamination par des protéines)
- A260/230 ≥ 1,7 (faible contamination par les solvants)
- RIN > 7 (peu de dégradation des ARN)

2. Transcriptomique

2.1 Etude transcriptomique : Oligoarrays

Les oligoarrays sont des biopuces permettant de détecter l'expression de plusieurs centaines de gènes. Pour ce faire, les échantillons d'ARN sont hybridés sur des membranes de nylon comportant des oligonucléotides (60-mer), reconnaissant chacun un ARN transcrit par un gène différent. Une révélation en chimiluminescence permet de quantifier les ARN hybridés (Figure 19).

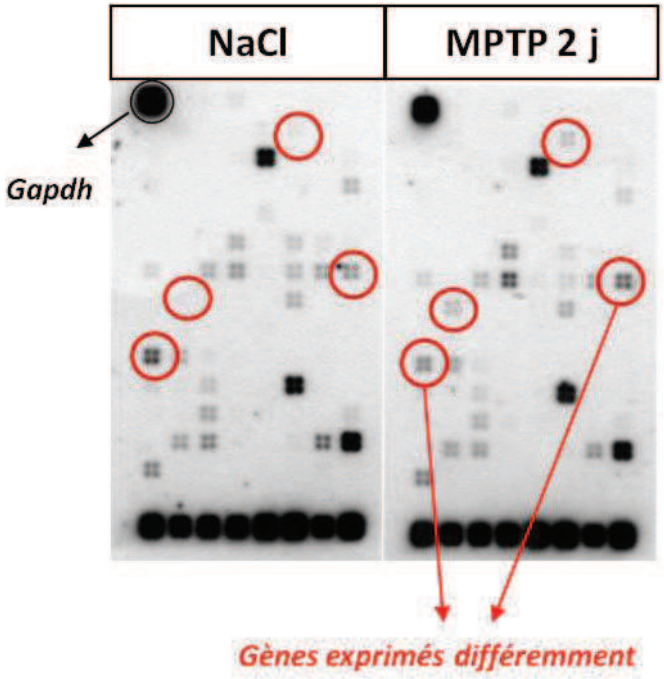


Figure 19 : Signaux d'hybridation obtenus sur des membranes pour les chimiokines de souris injectées avec une solution saline (gauche) ou avec du MPTP (droite). Les points cerclés de rouge correspondent à des gènes dont l'expression est différente chez les deux souris. Le point cerclé de noire correspond à la Gapdh. Des gènes de référence supplémentaire sont présents en bas des membranes (point noirs très intenses).

2.1.1 Amplification linéaire et marquage des ARN

Une première étape d'amplification des ARN a permis à la fois d'augmenter la quantité d'ARN de départ et des les biotinyler. Pour ce faire, un kit TrueLabeling-Amp 2.0 Kit (SA Biosciences) a été utilisé. Tout d'abord, 1,5 µg d'ARN de chaque échantillon sont rétrotranscrits en ADN complémentaire (ADNc) en incubant les ARN avec une reverse transcriptase du kit pendant 50 minutes à 37°C. Les ADNc ainsi obtenus servent alors de brins matrices pour produire des ARN complémentaires (ARNc) lors d'une incubation dans un tampon d'amplification pendant 12 heures à 37°C. Cette étape a également permis

d'ajouter des résidus de biotine dans les brins ARN en utilisant des UTP biotinylés. Les ARN biotinylés sont ensuite purifiés avec un kit ArrayGrade cRNA Cleanup (SA Biosciences). La quantité d'ARN est alors quantifiée à l'aide d'un Nanodrop.

2.1.2 Hybridation et révélation

Pour chaque échantillon 5 µg d'ARN biotinylé ont été hybridés sur des membranes contenant des oligonucléotides spécifiques pour les gènes décrits en annexe 1. Après hybridation et rinçage à 60°C pendant 15 minutes avec deux tampons successifs [300 mM de NaCl, 30 mM de citrate trisodique et 1% de sodium dodécyl sulfate (SDS) ; 15 mM de NaCl, 1,5 mM de citrate trisodique et 0,5% de SDS], les membranes sont incubées avec une phosphatase alcaline couplée à l'avidine. Une fois le rinçage de ces membranes réalisé, un substrat chimiluminescent de la phosphatase est ajouté. L'intensité de lumière émise au niveau de chaque point d'hybridation correspondant à un gène spécifique est corrélée à la quantité d'ARN hybridé. Pour mesurer cette intensité des images en résolution 2048x2048 ont été prises avec un scanner KODAK et analysées à l'aide du logiciel GEArraySuite (SA Biosciences).

2.2. Biopuces TaqMan®

Les *TaqMan Array Microfluidic Cards* sont des cartes pré-chargées avec des sondes TaqMan®. Elles permettent de mesurer l'expression de gènes par la technique de quantification relative de comparaison des C_T ($\Delta\Delta C_T$). Entre 1 et 8 échantillons peuvent être distribués sur une même plaque pour détecter entre 12 et 384 gènes différents.

2.2.1 Rétrotranscription

La rétrotranscription des ARN en ADNc a été réalisée avec le kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, CA). Brièvement, 1 µg d'ARN subit 4 étapes d'incubation (25°C, 10 min ; 37 °C, 120min ; 85°C, 5min ; 4°C) avec la reverse transcriptase et des amorces de type hexamère aléatoire dans un thermocycleur Perkin 3 (Perkin Elmer, MA). Les ADNc sont alors congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

2.2.2. Amorces et PCR quantitative

Des cartes microfluidiques de 384 puits pré-chargées avec des amorces lyophilisées ont été utilisées (Figure 20). Les couples d'amorces chargés dans les cartes ont été choisis et ordonnés selon nos besoins (Life Technologies, CA). De préférence, les amorces choisies produisaient un amplicon chevauchant deux exons pour prévenir l'amplification d'ADN génomique contaminant. Les cartes présentent 8 réservoirs associés à 48 puits chacun. Les 4 premiers réservoirs de chaque carte ont été chacun chargés avec 400 ng d'un échantillon et les 4 réservoirs suivants avec 400 ng d'un second échantillon dilués dans du TaqMan GenEx Master Mix (Life Technologies, CA). Ainsi, 192 gènes différents étaient testés pour un même échantillon (Annexe 2). L'amplification et la détection de la quantité d'ADNc par fluorescence ont été effectuées par plusieurs cycles à différentes température [50°C, 2min ; 94,5°C, 10 min ; (97°C, 30s ; 59,7°C, 1 min) x 40 cycles] sur un thermocycleur *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Life Technologies, CA ; en collaboration avec Marie-Caroline Dieu-Nosjean au Centre de Recherche des Cordeliers).

Les gènes Hprt et Gapdh ont été utilisés comme normalisateurs et disposés en triplicat pour chaque échantillon.

Les résultats de l'amplification ont été analysés à l'aide des logiciels SDS Manager, RQ Manager et Data Assist (Life Technologies, CA).

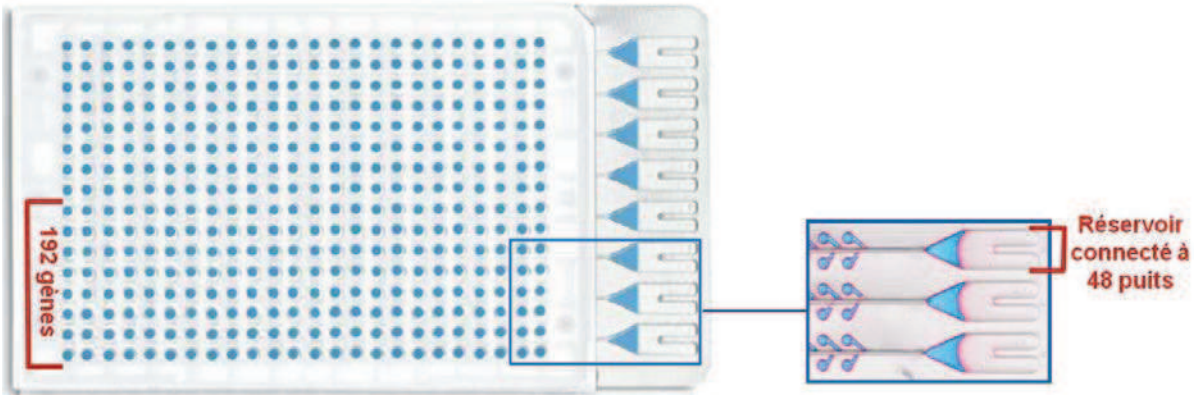


Figure 20 : Carte microfluidique TaqMan®

3. PCR quantitative

3.1 Chez la souris

3.1.1. Rétrotranscription

La rétrotranscription d'ARN en ADNc a été effectuée avec le kit Superscript III (Life Technologies, CA). Brièvement, 1µg d'ARN est rétrotranscrit en présence d'une reverse transcriptase et d'amorces de type : *i)* oligo-déoxy-thymine liant la queue poly A en 3′ des ARN et *ii)* hexamères aléatoires s'hybridant sur plusieurs sites au sein du brin d'ARN. Au terme de la réaction de rétrotranscription réalisée dans un thermocycleur Perkin 3 (Perkin Elmer, MA), une solution de RNAse H est ajoutée afin d'éliminer les ARN. Les ADNc ainsi obtenus étaient enfin congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

3.1.2. Amorces et PCR quantitative

Les séquences des gènes d'intérêt (Table 5) ont été récupérées dans la banque de référence de séquences de NCBI (NCBI, MD). Le logiciel Primer Express 3.0 (Life Technologies, CA) a été utilisé pour dessiner des couples d'amorces. Les amplicons souhaités devaient chevaucher deux exons. La spécificité de chaque primer a été vérifiée à l'aide du logiciel Primer Blast (NCBI, MD).

Les qPCR (PCR quantitative) ont été réalisées avec la technologie SYBR GreenER (Life Technologies, CA). Deux à quatre ng d'ADNc ont été utilisés pour détecter les gènes d'intérêt. Les gènes Gapdh et Hprt ont été utilisés comme références (normalisateurs). Les amplifications ont été obtenues à l'aide du thermocycleur *7500 Real-Time PCR System* (Life Technologies, CA) et les données ont été analysées à l'aide du logiciel qBase plus (Biogazelle, Belgique).

Table 5	
Séquence des amorces utilisées pour les PCR quantitatives chez la souris	
Symbole du gène	**Séquence des amorces (Forward et Reverse)**
B2m	CACTGACCGGCCTGTATGC
	GGTGGCGTGAGTATACTTGAATTTG
CCL2	GGCTCAGCCAGATGCAGTTAA
	CCTACTCATTGGGATCATCTTGCT
CXCL10	CATCCCTGCGAGCCTATCC
	GGATTCAGACATCTCTGCTCATCA
CD68	TGGCGGTGGAATACAATGTG
	GAGATGAATTCTGCGCCATGA
Cd11b	CCGAGGTGCTCCTAAAACCA
	GATGCTTACCTGGGTTATGCTTCT
Cx3cr1	ATCAGCATCGACCGGTACCT
	CTGCACTGTCCGGTTGTTCA
Gapdh	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA
	CCTGCTTCACCACCTTCTTGA
Gfap	CGCTCAATGCTGGCTTCA
	AAGCGGTCATTGAGCTCCAT
Hprt	CTTCCTCCTCAGACCGCTTTT
	AACCTGGTTCATCATCGCTAATC
F4/80	GATGAATTCCCGTGTTGTTGGT
	ACATCAGTGTTCCAGGAGACACA
Th	GGATGTGTCTCACTTCTTGAAGGA
	AGAAAATCACGGGCAGACAGTAG

3.2. Chez l'homme

3.2.1. Qualité des ARN

Le dosage et le contrôle qualité des échantillons d'ARN ont été effectués selon le mode opératoire décrit dans le chapitre III. 1.2.

Les échantillons étaient considérés de qualité suffisante lorsque les valeurs suivantes étaient respectées :

- A260/280 ≥ 1,8 (faible contamination par des protéines)
- 4 < RIN < 7 (afin de limiter les écarts de Ct dus aux différences de qualité d'ARN).

3.2.2. Rétrotranscription

La rétrotranscription d'ARN en ADNc a été effectuée avec le kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, CA). Brièvement, 300 ng à 1 µg d'ARN ont été

rétrotranscrits dans un thermocycleur Perkin 3 (Perkin Elmer, MA) en présence d'une reverse transcriptase et d'amorces de type hexamères aléatoires.

3.2.3 Amorces et PCR quantitative

Les qPCR ont été effectuées avec la technologie SYBR GreenER (Life Technologies, CA). Deux à dix huit ng d'ADNc ont été utilisés pour l'amplification des gènes d'intérêts par PCR quantitative réalisée à l'aide d'un thermocycleur *7500 Real-Time PCR System* (Life Technologies, CA). Les données d'amplification ont été analysées à l'aide du logiciel qBase plus (Biogazelle, Belgique). Au total, 8 gènes de référence ont été testés. La stabilité de ces gènes entre les sujets contrôles et parkinsoniens a été vérifiée à l'aide du logiciel GeNorm (Biogazelle, Belgique). L'ensemble des couples d'amorces utilisés sont référencés en table 6. Toutes les amorces produisaient des amplicons de taille inférieure à 100 paires de bases afin de limiter la variabilité d'amplification due aux différences de qualité des ARN (Fleige et coll., 2006).

Table 6

Séquence des amorces utilisées pour les PCR quantitatives chez l'homme

Symbole du gène	Séquence des amorces (Forward et Reverse)	Symbole du gène	Séquence des amorces (Forward et Reverse)
Actb	CTGGCACCCAGCACAATG	Hla-dra	TGGCGGCTTGAAGAATTTG
	GCCGATCCACACGGAGTACT		TTGGCCAATGCACCTTGAG
Ccl3	CAACCAGTTCTCTGCATCACTTG	Hprt1	GCAGACTTTGCTTTCCTTGG
	CGGGAGGTGTAGCTGAAGCA		AACACTTCGTGGGGTCCTTT
Ccl4	AGCGCTCTCAGCACCAATG	Sf3a1	CCACCCAAAGGTTTATTTTCAAA
	AGCTTCCTCGCAGTGTAAGAAAA		GGTAACACACCTGATCCAAAACTTC
Ccl5	TGCTGCTTTGCCTACATTGC	Tbp	CACCACAGCTCTTCCACTCA
	TGCCACTGGTGTAGAAATACTCCTT		GGGGAGGGATACAGTGGAGT
Cxcl10	CCACGTGTTGAGATCATTGC	Th	CCTCGGATGAGGAAATTGAG
	TTCTTGATGGCCTTCGATTC		CTGCTTACACAGCCCGAACT
Eif4a2	CAAGGAGACCCAAGCACTAGTATTG	Top1	AATGCCTCCATCACGCTACAG
	CTCCAAGTGCCAGAATTACCTTTT		GGCACGGTTATAAGAAAGGATCTTC
Gapdh	AATCCCATCACCATCTTCCA	Ywhaz	CTGGTGATGACAAGAAAGGGATT
	TGGACTCCACGACGTACTCA		GCATTTCCTTTTTGCTGATTTCA
Gfap	CTGGAGGTTGAGAGGGACAA		
	CAGCCTCAGGTTGGTTTCAT		

3.3. Tests d'efficacité des couples d'amorces de PCR quantitative

Tous les couples d'amorces utilisés pour les qPCR avec la technologie SYBR Green ont été testés pour déterminer leur qualité en PCR quantitative. Pour ce faire, 5 dilutions au

demi ou au tiers d'un même ADNc ont été préparées et utilisées pour chaque couple d'amorces à tester. L'efficacité des couples d'amorces était comprise entre 90 et 110%.

IV. Dosage protéique par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

1. Extraction protéique

Les hémi-mésencéphales ventraux de souris ont été homogénéisés mécaniquement à +4°C à l'aide d'un Ultraturax (Imlab, France) dans 650 µl de tampon Tris NaCl (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) contenant des inhibiteurs de protéases (cOmplete ULTRA, Roche, IN). Ces homogénats ont été ensuite centrifugés à 12000 g pendant 30 minutes afin de séparer les protéines solubilisées dans le surnageant du culot de débris et d'organelles cellulaires.

2. Dosage des protéines

La quantité de protéines présente dans les échantillons a été dosée par la technique à l'acide bicinchoninique (BCA Protein Assay, Thermo Fisher Scientific, MA). Brièvement une gamme étalon de 0 à 2 µg/µl d'albumine sérique bovine (ASB) est préparée. Dix microlitres de chaque échantillon protéique et de chaque dilution d'ASB sont déposés dans des plaques de 96 puits. L'acide bicinchoninique est alors ajouté dans chaque puits et une incubation de 30 minutes à 37°C est réalisée. Après cette incubation, la densité optique à 544 nm dans chaque puits est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Chameleon (Hidex, Finlande). La concentration de chaque échantillon est alors déterminée à partir de la gamme étalon et ajustée à 200 ng/µl.

Des tests préliminaires nous ont orientés vers une étape supplémentaire de concentration des échantillons protéiques au regard des limites de détection imposées par les kits ELISA utilisés. Pour cela les échantillons ont été concentrés sur des colonnes Amicon Ultra (Millipore, MA) retenant les protéines de plus de 3kDa. Les échantillons ont été dosés à nouveau et leur concentration a été ajustée à 800 ng/µl.

3. Dosage des chimiokines par ELISA

Les kits ELISA Quantikine® (R§D Systems, MN) ont été utilisés afin de détecter les chimiokines CCL3, CCL4 et CXCL10 dans les échantillons de mésencéphale ventral. Une gamme étalon de chimiokine recombinante a été préparée. Brièvement, les homogénats

protéiques sont disposés dans des plaques de 96 puits recouvertes d'un anticorps de capture dirigé contre la chimiokine d'intérêt. Après deux heures d'incubation, les puits sont lavés et un deuxième anticorps de détection couplé à une peroxydase est alors ajouté, suivi d'une incubation de deux heures. Après rinçage, une solution contenant le substrat de l'enzyme est déposé dans chacun des puits. Après 30 minutes d'incubation, la réaction est stoppée en présence d'une solution acide. La densité optique à 450 nm de chaque puits est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Chameleon (Hidex, Finlande). Cette mesure est minorée par la valeur de la densité optique à 570 nm afin de corriger les éventuels défauts de plaque. Enfin, la concentration en chimiokine de chaque échantillon est déterminée à partir de la gamme étalon grâce à une courbe logistique à quatre paramètres 4PL (Logiciel Sigmaplot, Systat Software ; Wild, 2005) selon les recommandations du fournisseur.

V. Techniques Histologiques

1. Marquage immunohistochimique

Un immunomarquage dirigé contre la tyrosine hydroxylase (TH) est réalisé afin d'identifier les neurones dopaminergiques de la SNpc. Pour cela, des coupes flottantes de 20 µm d'épaisseur préparées au microtome à congélation sont incubées 24 heures à +4°C avec un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la TH et dilué au 1/500^{e} (US Biological, MA). L'immunoréactivité est mise en évidence après les étapes suivantes : *i)* incubation pendant 1 heure à température ambiante avec un anticorps secondaire biotinylé dirigé contre les immunoglobulines de lapin, *ii)* incubation pendant 1 heure à température ambiante avec un complexe avidine-biotine couplé à une peroxydase (kit Vectastain, Vector Laboratories, France), *iii)* révélation de l'activité peroxydase par ajout de substrat, la diaminobenzidine, qui produit un précipité brun en présence d'eau oxygénée.

2. Triple marquage immunofluorescent

La détection simultanée de plusieurs antigènes a été effectuée par immunofluorescence sur des coupes de cerveau de souris. Les différents anticorps utilisés sont présentés en Table7.

Table 7							
Description des anticorps utilisés en immunofluorescence chez la souris							
Marqueur	**Expression cellulaire ou immunogène**	**Dilution**	**Fournisseur**	**Référence**	**Type**	**Espèce hôte**	**Temps d'incubation**
CCL3	Chimiokine CCL3	1/100	R§D Systems	AF-450-NA	Polyclonal	Chèvre	48 h
CCL4	Chimiokine CCL4	1/100	R§D Systems	AF-451-NA	Polyclonal	Chèvre	48 h
CXCL10	Chimiokine CXCL10	1/100	R§D Systems	AF-466-NA	Polyclonal	Chèvre	48 h
GFAP	Astrocytes	1/4000	Dako	Z0334	Polyclonal	Lapin	48 h
Iba1	Microglies	1/500	Wako	019-19741	Polyclonal	Lapin	48 h
PECAM1	Endothéliumvasculaire	1/15	Abcam	ab28364	Polyclonal	Lapin	48 h
TH	Neurones dopaminergiques	1/500	Immunostar	22941	Monoclonal	Souris	48 h

La révélation du marquage est réalisée avec des anticorps secondaires dirigés contre les immunoglobulines de l'espèce chez laquelle l'anticorps primaire a été produit. Ces anticorps secondaires, produits chez l'âne, étaient directement couplés à un fluorochrome (Alexa 488, 555 ou 647 ; Life Technologies, CA), utilisés à une dilution 1/1000^{e} et incubés 1 heure.

Les tests de spécificité de l'immunomarquage ont consisté d'une part à pré-incuber l'anticorps primaire avec la protéine en excès (50 fois) pendant 3 heures à température ambiante (test d'immunoadsorption), d'autre part omettre l'anticorps primaire lors du protocole expérimental.

Les immunomarquages fluorescents ont été examinés à l'aide soit *i)* d'un microscope Zeiss Axioplan 2 équipé d'une caméra CCD et d'un système d'analyse d'image utilisant le logiciel FluoUp 1.0 (Exploranova, France), *ii)* d'un Microscope droit Olympus FV-1000 et d'un système d'analyse d'image utilisant le logiciel Olympus FV-1000 software pour l'imagerie confocale. La taille des sections virtuelles en Z était de 0,25 µm.

3. Quantification des neurones TH+

Un microscope Leitz équipé d'une platine motorisée et couplé à un analyseur d'image (Mercator, Explora Nova, France) a été utilisé pour compter les neurones dopaminergiques de la SNpc de souris. Dans un premier temps, les frontières anatomiques de la SNpc ont été tracées à l'objectif x4 selon des critères définis par l'atlas Paxinos et du manuscrit de German et coll. (German et coll., 1996 ; Paxinos, 2001). Dans un deuxième temps les neurones TH+, au sein de la SNpc, ont été pointés à l'objectif x40.

La quantification des neurones dopaminergiques a été réalisée sur un hémisphère et sur des coupes régulièrement espacées de 200 µm (soit 10 coupes de 20 µm) nous

permettant d'analyser l'ensemble de la SNpc sur son développement rostro-caudal. Une estimation du nombre de neurones TH+ dans la SNpc est alors calculée en utilisant la formule suivante :

$10 \times [0 + z_1)/2 + (z_1 + z_2)/2 + \ldots + (z_{14} + 0)/2]$ avec zi, le nombre de neurones sur la coupe 1, 2, …, 10.

VI. Analyse statistique

Les groupes sont comparés deux à deux en utilisant un test t de Student. Dans les cas où la distribution n'était pas normale ou l'égalité des variances n'était pas atteinte, nous avons comparé les groupes grâce à un test non paramétrique de Mann-Whitney (Logiciel Sigmaplot, Systat Software).

Les comparaisons entre plusieurs groupes, dont les valeurs suivaient une distribution normale et une égalité des variances, ont été effectuées avec une ANOVA à 1, 2 ou 3 facteurs suivie d'une analyse *post-hoc* (méthode de Holm-Sidak). Dans le cas contraire, un ANOVA sur les rangs suivi d'une analyse *post-hoc* (méthode de Dunn) a permis de comparer les groupes.

Les analyses de corrélation ont été effectuées grâce au test de Spearman.

Dans toutes les analyses l'hypothèse nulle a été rejetée pour une valeur de $p \leq 0,05$.

ANNEXE 1 : Gènes détectés avec les membranes d'oligoarrays

Gènes détectés sur les membranes Mouse Chemokines & Receptors

Symbole	Description
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Agtrl1	Angiotensin receptor-like 1
Arts1	Type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator
Bdnf	Brain derived neurotrophic factor
Blr1	Burkitt lymphoma receptor 1
Bmp10	Bone morphogenetic protein 10
Bmp15	Bone morphogenetic protein 15
Bmp6	Bone morphogenetic protein 6
Ccbp2	Chemokine binding protein 2
Ccl1	Chemokine (C-C motif) ligand 1
Ccl11	Small chemokine (C-C motif) ligand 11
Ccl12	Chemokine (C-C motif) ligand 12
Ccl17	Chemokine (C-C motif) ligand 17
Ccl19	Chemokine (C-C motif) ligand 19
Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
Ccl20	Chemokine (C-C motif) ligand 20
Ccl21a	Chemokine (C-C motif) ligand 21a
Ccl22	Chemokine (C-C motif) ligand 22
Ccl24	Chemokine (C-C motif) ligand 24
Ccl25	Chemokine (C-C motif) ligand 25
Ccl27	Chemokine (C-C motif) ligand 27
Ccl28	Chemokine (C-C motif) ligand 28
Ccl3	Chemokine (C-C motif) ligand 3
Ccl4	Chemokine (C-C motif) ligand 4
Ccl5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
Ccl6	Chemokine (C-C motif) ligand 6
Ccl7	Chemokine (C-C motif) ligand 7
Ccl8	Chemokine (C-C motif) ligand 8
Ccl9	Chemokine (C-C motif) ligand 9
Ccr1	Chemokine (C-C motif) receptor 1
Ccr1l1	Chemokine (C-C motif) receptor 1-like 1
Ccr2	Chemokine (C-C motif) receptor 2
Ccr3	Chemokine (C-C motif) receptor 3
Ccr4	Chemokine (C-C motif) receptor 4
Ccr5	Chemokine (C-C motif) receptor 5
Ccr6	Chemokine (C-C motif) receptor 6
Ccr7	Chemokine (C-C motif) receptor 7
Ccr8	Chemokine (C-C motif) receptor 8
Ccr9	Chemokine (C-C motif) receptor 9
Ccrl1	Chemokine (C-C motif) receptor-like 1
Ccrl2	Chemokine (C-C motif) receptor-like 2
Cmtm2a	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 2A
Cmtm2b	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 2B
Cmtm3	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 3
Cmtm4	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 4
Cmtm5	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 5
Cmtm6	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 6
Cmtm7	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 7
Cmtm8	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 8
Cmklr1	Chemokine-like receptor 1
Cxcr7	Chemokine (C-X-C motif) receptor 7
Csf1	Colony stimulating factor 1 (macrophage)
Csf2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
Csf3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)
Cx3cl1	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
Cx3cr1	Chemokine (C-X3-C) receptor 1
Cxcl1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
Cxcl10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
Cxcl11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11
Cxcl12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12
Cxcl13	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13
Cxcl14	Chemokine (C-X-C motif) ligand 14
Cxcl15	Chemokine (C-X-C motif) ligand 15
Cxcl16	Chemokine (C-X-C motif) ligand 16
Cxcl2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2
Cxcl4	Chemokine (C-X-C motif) ligand 4
Cxcl5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5
Ppbp	Pro-platelet basic protein
Cxcl9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
Cxcr3	Chemokine (C-X-C motif) receptor 3
Cxcr4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4
Cxcr6	Chemokine (C-X-C motif) receptor 6
Cyfip2	Cytoplasmic FMR1 interacting protein 2
Darc	Duffy blood group, chemokine receptor
Ecgf1	Endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)
Epo	Erythropoietin
Gdf5	Growth differentiation factor 5
Gpr109a	G-protein-coupled receptor 109A
Ccr10	Chemokine (C-C motif) receptor 10
Gpr77	G-protein-coupled receptor 77
Gpr81	G-protein-coupled receptor 81
Hc	Hemolytic complement
Hif1a	Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit
Il13	Interleukin 13
Il16	Interleukin 16
Il18	Interleukin 18
Il1a	Interleukin 1 alpha
Il4	Interleukin 4
Il8ra	Interleukin 8 receptor, alpha
Il8rb	Interleukin 8 receptor, beta
Inha	Inhibin alpha
Inhbb	Inhibin beta-B
Lif	Leukemia inhibitory factor
Ifnz	Interferon zeta
Ltb4r2	Leukotriene B4 receptor 2
Mmp2	Matrix metallopeptidase 2
Mmp7	Matrix metallopeptidase 7
Myd88	Myeloid differentiation primary response gene 88
Nfkb1	Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1, p105
Prl	Prolactin
Rgs13	Regulator of G-protein signaling 13
Rgs3	Regulator of G-protein signaling 3
Scye1	Small inducible cytokine subfamily E, member 1
Sdf2	Stromal cell derived factor 2
Slit2	Slit homolog 2 (Drosophila)
Tapbp	TAP binding protein
Tcp10c	T-complex protein 10c
Tlr2	Toll-like receptor 2
Tlr4	Toll-like receptor 4
Tnf	Tumor necrosis factor
Tnfrsf1a	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a
Tnfsf14	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14
Trem1	Triggering receptor expressed on myeloid cells 1
Xcl1	Chemokine (C motif) ligand 1
PUC18	PUC18 Plasmid DNA
Xcr1	Chemokine (C motif) receptor 1
Blank	
AS1R2	Artificial Sequence 1 Related 2 (80% identity)(48/60)
AS1R1	Artificial Sequence 1 Related 1 (90% identity)(54/60)
AS1	Artificial Sequence 1
Rps27a	Ribosomal protein S27a
B2m	Beta-2 microglobulin
Hsp90ab1	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1
Hsp90ab1	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1
Ppia	Peptidylprolyl isomerase A
Ppia	Peptidylprolyl isomerase A
BAS2C	Biotinylated Artificial Sequence 2 Complementary sequence
BAS2C	Biotinylated Artificial Sequence 2 Complementary sequence

Gène de référence

Gènes détectés sur les membranes Mouse Extracellular Matrix and Adhesion Molecules					
Symbole	**Description**	**Symbole**	**Description**	**Symbole**	**Description**
Gapdh	**Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase**	Itga2	Integrin alpha 2	Mmp3	Matrix metallopeptidase 3
Adamts1	A disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	Itga2b	Integrin alpha 2b	Mmp7	Matrix metallopeptidase 7
Adamts2	A disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 2	Itga3	Integrin alpha 3	Mmp8	Matrix metallopeptidase 8
Adamts5	A disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 5 (aggrecanase-2)	Itga4	Integrin alpha 4	Mmp9	Matrix metallopeptidase 9
Adamts8	A disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 8	Itga5	Integrin alpha 5 (fibronectin receptor alpha)	Ncam1	Neural cell adhesion molecule 1
Ctnna1	Catenin (cadherin associated protein), alpha 1	Itga6	Integrin alpha 6	Ncam2	Neural cell adhesion molecule 2
Ctnna2	Catenin (cadherin associated protein), alpha 2	Itga7	Integrin alpha 7	Pecam1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1
Ctnnb1	Catenin (cadherin associated protein), beta 1	Itga8	Integrin alpha 8	Postn	Periostin, osteoblast specific factor
Cd44	CD44 antigen	Itgae	Integrin, alpha E, epithelial-associated	Sele	Selectin, endothelial cell
Cdh1	Cadherin 1	Itgal	Integrin alpha L	Sell	Selectin, lymphocyte
Cdh2	Cadherin 2	Itgam	Integrin alpha M	Selp	Selectin, platelet
Cdh3	Cadherin 3	Itgav	Integrin alpha V	Sgce	Sarcoglycan, epsilon
Cdh4	Cadherin 4	Itgax	Integrin alpha X	Sparc	Secreted acidic cysteine rich glycoprotein
Cdh5	Cadherin 5	Itgb1	Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)	Spock1	Sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 1
Cntn1	Contactin 1	Itgb2	Integrin beta 2	Spp1	Secreted phosphoprotein 1
Col11a1	Procollagen, type XI, alpha 1	Itgb3	Integrin beta 3	Syt1	Synaptotagmin I
Col11a2	Procollagen, type XI, alpha 2	Itgb4	Integrin beta 4	Tgfbi	Transforming growth factor, beta induced
Col18a1	Procollagen, type XVIII, alpha 1	Itgb5	Integrin beta 5	Thbs1	Thrombospondin 1
Col1a1	Procollagen, type I, alpha 1	Itgb6	Integrin beta 6	Thbs2	Thrombospondin 2
Col24a1	Procollagen, type XXIV, alpha 1	Itgb7	Integrin beta 7	Thbs3	Thrombospondin 3
Col27a1	Procollagen, type XXVII, alpha 1	Lama1	Laminin, alpha 1	Thbs4	Thrombospondin 4
Col2a1	Procollagen, type II, alpha 1	Lama2	Laminin, alpha 2	Timp1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1
Col3a1	Procollagen, type III, alpha 1	Lama3	Laminin, alpha 3	Timp2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2
Col4a1	Procollagen, type IV, alpha 1	Lama4	Laminin, alpha 4	Timp3	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3
Col4a2	Procollagen, type IV, alpha 2	Lama5	Laminin, alpha 5	Timp4	Tissue inhibitor of metalloproteinase 4
Col4a3	Procollagen, type IV, alpha 3	Lamb1-1	Laminin B1 subunit 1	Tnc	Tenascin C
Col4a6	Procollagen, type IV, alpha 6	Lamb2	Laminin, beta 2	Vcam1	Vascular cell adhesion molecule 1
Col5a1	Procollagen, type V, alpha 1	Lamb3	Laminin, beta 3	Vtn	Vitronectin
Col5a3	Procollagen, type V, alpha 3	Lamc1	Laminin, gamma 1	PUC18	PUC18 Plasmid DNA
Col6a1	Procollagen, type VI, alpha 1	Mmp10	Matrix metallopeptidase 10	Blank	
Col6a2	Procollagen, type VI, alpha 2	Mmp11	Matrix metallopeptidase 11	Blank	
Col8a1	Procollagen, type VIII, alpha 1	Mmp12	Matrix metallopeptidase 12	AS1R2	Artificial Sequence 1 Related 2 (80% identity)(48/60)
Col9a1	Procollagen, type IX, alpha 1	Mmp13	Matrix metallopeptidase 13	AS1R1	Artificial Sequence 1 Related 1 (90% identity)(54/60)
Vcan	Versican	Mmp14	Matrix metallopeptidase 14 (membrane-inserted)	AS1	Artificial Sequence 1
Ctgf	Connective tissue growth factor	Mmp15	Matrix metallopeptidase 15	Rps27a	Ribosomal protein S27a
Ecm1	Extracellular matrix protein 1	Mmp16	Matrix metallopeptidase 16	B2m	Beta-2 microglobulin
Emilin1	Elastin microfibril interfacer 1	Mmp17	Matrix metallopeptidase 17	Hsp90ab1	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1
Entpd1	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	Mmp19	Matrix metallopeptidase 19	Hsp90ab1	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1
Fbln1	Fibulin 1	Mmp1a	Matrix metallopeptidase 1a (interstitial collagenase)	Ppia	Peptidylprolyl isomerase A
Fn1	Fibronectin 1	Mmp2	Matrix metallopeptidase 2	Ppia	Peptidylprolyl isomerase A
Hapln1	Hyaluronan and proteoglycan link protein 1	Mmp20	Matrix metallopeptidase 20 (enamelysin)	BAS2C	Biotinylated Artificial Sequence 2 Complementary sequence
Hc	Hemolytic complement	Mmp23	Matrix metallopeptidase 23	BAS2C	Biotinylated Artificial Sequence 2 Complementary sequence
Icam1	Intercellular adhesion molecule	Mmp24	Matrix metallopeptidase 24		**Gene de référence**

ANNEXE 2 : Gènes détectés avec les cartes microfluidiques TaqMan®

Gènes détectés sur les cartes microfluidiques TaqMan

Symbole	Description	Symbole	Description	Symbole	Description
Nt5e	5 nucleotidase, ecto	Jam3	junction adhesion molecule 3	Cxcl13;46314 12M08Rik	chemokine (C-X-C motif) ligand 13;RIKEN cDNA 4631412M08 gene
Dpp4	dipeptidylpeptidase 4	Esam	endothelial cell-specific adhesion molecule	Cxcl14	chemokine (C-X-C motif) ligand 14
Aoc3	amine oxidase, copper containing 3	Ocln	occludin	Cxcl15	chemokine (C-X-C motif) ligand 15
Cd38	CD38 antigen	Cldn1	claudin 1	Cxcl16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16
Itga2	integrin alpha 2	Cldn3	claudin 3	Cxcl17	chemokine (C-X-C motif) ligand 17
Itga2b	integrin alpha 2b	Cldn5	claudin 5	Cx3cl1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
Itga3	integrin alpha 3	Tjp1	tight junction protein 1	Xcl1	chemokine (C motif) ligand 1
Itga4	integrin alpha 4	Mmp13	matrix metallopeptidase 13	Ccr1	chemokine (C-C motif) receptor 1
Itga5	integrin alpha 5 (fibronectin receptor alpha)	Mmp2	matrix metallopeptidase 2	Ccr1l1	chemokine (C-C motif) receptor 1-like 1
Itga6	integrin alpha 6	Mmp3	matrix metallopeptidase 3	Ccr2	chemokine (C-C motif) receptor 2
18S	Eukaryotic 18S rRNA	Mmp7	matrix metallopeptidase 7	Ccrl2	chemokine (C-C motif) receptor-like 2
18S	Eukaryotic 18S rRNA	Mmp9	matrix metallopeptidase 9	Ccr3	chemokine (C-C motif) receptor 3
Itga7	integrin alpha 7	Mmp14	matrix metallopeptidase 14 (membrane-inserted)	Ccr4	chemokine (C-C motif) receptor 4
Itga8	integrin alpha 8	Timp1	TIMP metallopeptidase inhibitor 1	Ccr5	chemokine (C-C motif) receptor 5
Itga9	integrin alpha 9	Timp2	TIMP metallopeptidase inhibitor 2	Ccr6	chemokine (C-C motif) receptor 6
Itga10	integrin, alpha 10	Timp4	tissue inhibitor of metalloproteinase 4	Ccr7	chemokine (C-C motif) receptor 7
Itga11	integrin alpha 11	Ifnb1	interferon beta 1, fibroblast	Ccr8	chemokine (C-C motif) receptor 8
Itgae	integrin alpha E, epithelial-associated	Ifng	interferon gamma	Ccr9	chemokine (C-C motif) receptor 9
Itgal	integrin alpha L	Tnf	tumor necrosis factor	Ccr10	chemokine (C-C motif) receptor 10
Itgam	integrin alpha M	Tgfb1	transforming growth factor, beta 1	Il8ra	interleukin 8 receptor, alpha
Itgav	integrin alpha V	Il1b	interleukin 1 beta	Il8rb	interleukin 8 receptor, beta
Itgax	integrin alpha X	Il1r1	interleukin 1 receptor, type I	Cxcr3	chemokine (C-X-C motif) receptor 3
Itgb1	integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)	Il2	interleukin 2	Cxcr4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
Itgb2	integrin beta 2	Il4	interleukin 4	Cxcr5	chemochine (C-X-C motif) receptor 5
Itgb3	integrin beta 3	Il10	interleukin 10	Cxcr6	chemokine (C-X-C motif) receptor 6
Itgb4	integrin beta 4	Il12a	interleukin 12a	Cxcr7	chemokine (C-X-C motif) receptor 7
Itgb5	integrin beta 5	Il12b	interleukin 12b	Cx3cr1	chemokine (C-X3-C) receptor 1
Itgb6	integrin beta 6	Il17a	interleukin 17A	Xcr1	chemokine (C motif) receptor 1
Itgb7	integrin beta 7	Gdnf	glial cell derived neurotrophic factor	Cklf	chemokine-like factor
Itgb8	integrin beta 8	Ntf3	neurotrophin 3	Cmklr1	chemokine-like receptor 1
Sele	selectin, endothelial cell	Ngf	nerve growth factor (beta polypeptide)	Ccbp2	chemokine binding protein 2
Sell	selectin, lymphocyte	Bdnf	brain derived neurotrophic factor	Darc	Duffy blood group, chemokine receptor
Selp	selectin, platelet	Ccl1	chemokine (C-C motif) ligand 1	Ccrl1	chemokine (C-C motif) receptor-like 1
Selplg	selectin, platelet (p-selectin) ligand	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	Cd47	CD47 antigen (Rh-related antigen, integrin-associated signal transducer)
18S	Eukaryotic 18S rRNA	Ccl3	chemokine (C-C motif) ligand 3	Trem2	triggering receptor expressed on myeloid cells 2
18S	Eukaryotic 18S rRNA	Ccl4	chemokine (C-C motif) ligand 4	Th	tyrosine hydroxylase
Lama1	laminin, alpha 1	Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5	Gfap	glial fibrillary acidic protein
Lama2	laminin, alpha 2	Ccl6	chemokine (C-C motif) ligand 6	Gfap	glial fibrillary acidic protein
Lama4	laminin, alpha 4	Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7	Cd3d	CD3 antigen, delta polypeptide
Lama5	laminin, alpha 5	Ccl8	chemokine (C-C motif) ligand 8	Cd3e	CD3 antigen, epsilon polypeptide
Lamb1-1	laminin B1 subunit 1	Ccl9	chemokine (C-C motif) ligand 9	Cd3g	CD3 antigen, gamma polypeptide
Lamb2	laminin, beta 2	Ccl11	chemokine (C-C motif) ligand 11	Snca	synuclein, alpha
Lamb3	laminin, beta 3	Ccl12	chemokine (C-C motif) ligand 12	Aldh1l1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1
Lamc1	laminin, gamma 1	Ccl17	chemokine (C-C motif) ligand 17	Maob	monoamine oxidase B
Lamc2	laminin, gamma 2	Ccl19	chemokine (C-C motif) ligand 19	H2-K1	histocompatibility 2, K1, K region
Lamc3	laminin gamma 3	Ccl20	chemokine (C-C motif) ligand 20	H2-D1	histocompatibility 2, D region locus 1
Rpsa	ribosomal protein SA	Ccl21c;Ccl21a; Ccl21b	chemokine (C-C motif) ligand 21C (leucine);chemokine (C-C motif) ligand 21A;chemokine (C-C motif) ligand 21B	B2m	beta-2 microglobulin
Cdh1	cadherin 1	Ccl22	chemokine (C-C motif) ligand 22	Lilrb3	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 3
Cdh2	cadherin 2	Ccl24	chemokine (C-C motif) ligand 24	Foxp3	forkhead box P3
Cdh3	cadherin 3	Ccl25	chemokine (C-C motif) ligand 25	Tbx21	T-box 21
Cdh4	cadherin 4	Ccl26	chemokine (C-C motif) ligand 26	Gata3	GATA binding protein 3
Cdh5	cadherin 5	Ccl27a	chemokine (C-C motif) ligand 27A	Rorc	RAR-related orphan receptor gamma
Pcdh12	protocadherin 12	Ccl27a	chemokine (C-C motif) ligand 27A	Hspd1	heat shock protein 1 (chaperonin)
Cdh13	cadherin 13	Ccl28	chemokine (C-C motif) ligand 28	Cd200	Cd200 molecule
Pecam1	platelet/endothelial cell adhesion molecule 1	Cxcl1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Cd200r1	CD200 receptor 1
Icam1	intercellular adhesion molecule 1	Cxcl2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	Spp1	secreted phosphoprotein 1
Vcam1	vascular cell adhesion molecule 1	Cxcl3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	Cd44	CD44 antigen
Madcam1	mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1	Pf4	platelet factor 4	Cd22	CD22 antigen
Alcam	activated leukocyte cell adhesion molecule	Cxcl5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	**Hprt1**	**hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1**
Cd6	CD6 antigen	Ppbp	pro-platelet basic protein	**Hprt1**	**hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1**
Bcam	basal cell adhesion molecule	Cxcl9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	**Hprt1**	**hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1**
Mcam	melanoma cell adhesion molecule	Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	**Gapdh**	**glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase**
F11r	F11 receptor	Cxcl11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	**Gapdh**	**glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase**
Jam2	junction adhesion molecule 2	Cxcl12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	**Gapdh**	**glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase**

I. Caractérisation de l'expression des chimiokines et des molécules d'adhésion dans un modèle murin de maladie de parkinson

1. Etude transcriptomique

1.1. Oligoarrays

1.1.1 Présentation

Nous avons tout d'abord tenté d'analyser les modifications d'expression des chimiokines et des molécules d'adhésion dans le mésencéphale ventral de souris MPTP en utilisant des membranes de nylon imprimées de sondes oligonucléotidiques de 60 mer spécifiques pour nos gènes d'intérêt.

Trente et une souris ont été intoxiquées avec une dose cumulative de 80 mg/kg de MPTP-HCl. L'analyse a été réalisée en utilisant des ARN totaux extraits du mésencéphale ventral de souris contrôles ou intoxiquées par le MPTP 2 jours et 5 jours après l'intoxication, correspondant respectivement à la première vague d'infiltration lymphocytaire et à la phase de dégénérescence neuronale.

Avant d'hybrider les ARN sur les membranes, nous avons réalisé des analyses préliminaires par qPCR sur les ADNc obtenus à partir de ces échantillons afin de *i)* vérifier l'efficacité de l'intoxication au MPTP en mesurant les taux d'expression de la TH, *ii)* choisir les animaux présentant une lésion optimale et homogène dans les groupes expérimentaux.

1.1.2 Résumé des principaux résultats

Chez les souris intoxiquées au MPTP, nous avons observé une diminution significative de l'expression de la TH (31% à 2 jours et 25% à 5 jours), suggérant le développement d'une lésion nigrostriée chez ces animaux. Parallèlement, nous observons également une augmentation faible de l'expression des marqueurs gliaux GFAP (astrocytaire) et CD11b (microglial) (Figure 21). Toutefois, nous n'observons pas de corrélation entre l'expression de la TH et des marqueurs CD11b et GFAP. Pour les expériences de transcriptomique nous avons utilisé les souris intoxiquées au MPTP présentant une diminution de TH supérieure à

25%. Après sélection des animaux, la diminution de TH était en moyenne de 38% à 2 jours et 35% à 5 jours (Figure 22).

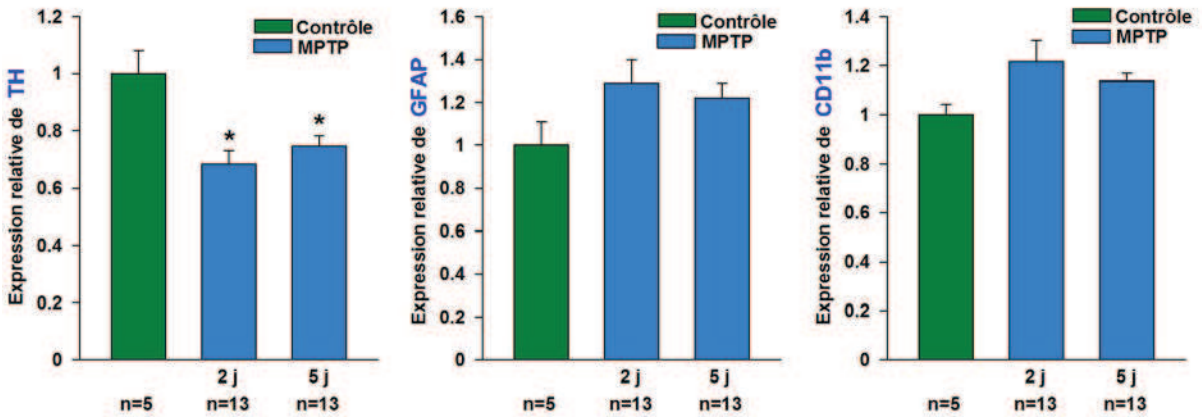


Figure 21 : Expression des marqueurs cellulaires dans le mésencéphale ventral de souris intoxiquées par le MPTP. L'expression de la TH est significativement diminuée après MPTP (ANOVA à deux facteurs, *, P<0,05 vs contrôles). L'expression de CD11b et GFAP n'est pas augmentée de façon significative.

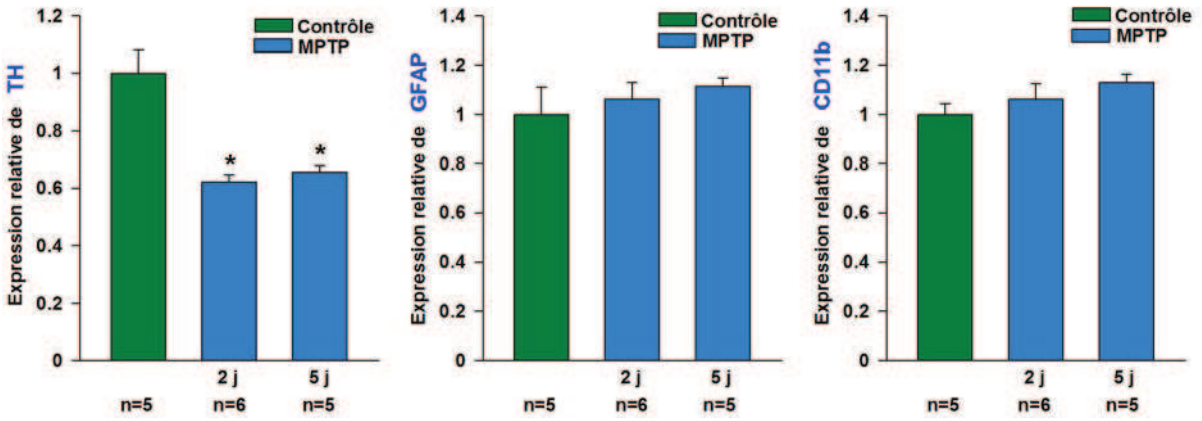


Figure 22 : Expression des marqueurs cellulaires dans le mésencéphale ventral de souris intoxiquées par le MPTP après sélection pour les Oligoarrays. L'expression de la TH est significativement diminuée après MPTP (ANOVA sur les rangs, *, P<0,05 vs contrôles). L'expression de CD11b et GFAP n'est pas augmentée de façon significative.

Plusieurs gènes de référence étaient présents sur ces membranes cependant nous avons utilisé uniquement la Gapdh car l'expression des autres gènes était significativement augmentée en condition MPTP ou l'intensité du marquage des points d'hybridation proches altérait l'analyse.

De manière générale, très peu de gènes étaient détectables aussi bien chez les souris contrôles que les souris intoxiquées au MPTP. Ainsi pour les membranes « chimiokines » 25 gènes ont été détectés. Ce qui représente seulement 20% des gènes représentés. Des

résultats similaires ont été obtenus pour les membranes « Matrice extracellulaire et Adhésion ».

Concernant la famille des chimiokines et en utilisant un facteur de significativité limite de p<0,05 et un facteur d'augmentation d'au moins 1,5, seule l'expression d'un gène, Cmtm3, était augmentée de façon significative 5 jours après l'intoxication au MPTP (augmentation de 1,74 fois) (Figure 23). Pour les familles des molécules d'adhésion et de la matrice extracellulaire, l'expression de 2 gènes, Lama2 et Col4a1 était significativement modifiée 5 jours après intoxication (augmentation de 2,12 et 2,56 fois ; p<0,05) (Figure 24).

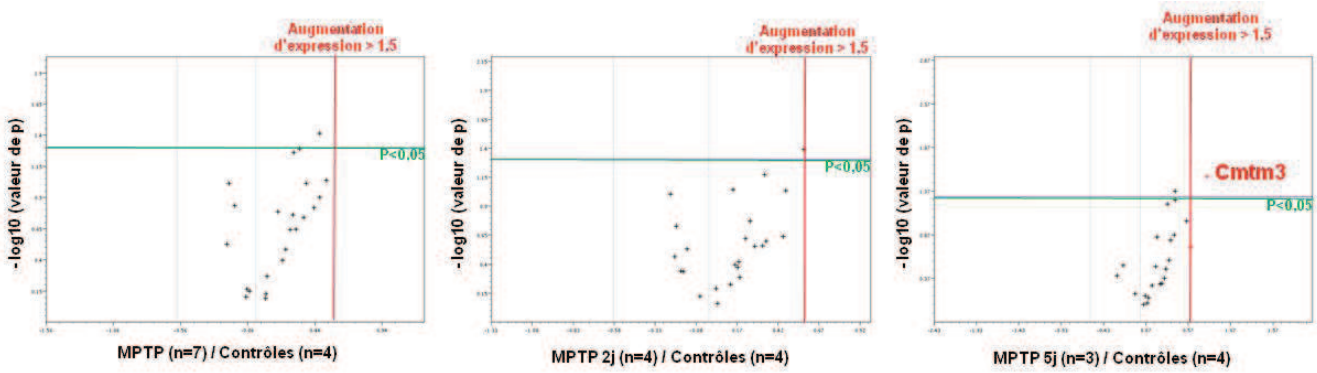


Figure 23 : Volcano plot représentant l'expression relative des chimiokines et la valeur de P chez les souris intoxiquées au MPTP par rapport aux contrôles.

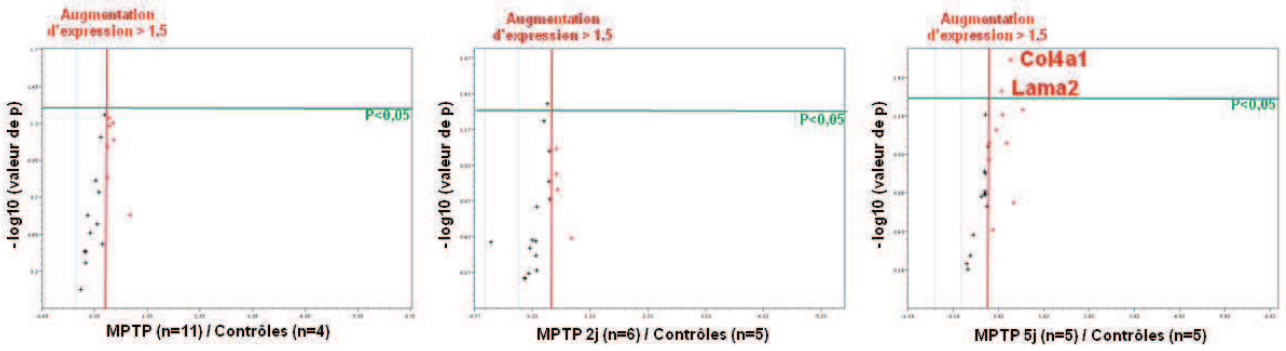


Figure 24 : Volcano plot représentant l'expression relative des molécules d'adhésion et de la matrice extracellulaire et la valeur de P chez les souris intoxiquées au MPTP par rapport aux contrôles.

Suspectant un manque de sensibilité de cette approche, nous avons en parallèle analysé l'expression de CCL2 dans nos groupes expérimentaux par qPCR. Comme le montre la figure 25, une augmentation significative d'expression de CCL2 de deux fois est observée chez les souris sacrifiées 2 jours après intoxication. Cette augmentation n'était pas retrouvée avec les oligoarrays.

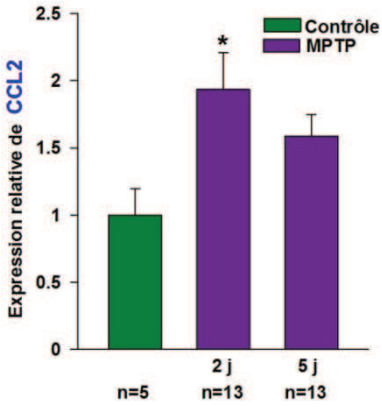


Figure 25 : Expression relative de CCL2 dans le mésencéphale ventral des souris salines et intoxiquées au MPTP pour les oligoarrays. L'expression de CCL2 est augmentée de façon significative 2 jours après l'intoxication (ANOVA sur les rangs, *, P<0,05 vs contrôles).

Au total l'ensemble de ces résultats nous a permis de conclure sur le manque de sensibilité de cette approche qui, de fait, n'était pas adaptée à notre modèle expérimental.

Nous avons donc décidé d'utiliser une méthodologie alternative basée sur la technologie TaqMan en cartes microfluidiques.

1.2. TaqMan Arrays

1.2.1 Présentation

Pour s'assurer qu'une faible dégénérescence nigrostriatale n'était pas un facteur supplémentaire à l'origine de la faible sensibilité des oligoarrays, nous avons à nouveau intoxiqué 40 souris au MPTP en augmentant la dose cumulative de toxine (de 80 à 94 mg/kg). Nous nous sommes cette fois-ci placés à 2 jours et 7 jours après intoxication au MPTP correspondant aux 2 pics majeurs d'infiltration des lymphocytes $CD4^+$ (Kurkowska-Jastrzebska et coll., 1999b ; Brochard et coll., 2009). Comme précédemment, nous avons au préalable vérifié la diminution d'expression de la TH dans le groupe de souris intoxiquées par le MPTP. Par ailleurs, afin de proposer un critère supplémentaire du niveau de lésion nigrostriée, nous avons étudié l'expression de plusieurs gènes sensés refléter l'état d'activation des cellules microgliales : CD11b, F4/80, CX3CR1, CD68, β2m.

1.2.2 Résumé des principaux résultats

La diminution d'expression de la TH observée dans les groupes de souris intoxiquées par le MPTP était sensiblement plus importante que pour les souris utilisées dans l'approche

oligoarrays (45% de perte à 2 jours et 7 jours contre 32% à 2 jours et 25% à 5 jours dans l'expérience précédente ; Figure 26).

De façon similaire à CD11b, l'expression des marqueurs microgliaux était modérément augmentée après intoxication par le MPTP. Le marqueur présentant l'augmentation la plus importante était CD68. Pour les expériences de TaqMan Arrays nous avons alors sélectionné les souris sur les critères de neuroinflammation, c'est-à-dire les animaux présentant l'expression de CD68 la plus élevée à 2 jours (en moyenne 245% contre 192% d'expression avant sélection) et 7 jours (186% contre 136% d'expression avant sélection) post-MPTP (Figures 26 et 27).

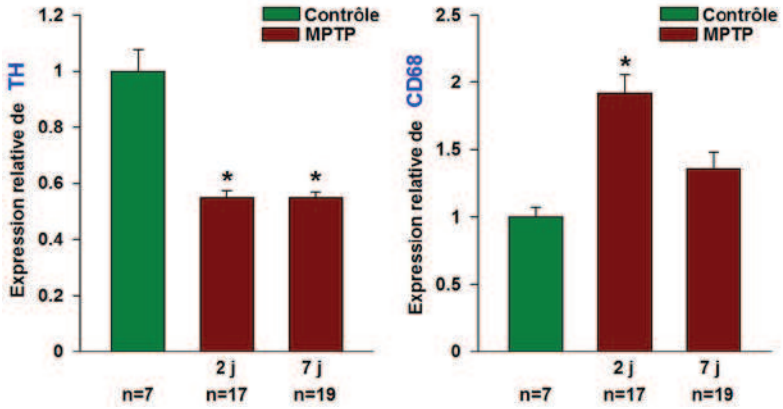


Figure 26 : Expression de la TH et de CD68 dans le mésencéphale ventral de souris injectées avec une solution saline ou du MPTP. L'expression de la TH est significativement diminuée à 2 jours et 7 jours après intoxication par le MPTP. L'expression de CD68 est significativement augmentée à 2 jours après intoxication par le MPTP (ANOVA sur les rangs, *, P<0,05 vs contrôles).

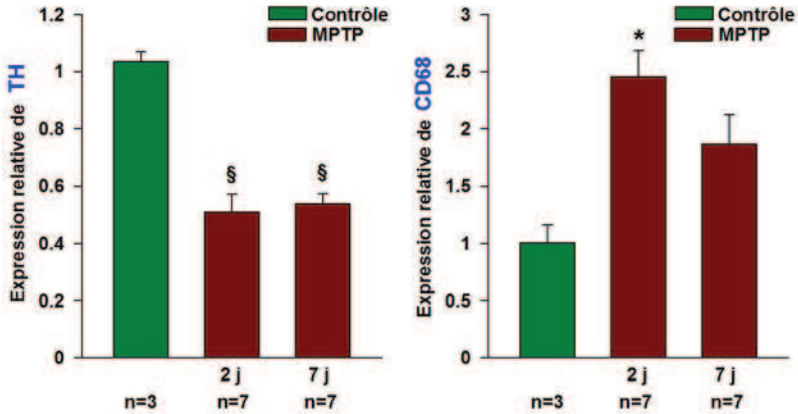


Figure 27 : Expression de la TH et de CD68 dans le mésencéphale ventral de souris injectées avec une solution saline ou du MPTP après sélection pour les qPCR Arrays. L'expression de la TH est significativement diminuée à 2 jours et 7 jours après intoxication par le MPTP. L'expression de CD68 est significativement augmentée à 2 jours après intoxication par le MPTP (ANOVA à 2 facteurs, §, P<0,05 vs contrôles ; ANOVA sur les rangs, *, P<0,05 vs contrôles).

Nos données de qPCR obtenues à partir des cartes microfluidiques confirment la diminution de TH chez les animaux intoxiqués au MPTP (Figure 28). De plus nous observons également une augmentation importante d'expression de marqueurs proinflammatoires tels que l'IFNγ, le TNFα et l'IL1-β. Enfin, nous observons une augmentation d'expression de la GFAP dès deux jours après intoxication suggérant le développement d'une gliose réactive associée à la dégénérescence dopaminergique (Figure 28).

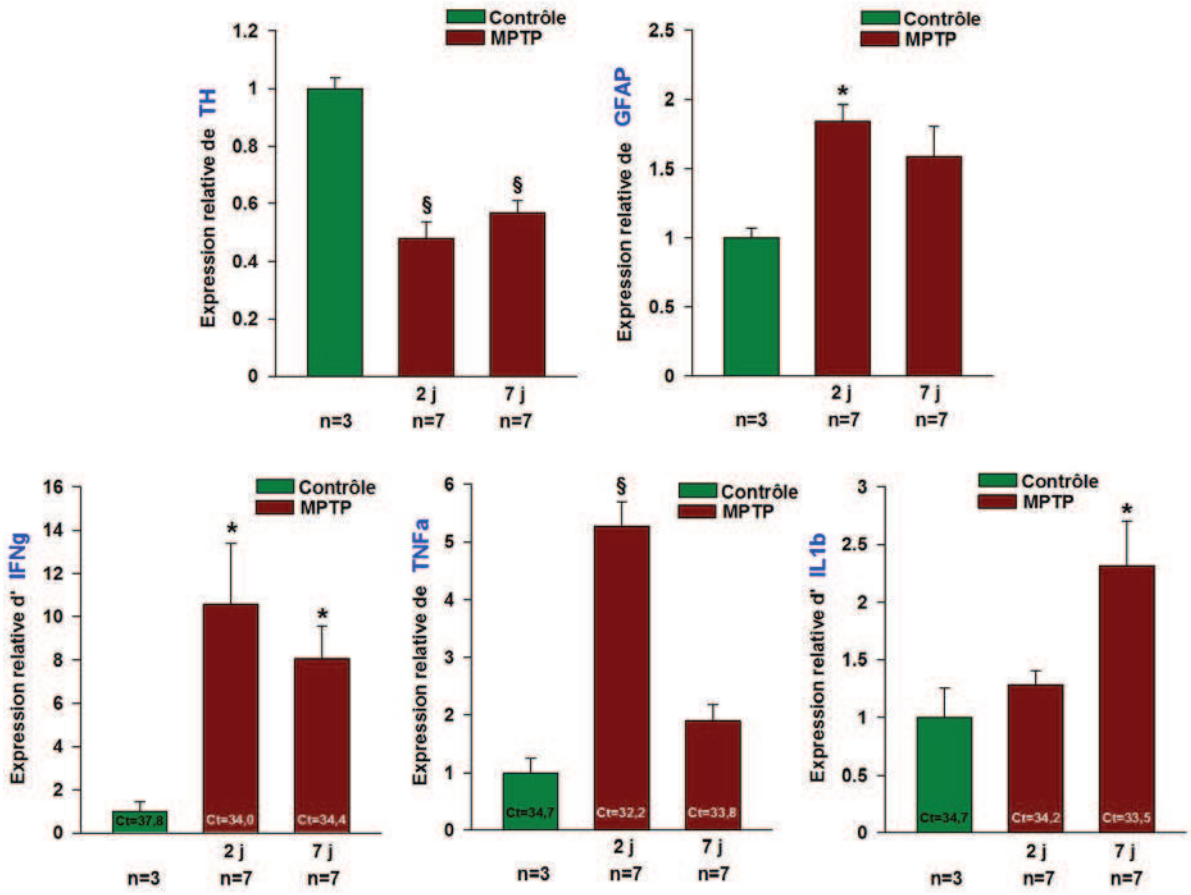


Figure 28 : Expression des marqueurs cellulaires dans le mésencéphale ventral de souris injectées avec une solution saline ou du MPTP. L'expression de la TH est significativement diminuée 2 et 7 jours après intoxication par le MPTP. L'expression de la GFAP et du TNfα est significativement augmentée 2 jours après intoxication par le MPTP. L'expression de l'IFNγ est significativement augmentée 2 et 7 jours après intoxication par le MPTP. L'expression de l'IL1β est significativement augmentée 7 jours après l'intoxication par le MPTP (ANOVA à 2 facteurs, §, P<0,05 vs contrôles ; ANOVA sur les rangs, *, P<0,05 vs contrôles).

S'agissant des chimiokines, nos résultats montrent une augmentation d'expression de CCL2, CCL3, CCL4, CCL12 et CXCL10 chez les animaux intoxiqués par le MPTP. Ces augmentations étaient considérables 2 jours post-MPTP (supérieures à 10 fois) pour CXCL10, CCL3 et CCL4 (Figure 29 A). Sept jours après intoxication, l'augmentation d'expression de ces facteurs chimiokiniques dans le mésencéphale ventral était plus modeste (entre 2 et 4 fois)

et pas statistiquement significative. L'expression des chimiokines CCL5, CCL6 et CCL9, quant à elle, augmente à 2 jours et reste augmentée de manière équivalente 7 jours post-MPTP (Figure 29 B).

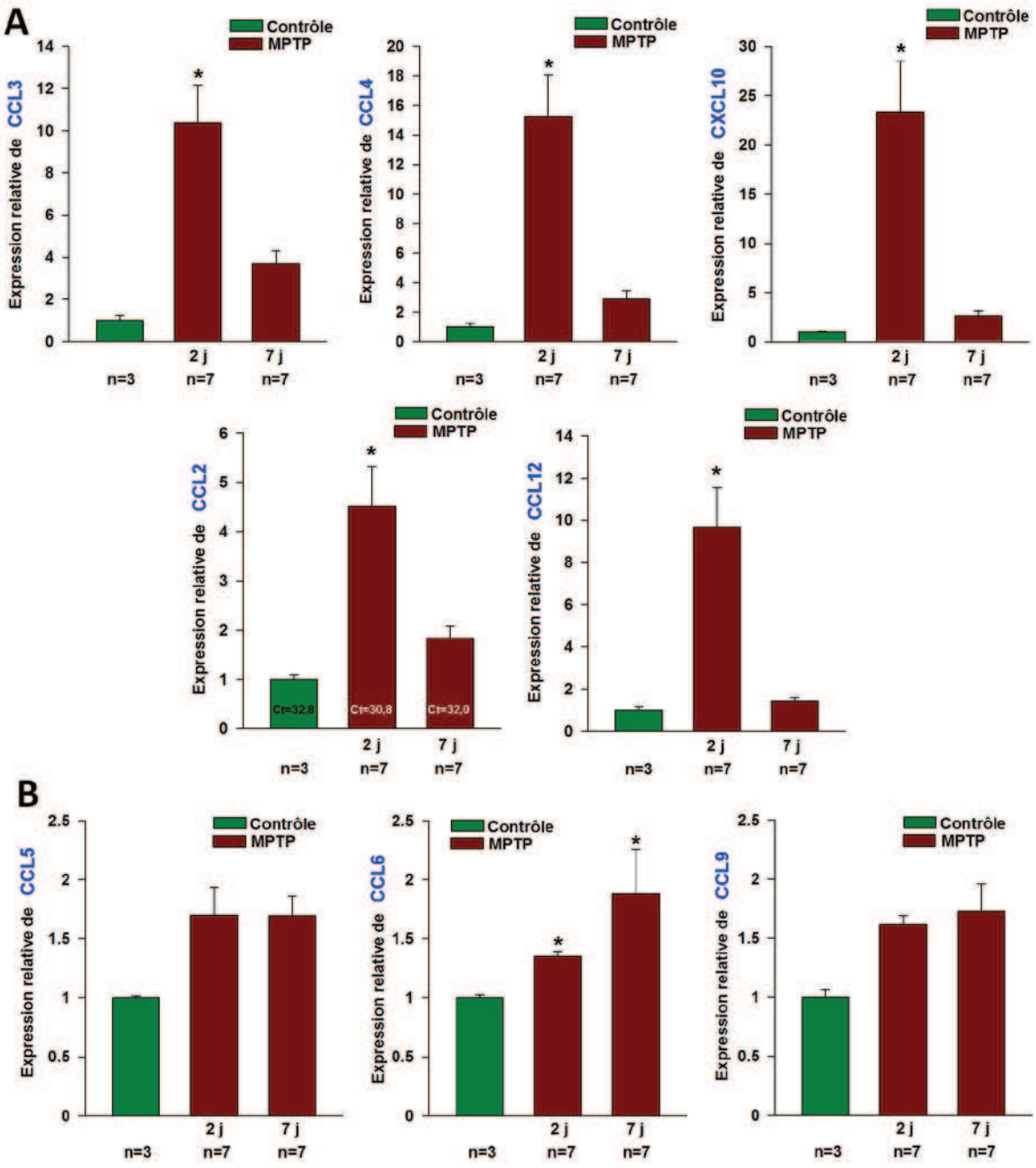


Figure 29 : Expression des chimiokines dans le mésencéphale ventral de souris injectées avec une solution saline ou du MPTP. A : L'expression de CCL2, CCL3, CCL4, CCL12 et CXCL10 est significativement augmentée 2 jours après intoxication par le MPTP et diminue à des niveaux quasi similaires à ceux des contrôles à 7 jours. B : L'expression des chimiokines CCL5, CCL6 et CCL9 est augmentée 2 post-MPTP et reste augmentée de manière équivalente à 7 jours post-MPTP. (ANOVA sur les rangs, *, P<0,05 vs contrôles).

S'agissant des molécules d'adhésion et des molécules de la matrice extracellulaire, leur expression n'était que faiblement modulée dans le mésencéphale ventral après l'intoxication par le MPTP. Toutefois une augmentation significative d'expression de l'intégrine Itgax (CD11c), marqueur des cellules dendritiques, a été détectée 2 et 7 jours après MPTP (2,5 et 5 fois respectivement, et significative à 7 jours, ANOVA sur les rangs, $P<0,05$).

Nous avons par ailleurs observé une augmentation de l'expression de TIMP1, inhibiteur de métalloprotéases, 2 jours après intoxication par le MPTP (augmentation de 4 fois, ANOVA sur les rangs, $P<0,05$).

Parallèlement à l'augmentation d'expression des facteurs chimiokiniques indiquée précédemment, il est intéressant de noter que nous avons également observé une augmentation d'expression significative du marqueur lymphocytaire T, CD3e, et de Tbx21 (T-bet), un marqueur des lymphocytes Th1, 7 jours après MPTP (Figure 30).

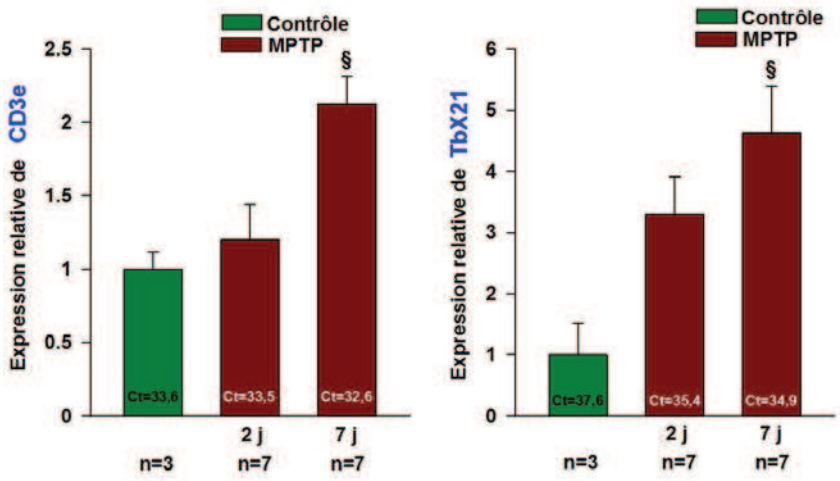


Figure 30 : Expression des marqueurs lymphocytaires dans le mésencéphale ventral de souris injectées avec une solution saline ou du MPTP. L'expression de CD3e et Tbx21 est significativement augmentée 2 jours après intoxication par le MPTP (ANOVA à 2 facteurs, §, $P<0,05$ vs contrôles).

Enfin, et pour conclure, nous observons dans l'ensemble une tendance à la diminution d'expression des récepteurs aux chimiokines 2 jours après intoxication par le MPTP. C'est le cas en particulier de CCR2, CCR3 et CXCR3.

Afin de confirmer nos résultats, nous avons vérifié l'augmentation d'expression de CXCL10 sur l'ensemble des mésencéphales ventraux de souris intoxiquées pour les Oligoarrays et les TaqMan® Arrays. Ainsi, nous avons pu confirmer l'augmentation d'expression de CXCL10 par des expériences de qPCR sur un très grand nombre d'échantillons. De façon intéressante, nous avons observé une diminution progressive d'expression de CXCL10 à 5 et 7 jours post-MPTP (Figure 31).

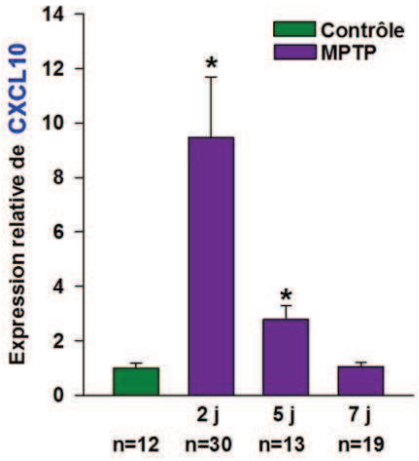


Figure 31 Expression de CXCL10 dans le mésencéphale ventral de souris contrôle ou intoxiquées au MPTP issus des expériences d'oligoarrays et de TaqMan arrays. L'expression de CXCL10 est augmentée 2 jours après MPTP puis diminue progressivement jusqu'à 7 jours (ANOVA sur les rangs, *, P<0,05 vs contrôles).

2. Caractérisation protéique

2.1. Détection des chimiokines par ELISA

2.1.1. Présentation

Après avoir établi les modifications d'expression des ARNm codant pour les chimiokines dans le mésencéphale ventral de souris intoxiquées au MPTP, nous avons utilisé la technique ELISA pour déterminer si cette augmentation se traduisait par des modifications identiques au niveau protéique. Nous avons focalisé notre analyse sur les chimiokines CCL3, CCL4 et CXCL10 fortement exprimées en condition MPTP.

2.1.2. Résumé des principaux résultats

Nos résultats confirment l'expression protéique de ces trois chimiokines dans le mésencéphale ventral des souris après MPTP (Figure 32). Par ailleurs, nous montrons que les

taux de CCL3, CCL4 et CXCL10 sont significativement augmentés 2 jours après intoxication par le MPTP.

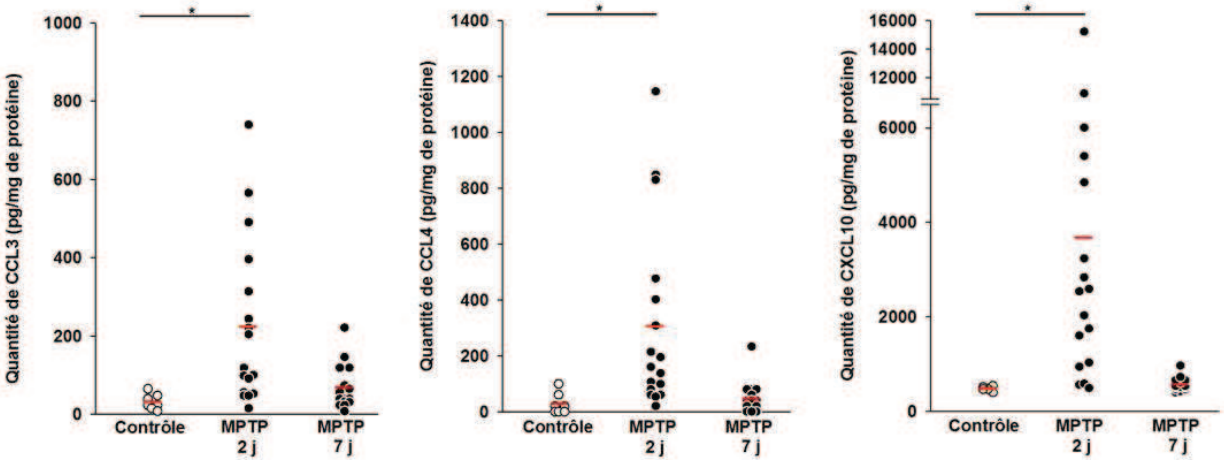


Figure 32 : Détection des chimiokines pas ELISA dans le mésencéphale ventral de souris injectées avec une solution saline ou du MPTP. L'expression de CCL3, CCL4 et CXCL10 est augmentée deux jours après intoxication au MPTP (ANOVA sur les rangs, *, P<0,05 vs contrôles).

De façon intéressant, nous observons également une parfaite corrélation entre les niveaux d'expression des ARN et ceux des protéines correspondantes au sein de chaque animal (Figure 33).

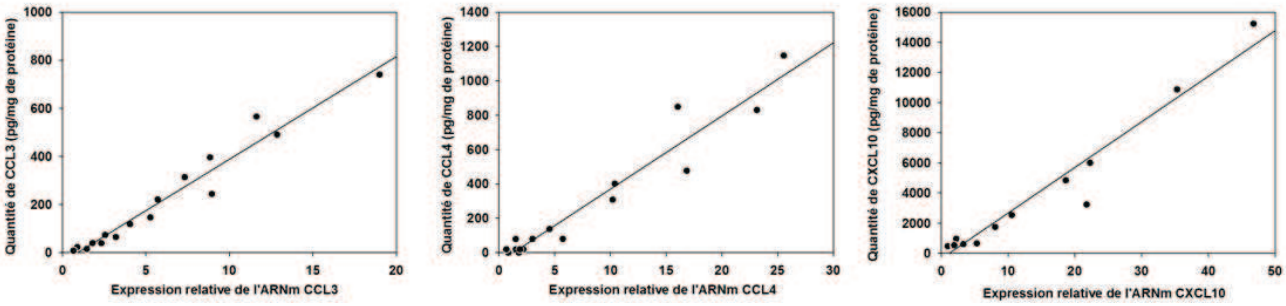


Figure 33 Corrélation entre les niveaux de chimiokines détectées en ELISA et en qPCR Arrays dans le mésencéphale ventral de souris ayant reçu une solution saline ou du MPTP. CCL3 : R^2=0,95, Coefficient de Spearman = 0,982 avec P<0,01 ; CCL4 : R^2=0,93, Coefficient de Spearman = 0,912 avec P<0,01 ; CXCL10 : R^2=0,95, Coefficient de Spearman = 0,986 avec P<0,01.

2.2. Détection des chimiokines par immunomarquages en fluorescence

Les biopuces TaqMan et les ELISA montrent une augmentation globale d'expression de CCL3, CCL4 et CXCL10 mais ne permettent pas de préciser la source cellulaire de ces ligands. Nous avons donc réalisé des triples immunomarquages en fluorescence.

2.2.1. Spécificité des anticorps dirigés contre les chimiokines

a) Présentation

Dans un premier temps, afin de nous assurer de la spécificité des anticorps utilisés, nous les avons testés chez des souris déficientes pour les chimiokines CCL3 et CXCL10. Nous n'avons pu effectuer ce test pour CCL4 car la lignée de souris déficiente pour ce facteur n'était pas disponible. Pour ces tests, nous avons utilisé un modèle murin de neuroinflammation provoquée par l'injection stéréotaxique de LPS dans la SNpc. La détection des facteurs chimiokiniques a été réalisée 24 heures après l'injection de LPS.

b) Résumé des principaux résultats

Dans ces conditions expérimentales, nos résultats montrent une forte expression nigrale de CCL3 et CXCL10 chez les souris LPS. Par ailleurs, les marquages CCL3 (Figures 34, A et B) et CXCL10 (Figure 35, A et B) disparaissaient quasi complètement (95%) chez les souris déficientes pour ces chimiokines. De plus nous avons vérifié que cette extinction du marquage n'était pas due à une absence d'inflammation chez les souris déficientes en effectuant les marquages CCL3 sur les coupes de souris déficientes pour CXCL10 et inversement (Figures 34 et 35, C).

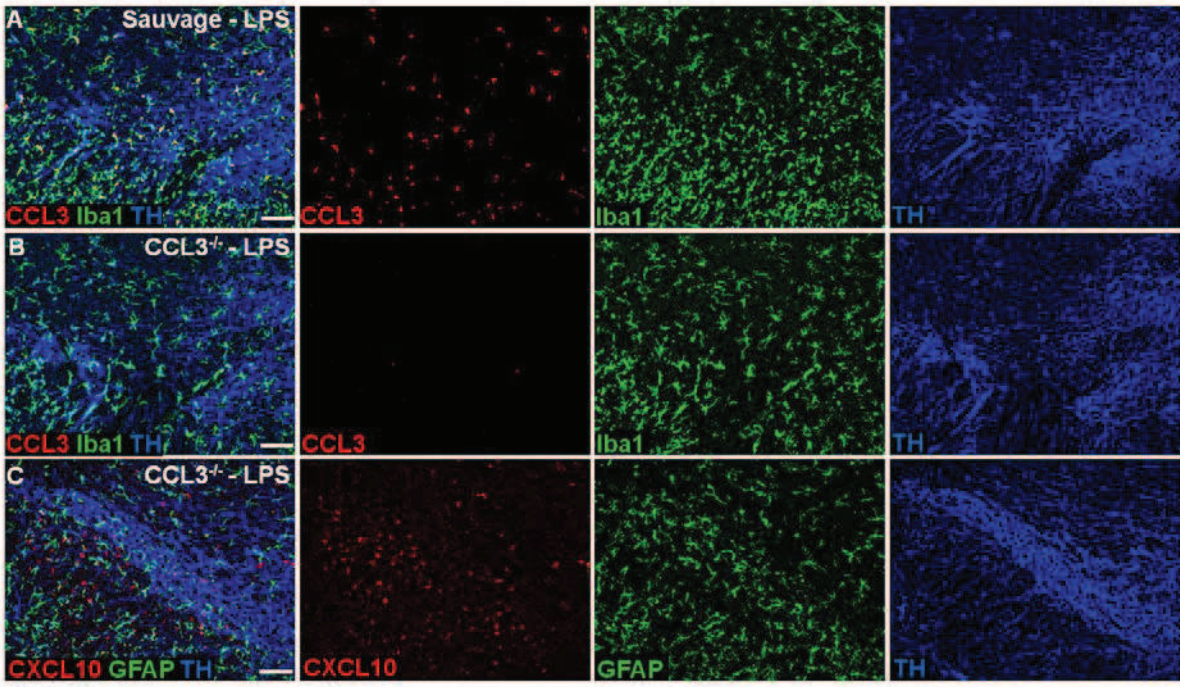


Figure 34 : Immunomarquages fluorescents de CCL3, CXCL10 (rouge), Iba1, GFAP (vert) et TH (bleu). A : CCL3 est exprimé dans la substance noire après injections de LPS dans le mésencéphale ventral. B : Le marquage de CCL3 est aboli chez les souris déficientes ayant reçu une injection de LPS dans le mésencéphale ventral. C : CXCL10 est exprimé chez les souris déficientes en CCL3 et injectées avec du LPS dans le mésencéphale ventral.

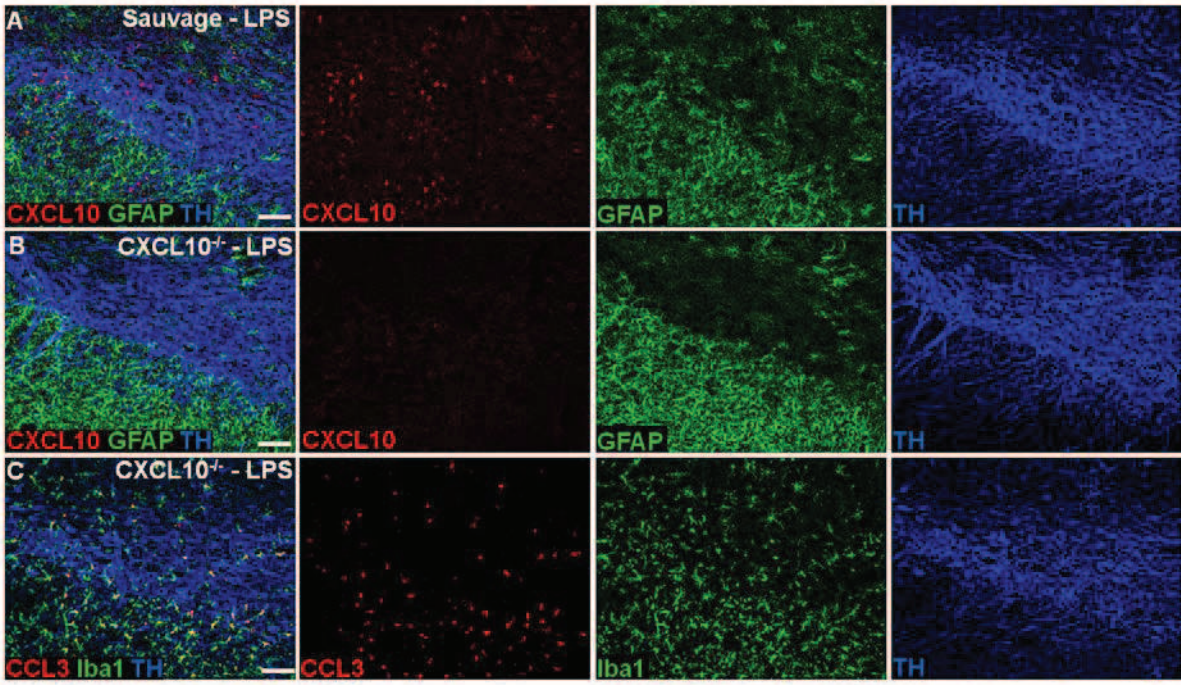


Figure 35 Immunomarquages fluorescents de CXCL10, CCL3 (rouge), GFAP, Iba1 (vert) et TH (bleu). A : CXCL10 est exprimé dans la substance noire après injections de LPS dans le mésencéphale ventral. B : Le marquage de CXCL10 est aboli chez les souris déficientes ayant reçu une injection de LPS dans le mésencéphale ventral. C : CCL3 est exprimé chez les souris déficientes en CXCL10 et injectées avec du LPS dans le mésencéphale ventral.

Au total, nos résultats attestent de la spécificité des anticorps anti-CCL3 et anti-CXCL10 chez la souris.

2.2.2. Détection des chimiokines par immunomarquage

a) Présentation

Afin d'identifier l'origine cellulaire des chimiokines CCL3, CCL4 et CXCL10 dans la SNpc des animaux lésés au MPTP, nous avons réalisé des expériences d'immunomarquage multiple. Les marqueurs cellulaires étaient :

- La TH pour marquer les neurones dopaminergiques
- Iba1 (ionized calcium binding adaptor 1) pour marquer les microglies
- La GFAP pour marquer les astrocytes
- PECAM1 pour marquer l'endothélium vasculaire

Cette étude a été réalisée sur le cerveau d'animaux sacrifiés 24 heures et 48 heures après l'intoxication au MPTP.

b) Résumé des principaux résultats

Tout d'abord nous avons pu mettre en évidence l'expression de CCL3 dans la SNpc à 1 et 2 jours après MPTP dans les cellules $Iba1^+$ (Figure 36). Aucune colocalisation de CCL3 avec la TH, la GFAP et PECAM1 n'a été observée, suggérant une production exclusivement microgliale de ce facteur (Figure 37). Par ailleurs aucune cellule CCL3 positive n'était détectée dans la substance noire *pars reticulata* (SNpr), zone de l'arborisation dendritique des neurones dopaminergiques nigraux (Figure 36).

La spécificité du marquage a été confirmée par : *i)* une disparition du signal lorsque l'anticorps primaire est pré-absorbé avec la protéine recombinante et *ii)* une absence de marquage lorsque l'anticorps secondaire dirigé contre Iba1, PECAM1 et GFAP n'a été incubé qu'avec l'anticorps primaire anti-CCL3 (Figure 38).

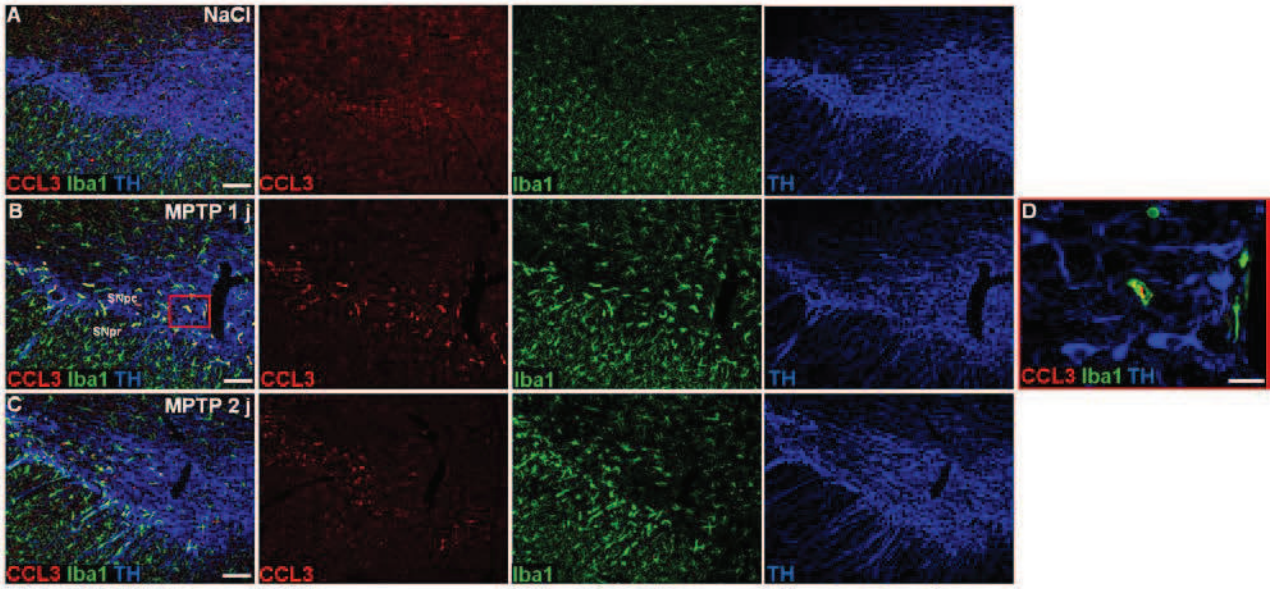


Figure 36 : Immunomarquages en fluorescence pour CCL3 (rouge), Iba1 (vert) et TH (bleu) dans la substance noire de souris intoxiquées au MPTP ou ayant reçu une solution saline. A : Un faible marquage CCL3 est observé dans la SNpc de souris salines. B : Un marquage CCL3 est observé dans les cellules Iba1$^+$ de la SNpc, 1 jour post-MPTP. C : Un marquage CCL3 est observé dans les cellules Iba1$^+$ de la SNpc, 2 jours post-MPTP. D : Agrandissement de l'encart rouge de l'image B, CCL3 est exprimé dans une cellule Iba1$^+$. Barres d'échelle : A, B, C : 100 µm, D 20 µm.

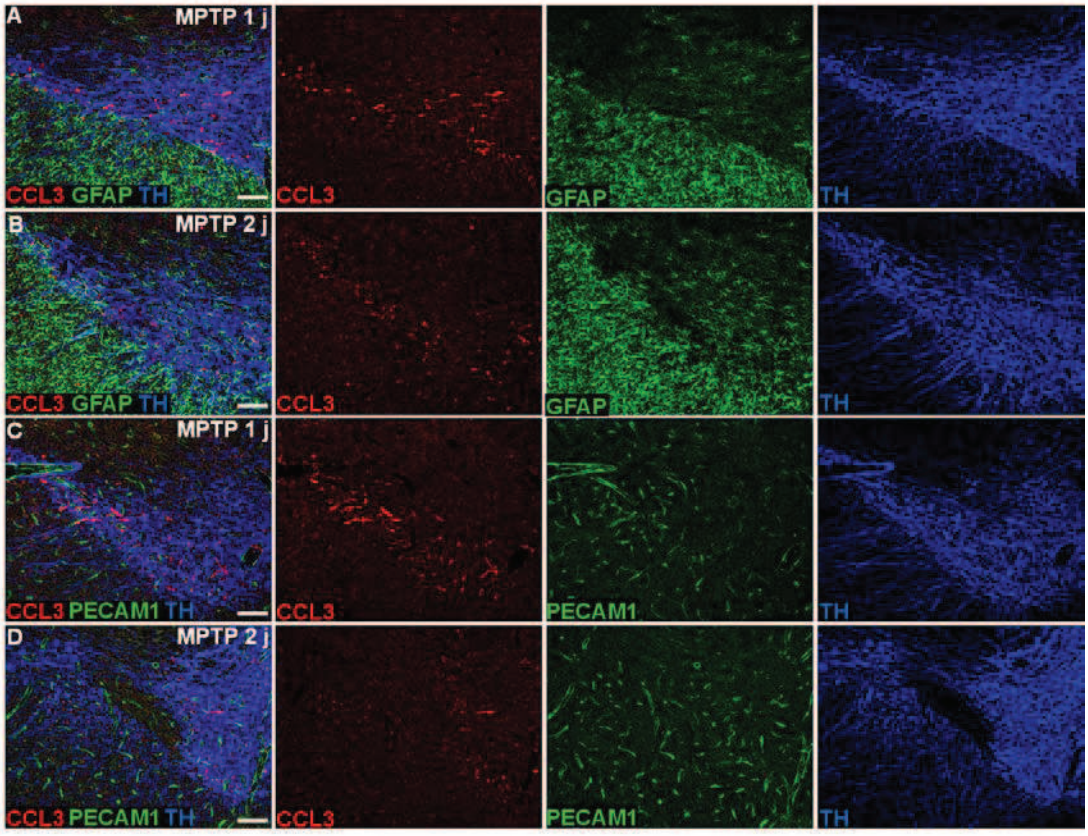


Figure 37 : Immunomarquages en fluorescence pour CCL3 (rouge), GFAP et PECAM1 (vert), et TH (bleu) dans la substance noire de souris intoxiquées au MPTP ou ayant reçu une solution saline. A : CCL3 ne colocalise pas avec le marquage GFAP, 1 jour post-MPTP. B : CCL3 ne colocalise pas avec le marquage GFAP, 2 jours post-MPTP. C : CCL3 ne colocalise pas avec le marquage PECAM1, 1 jour post-MPTP. D : CCL3 ne colocalise pas avec le marquage PECAM1, 2 jours post-MPTP. Barres d'échelle : A, B, C, D : 100 µm.

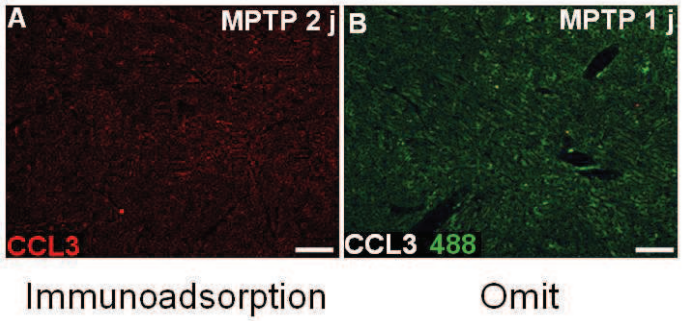


Figure 38 : Immunomarquages en fluorescence pour CCL3. A : L'anticorps primaire anti-CCL3 a été pré-adsorbé avec la chimiokine CCL3 recombinante. Le marquage CCL3 est fortement diminué. B : Les coupes ont été incubées avec l'anticorps primaire anti-CCL4 puis avec le secondaire dirigé contre l'anti-Iba1. Le marquage CCL3 n'est pas détecté. Barre d'échelle : A, B, 100 µm.

Concernant CCL4 nous avons observé des résultats similaires à ceux obtenus pour CCL3, à savoir, une expression exclusivement microgliale dans la SNpc (Figures 39 et 40). En raison d'une intensité de marquage plus faible pour CCL4, les images présentées ont été prises à l'objectif 25x. La spécificité du marquage est représentée en figure 41.

Ces résultats confirment l'expression des chimiokines CCL3 et CCL4 dans la SNpc de souris 48 heures après intoxication par le MPTP. Nous détectons également CCL3 et CCL4 dès 24 heures post-MPTP dans la SNpc. De plus nous avons observé une localisation microgliale de ces deux protéines.

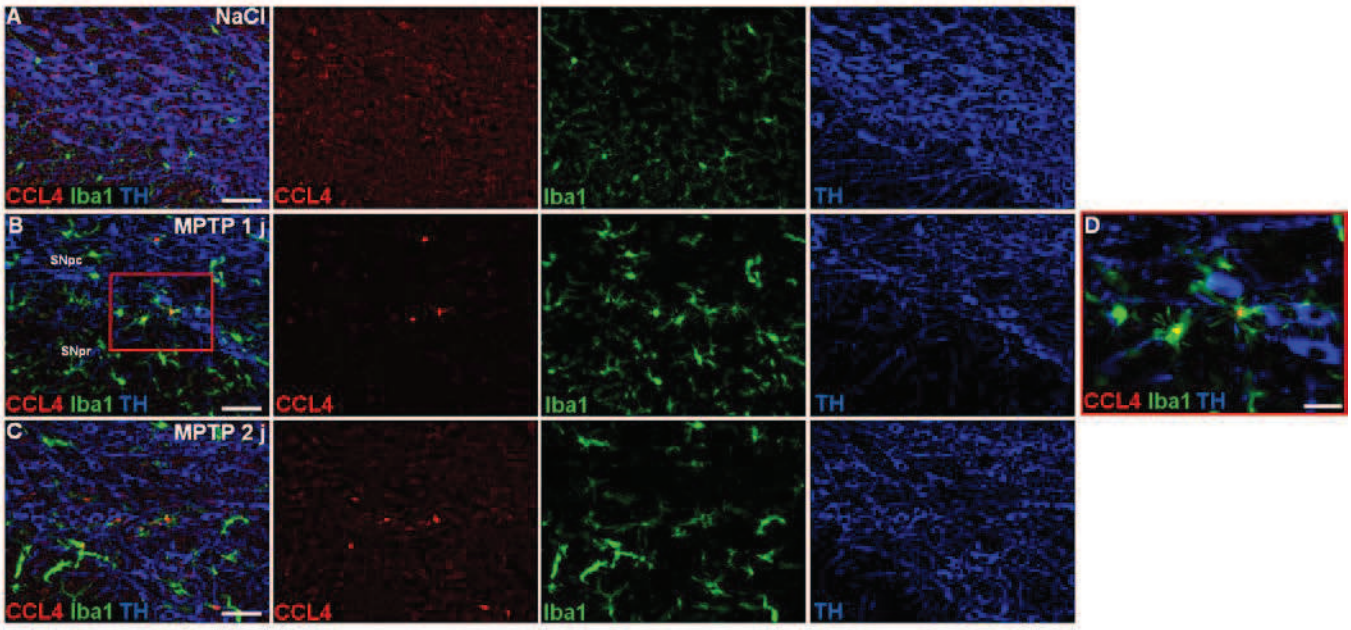


Figure 39 : Immunomarquages en fluorescence pour CCL4 (rouge), Iba1 (vert) et TH (bleu) dans la substance noire de souris intoxiquées au MPTP ou ayant reçu une solution saline. A : Un faible marquage CCL4 est observé dans la SNpc de souris salines. B : Un marquage CCL4 est observé dans les cellules Iba1$^+$ de la SNpc, 1 jour post-MPTP. C : Un marquage CCL4 est observé dans les cellules Iba1$^+$ de la SNpc, 2 jours post-MPTP. D : Agrandissement de l'encart rouge de l'image B, CCL4 est exprimé dans deux cellules Iba1$^+$. Barres d'échelle : A, B, C : 50 µm, D 20 µm.

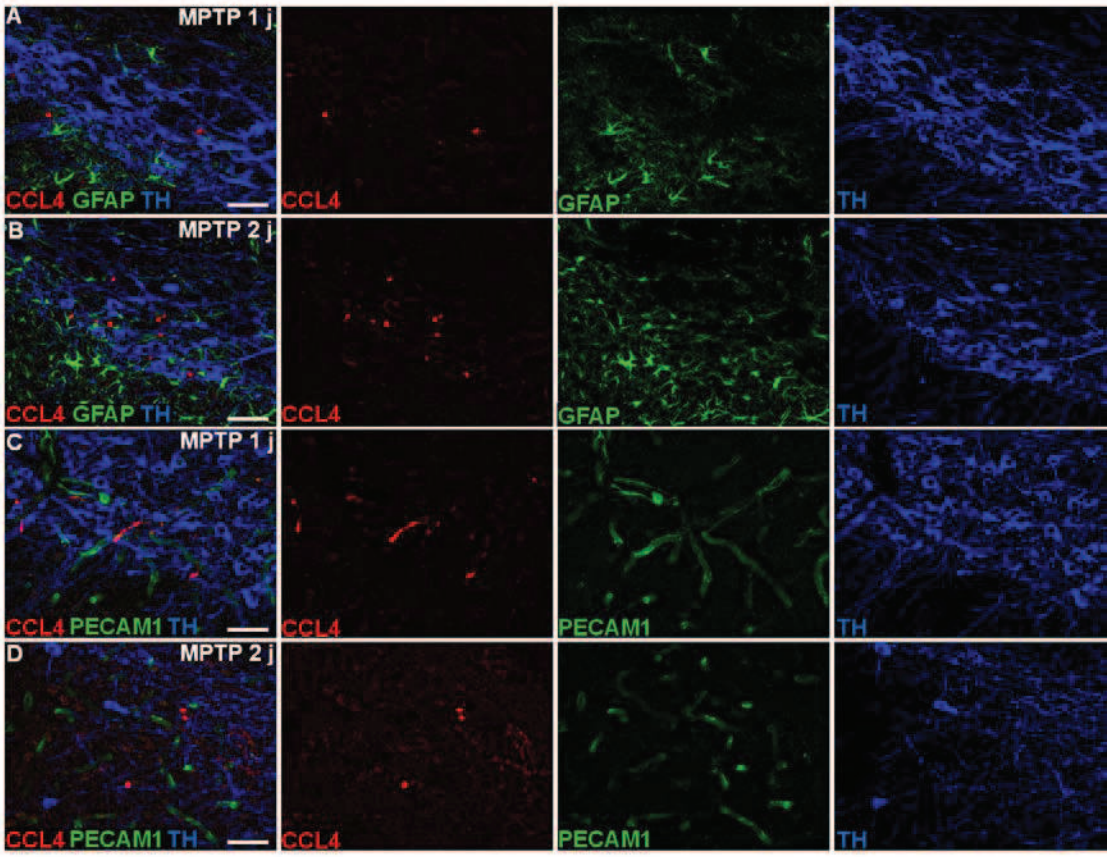


Figure 40 : Immunomarquages en fluorescence pour CCL4 (rouge), GFAP et PECAM1 (vert), et TH (bleu) dans la substance noire de souris intoxiquées au MPTP ou ayant reçu une solution saline. A : CCL4 ne colocalise pas avec le marquage GFAP, 1 jour post-MPTP. B : CCL4 ne colocalise pas avec le marquage GFAP, 2 jours post-MPTP. C : CCL4 ne colocalise pas avec le marquage PECAM1, 1 jour post-MPTP. D : CCL4 ne colocalise pas avec le marquage PECAM1, 2 jours post-MPTP. Barres d'échelle : A, B, C, D : 50 µm.

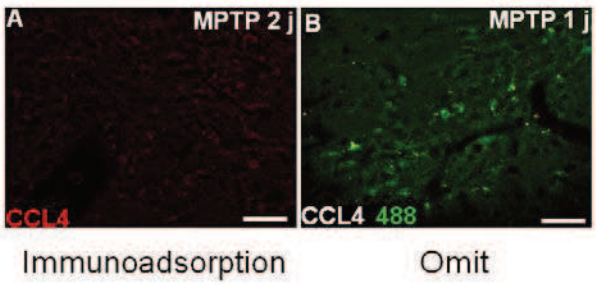


Figure 41 : Immunomarquages en fluorescence pour CCL4. A : L'anticorps primaire anti-CCL4 a été pré-adsorbé avec la chimiokine CCL4 recombinante. Le marquage CCL4 est diminué. B : Les coupes ont été incubées avec l'anticorps primaire anti-CCL3 puis avec le secondaire dirigé contre l'anti-Iba1. Le marquage CCL4 n'est pas détecté. Barre d'échelle : A, B, 50 µm.

S'agissant de CXCL10, nous avons également détecté son expression dans la SNpc après intoxication par le MPTP. Cependant le marquage n'était pas localisé sur l'ensemble de la SNpc mais sous forme de regroupements cellulaires (Figure 42). Des cellules doublement positives pour CXCL10 et la GFAP ont parfois été observées à la jonction de la SNpc et de la

SNpr ou dans la SN *pars lateralis* (SNpl). Cependant au sein de la SNpc les cellules CXCL10^{+} ayant une forme astrocytaire étaient GFAP^{-} ou GFAP faible (Figure 42). Aucune colocalisation de CXCL10 avec la TH, Iba1 et PECAM1 n'a été observée, suggérant une production exclusivement astrocytaire de ce facteur (Figure 43). Le contrôle avec pré-absorption montrait une diminution du marquage CXCL10 mais un bruit de fond élevé. Nous n'avons pas observé de marquage sur les coupes de tissu incubées avec l'anticorps primaire anti-CXCL10 plus l'anticorps secondaire dirigé contre la GFAP (figure 44).

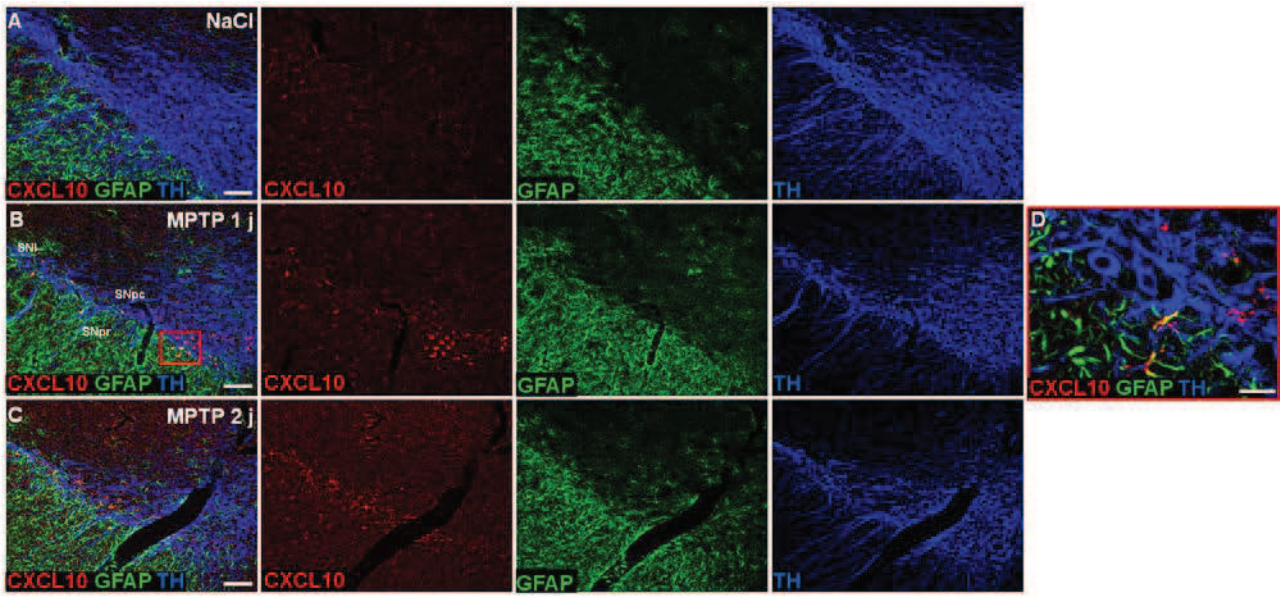


Figure 42 : Immunomarquages en fluorescence pour CXCL10 (rouge), GFAP (vert) et TH (bleu) dans la substance noire de souris intoxiquées au MPTP ou ayant reçu une solution saline. A : Un faible marquage CXCL10 est observé dans la SNpc de souris salines. B : Un marquage CXCL10 est observé dans les cellules GFAP+ à la jonction de la SNpc et de la SNpr, 1 jour post-MPTP. C : Un marquage CXCL10 est observé dans les cellules GFAP+ de la SNpl, 2 jours post-MPTP. D : Agrandissement de l'encart rouge de l'image B, CXCL10 est exprimé dans une cellule GFAP^{+}. Barres d'échelle : A, B, C : 100 µm, D 20 µm.

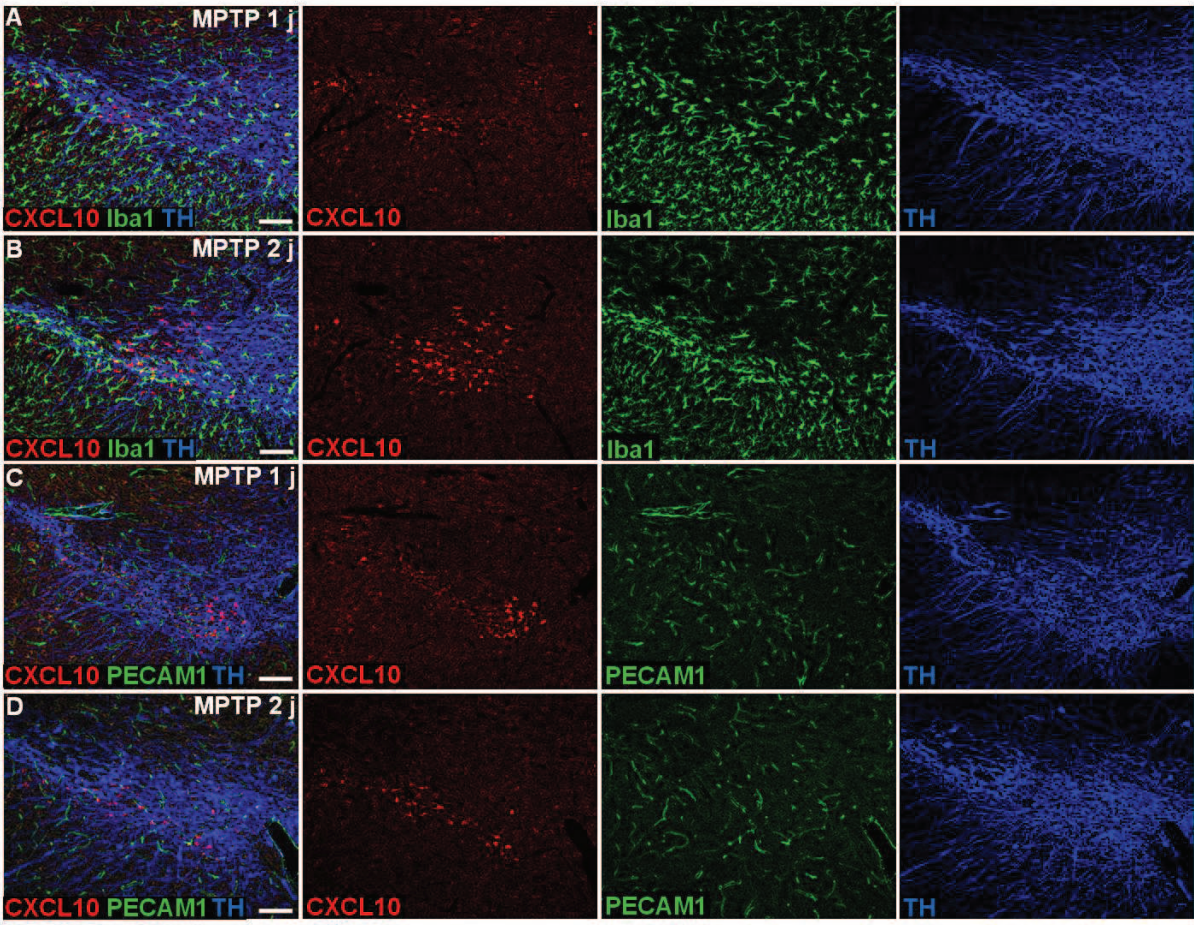


Figure 43 : Immunomarquages en fluorescence pour CXCL10 (rouge), Iba1 et PECAM1 (vert), et TH (bleu) dans la substance noire de souris intoxiquées au MPTP ou ayant reçu une solution saline. A : CXCL10 ne colocalise pas avec le marquage Iba1, 1 jour post-MPTP. B : CXCL10 ne colocalise pas avec le marquage Iba1, 2 jours post-MPTP. C : CXCL10 ne colocalise pas avec le marquage PECAM1, 1 jour post-MPTP. D : CXCL10 ne colocalise pas avec le marquage PECAM1, 2 jours post-MPTP. Barres d'échelle : A, B, C, D : 100 µm.

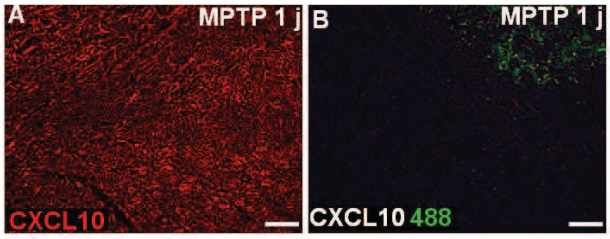


Figure 44 : Immunomarquages en fluorescence pour CXCL10. A : L'anticorps primaire anti-CXCL10 a été pré-adsorbé avec la chimiokine CXCL10 recombinante. Le marquage CXCL10 est fortement diminué bien que du bruit de fond soit observé. B : Les coupes ont été incubées avec l'anticorps primaire anti-CXCL10 puis avec le secondaire dirigé contre l'anti-GFAP. Le marquage CXCL10 n'est pas détecté. Barre d'échelle : A, B, 100 µm.

2.2.3. Confirmation de la localisation cellulaire par microscopie confocale

a) Présentation

Pour confirmer la localisation microgliale et astrocytaire des chimiokines CCL3, CCL4 et CXCL10 telle qu'observée en microscopie optique, nous avons réalisé des analyses en microscopie confocale.

b) Résumé des principaux résultats

Nos études montrent que les chimiokines CCL3 et CCL4 sont localisées dans le compartiment cytoplasmique des cellules microgliales Iba1$^+$ (Figures 45 et 46). De plus nous avons pu observer deux types de marquages pour ces chimiokines. D'une part, un marquage concentré dans une zone du cytoplasme microglial, représenté pour CCL3 en figure 44 A et B et pour CCL4 en figure 45 C. D'autre part, nous avons détecté CCL3 et CCL4 à la fois sous forme concentrée et dans des structures de type vésiculaire distribuées dans le cytoplasme dans des cellules microgliales Iba1$^+$ (figure 45 C pour CCL3 et figure 46 A et B pour CCL4).

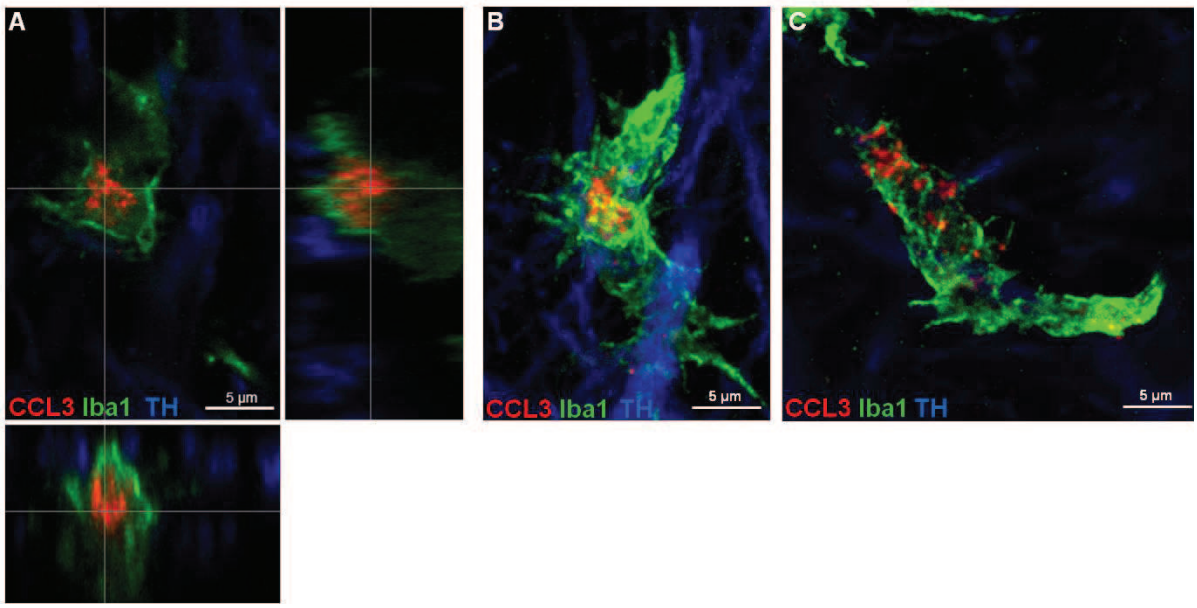


Figure 45 : Imagerie confocale dans la SNpc de souris, 24 ou 48 heures après intoxicaton par le MPTP. Immunomarquages fluorescents pour CCL3 (rouge), Iba1 (vert) et TH (bleu). A : Images orthogonales. CCL3 est contenu dans une zone condensée du cytoplasme des cellules microgliale Iba1$^+$. B : Projection en Z de l'image A. C : Projection en Z d'une microglie Iba1$^+$ contenant un marquage CCL3 sous forme condensée et vésiculaire.

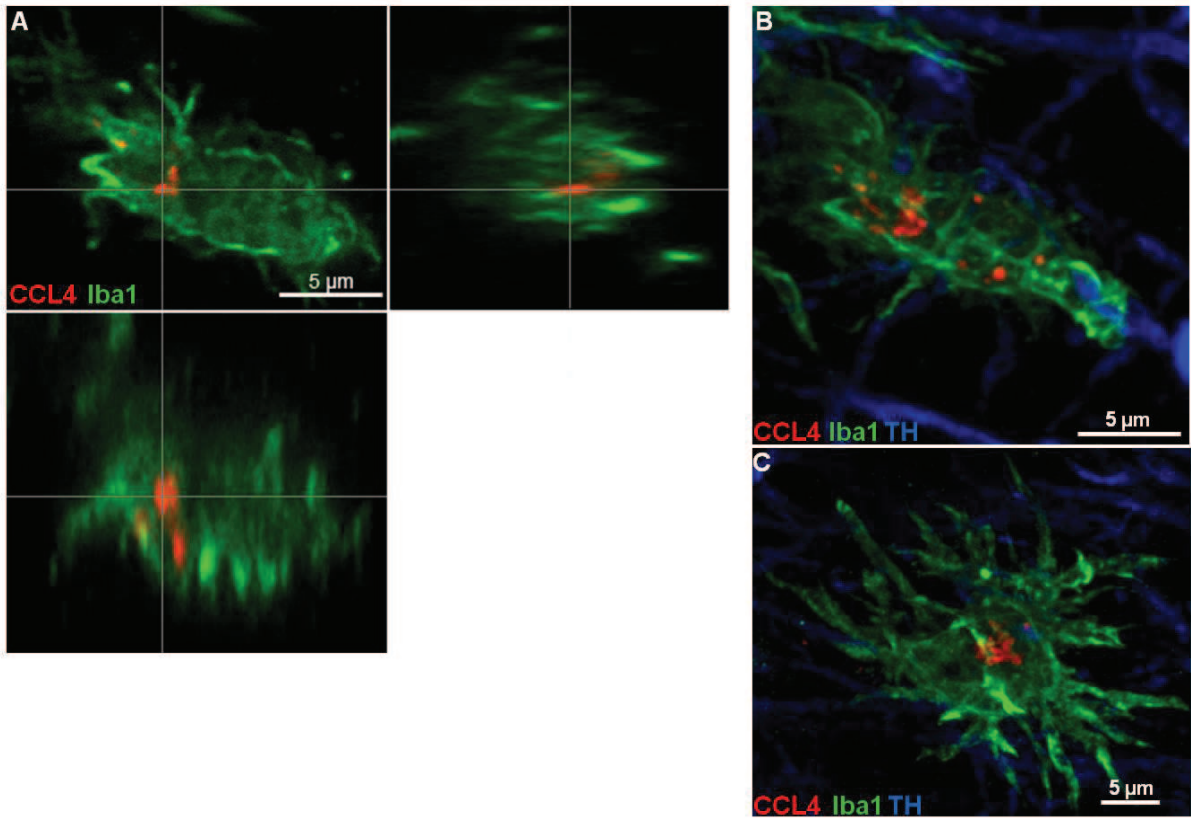


Figure 46 : Imagerie confocale dans la SNpc de souris, 24 ou 48 heures après intoxicaton par le MPTP. Immunomarquages fluorescents pour CCL4 (rouge), Iba1 (vert) et TH (bleu). A : Images orthogonales. CCL4 est contenu le cytoplasme des cellules microgliale Iba1$^+$. B : Projection en Z de l'image A. CCL4 apparaît sous forme d'un marquage condensé et de structures vésiculaires cytoplasmiques. C : Projection en Z d'une microglie Iba1$^+$ contenant un marquage CCL4 sous forme condensée.

Les analyses au microscope confocal confirment également la localisation astrocytaire de CXCL10. Nos observations montrent que CXCL10 est détecté dans le cytoplasme des astrocytes GFAP$^+$ (Figure 47).

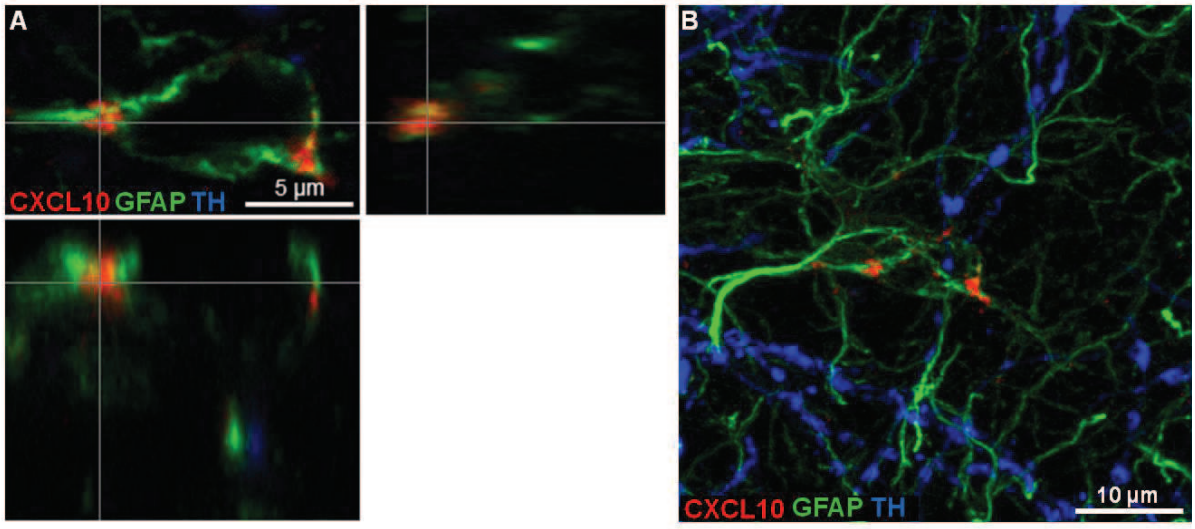


Figure 47 : Imagerie confocale dans la SNpc de souris, 24 heures après intoxicaton par le MPTP. Immunomarquages fluorescents pour CXCL10 (rouge), GFAP (vert) et TH (bleu). A : Images orthogonales. On observe plusieurs amas de CXCL10 de taille moyenne, distribués dans le cytoplasme des astrocytes GFAP$^+$. B : Projection en Z de l'image A.

En conclusion, nous observons une expresion très importante et précoce des chimiokines CCL3, CCL4 et CXCL10, tant au niveau de l'ARNm que de la protéine, dans le mésencéphale ventral de souris à 24 et 48 heures post-intoxication par le MPTP. Les protéines CCL3 et CCL4 sont localisées dans les microglies Iba1$^+$ situées dans la SNpc de souris intoxiquées par le MPTP. CXCL10 est détectée dans le cytoplasme des astrocytes GFAP$^+$ situés à la jonction de la SNpc et de la SNpr ainsi que dans la SNpl et dans des cellules de forme astrocytaire GFAP$^-$ ou GFAP faible dans la SNpc.

II. Etude du rôle des chimiokines dans les mécanismes d'infiltration lymphocytaire

Après avoir mis en évidence la présence des chimiokines dans la substance noire de souris intoxiquées par le MPTP, nous avons voulu déterminer le rôle de ces molécules dans les processus d'infiltration lymphocytaire et la dégénérescence dopaminergique.

Les chimiokines sont exprimées par de nombreux types cellulaires dans le SNC et en périphérie. Ainsi, l'invalidation du ligand peut engendrer des effets autres que ceux exercés sur les lymphocytes spécifiquement. Nous avons donc décidé de cibler les récepteurs des chimiokines identifiées dans la SNpc des souris intoxiquées par le MPTP. En effet, cette stratégie nous permet de cibler la délétion des récepteurs aux chimiokines à l'échelle leucocytaire par des techniques de transfert passif.

CCL3 est un agoniste des récepteurs CCR1 et CCR5. CCL4 est un agoniste du récepteur CCR5 et CXCL10 est un agoniste du récepteur CXCR3. Nous avons par conséquent utilisé des stratégies génétiques et pharmacologiques permettant de bloquer l'action de ces trois récepteurs.

1. Expériences de délétions constitutives de récepteurs aux chimiokines

1.1. Présentation

Nous avons tout d'abord intoxiqué des souris génétiquement modifiées pour les récepteurs aux chimiokines CCR1, CCR5 et CXCR3 afin de déterminer si la délétion constitutive de chacun de ces récepteurs modifiait la dégénérescence dopaminergique et la migration intracérébrale des lymphocytes.

1.2. Résumé des principaux résultats

Les souris déficientes pour le récepteur CCR1 présentent une protection partielle (26%) vis-à-vis des effets du MPTP alors que la délétion de CCR5 n'influence pas la dégénérescence neuronale (Figure 48). L'infiltration de lymphocytes T $CD8^+$ mais pas $CD4^+$ est significativement diminuée dans la substance noire des souris $Ccr1^{-/-}$ et $Ccr5^{-/-}$ (Figure 49). Les souris $CXCR3^{-/-}$ ne sont pas protégées vis-à-vis des effets neurotoxiques du MPTP (Figure 50).

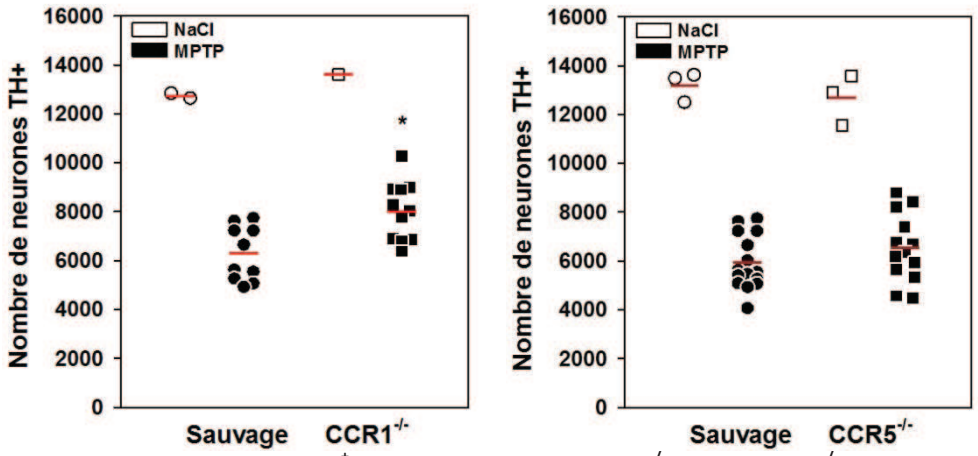


Figure 48 : Quantification des neurones TH^+ dans la SNpc de souris $CCR1^{-/-}$ (gauche), $CCR5^{-/-}$ (droite) et de leurs souris sauvages appariées, 7 jours après intoxication par le MPTP ou injection d'une solution saline. Les souris $CCR1^{-/-}$ sont partiellement protégées contre l'action de la toxine (Test t de Student, *, $p<0.05$; d'après Brochard, 2008).

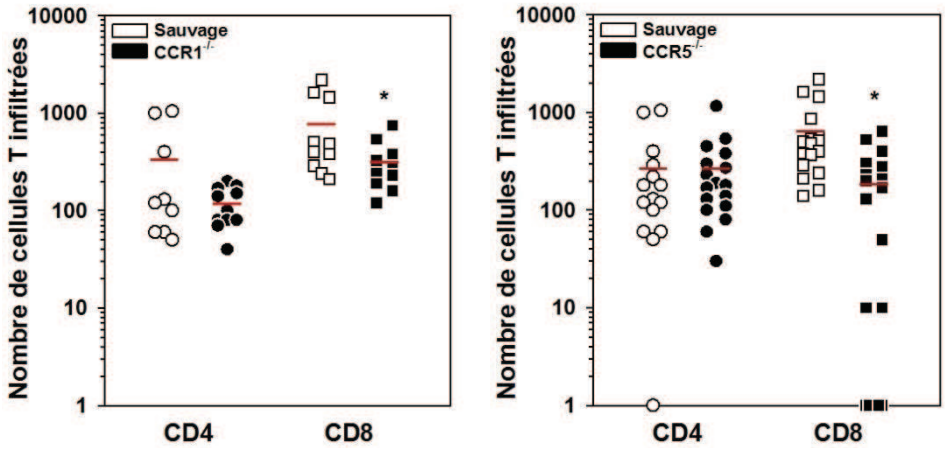


Figure 49 : Quantification du nombre total de lymphocytes CD4 et CD8 infiltrés dans la SNpc de souris CCR1$^{-/-}$ (gauche), CCR5$^{-/-}$ (droite) et de leurs souris sauvages appariées, 7 jours après intoxication par le MPTP ou injection d'une solution saline. Les souris CCR5$^{-/-}$ et CCR1$^{-/-}$ présentent une diminution significative du nombre de lymphocytes CD8^{+} dans la SNpc (Test de Mann-Whitney, *, $p < 0.05$; d'après Brochard, 2008).

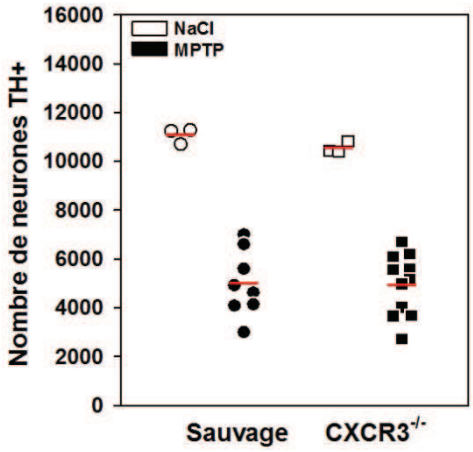


Figure 50 : Quantification des neurones TH^{+} dans la SNpc de souris CXCR3$^{-/-}$ et de leurs souris sauvages appariées, 7 jours après intoxication par le MPTP ou injection d'une solution saline. Les souris CXCR3$^{-/-}$ ne sont pas protégées vis-à-vis des effets neurotoxiques du MPTP.

Bien qu'une protection partielle ait été obtenue par la délétion du récepteur CCR1 (26%) elle est bien en deçà des 70% observés chez les souris déficientes en lymphocytes T CD4^{+} (Brochard et coll., 2009). Outre le fait que ces récepteurs puissent jouer un rôle mineur dans l'infiltration lymphocytaire, d'autres processus non exclusifs pourraient expliquer ce résultat.

D'une part, la délétion d'un récepteur de manière constitutive pourrait entraîner des effets extra-lymphocytaires potentiellement délétères masquant les effets bénéfiques. En effet les récepteurs aux chimiokines peuvent être exprimés par de nombreux types

cellulaires (Bajetto et coll., 2002). Il a en outre été montré que la délétion constitutive d'un récepteur aux chimiokines augmente les concentrations sanguine et cérébrale de ses ligands par diminution de leur dégradation (Cardona et coll., 2008). Ce processus pourrait modifier le réseau chimiokinique et donc masquer l'effet éventuel de l'absence du récepteur.

D'autre part, il est bien établi que les lymphocytes circulants peuvent exprimer plusieurs récepteurs pour différents ligands pouvant chacun influencer le comportement migratoire de ces cellules. Par conséquent, le blocage d'un seul de ces récepteurs pourrait se révéler insuffisant pour empêcher le processus de migration cérébrale des lymphocytes T. Cette hypothèse est confortée par des études *in vitro* qui ont montré que le blocage simultané de plusieurs récepteurs (CCR1, CCR2, CCR5 et CXCR3) pouvait être nécessaire pour bloquer la migration transendothéliale de ces cellules (Shulman et coll., 2012). Nous avons par conséquent, développé une stratégie expérimentale visant à bloquer de façon simultanée les récepteurs CXCR3, CCR1 et CCR5 chez la souris.

2. Expériences de blocage multiple de récepteurs aux chimiokines

2.1. Présentation

Afin de tester l'hypothèse d'un effet partiel de chaque récepteur dans le processus d'infiltration lymphocytaire dans notre modèle expérimental de MP nous avons utilisé une stratégie de blocage multiple. Celle-ci a consisté à administrer, à des souris déficientes pour le récepteur CXCR3, un antagoniste des récepteurs CCR1 et CCR5, le Met-RANTES (Figure 51).

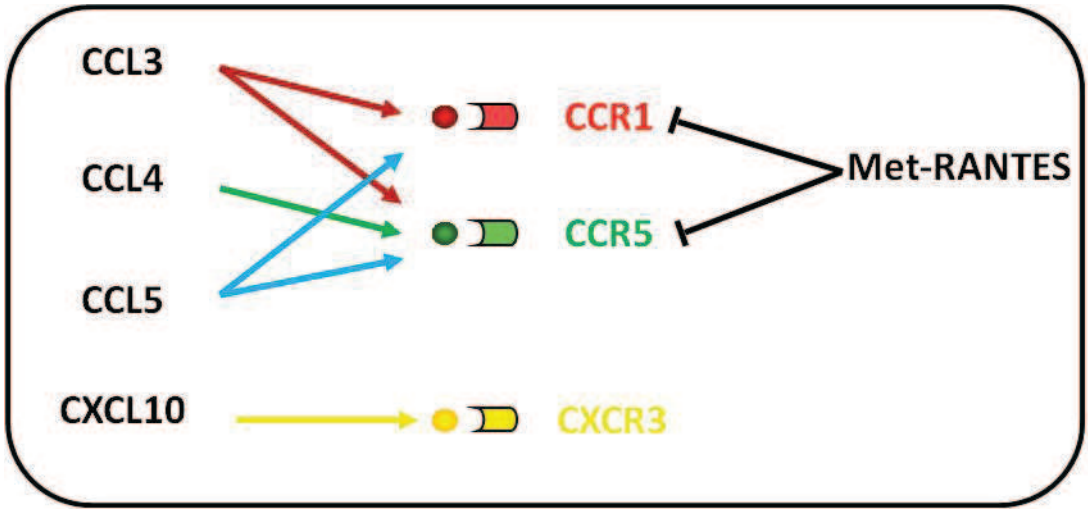


Figure 51 : Représentation des effets agonistes des candidats étudiés CCL3, CCL4 et CXCL10 sur leurs récepteurs respectifs et actions antagonistes du Met-RANTES. CLL3 et CCL5 sont des agonistes des récepteurs CCR1 et CCR5. CCL4 est un agoniste du récepteur CCR5 et CXCL10 agit sur CXCR3. Le Met-RANTES permet d'antagoniser l'effet de CCL3, CCL4 et CCL5 sur les récepteurs CCR1 et CCR5.

En effet, des premiers résultats encourageants obtenus au laboratoire suggéraient un effet protecteur de cet antagoniste vis-à-vis des effets toxiques du MPTP. Cette neuroprotection était par ailleurs associée à une diminution de l'infiltrat lymphocytaire CD4 et CD8 dans la substance noire (Figure 52). Etant donné que le niveau de neuroprotection observé (40%) n'était pas aussi important que celui obtenu chez les souris $CD4^{-/-}$ (70%) nous avons fait l'hypothèse qu'un ou d'autres récepteurs pouvaient également contribuer au processus de migration lymphocytaire dans ce modèle expérimental.

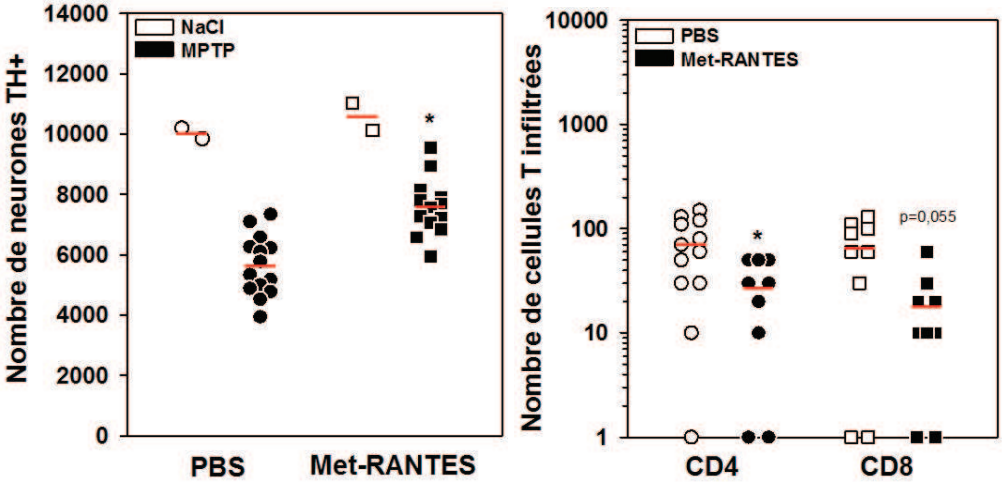


Figure 52 : Quantification des neurones TH^+ dans la SNpc de souris sauvages recevant un traitement au Met-RANTES ou du PBS, 7 jours après intoxication par le MPTP ou injection d'une solution saline (gauche). Les souris recevant du Met-RANTES sont partiellement protégées contre les toxiques du MPTP (ANOVA à deux facteurs, *, $p<0.05$; d'après Brochard, 2008). Quantification du nombre total de lymphocytes CD4 et CD8 infiltrés dans la SNpc de souris intoxiquées au MPTP et recevant un traitement au Met-RANTES ou du PBS (droite). Les souris traitées au Met-RANTES présentent une diminution significative du nombre de lymphocytes $CD4^+$ dans la SNpc après intoxication au MPTP (Test t de Student, *, $p<0.05$; d'après Brochard, 2008).

2.2. Résumé des principaux résultats

Contrairement aux résultats précédemment obtenus sur des souris sauvages chez lesquelles le Met-RANTES avait été administré (Figure 53), nous n'avons pas observé d'effet protecteur significatif de cet antagoniste dans notre deuxième étude. Seule une tendance de l'ordre de 12% de protection contre la perte dopaminergique a été observée. Toutefois et de façon intéressante, la combinaison de ce traitement avec une délétion du gène codant pour CXCR3 était associée à une protection significative (36%) des neurones dopaminergiques contre les effets toxiques du MPTP (Figure 53).

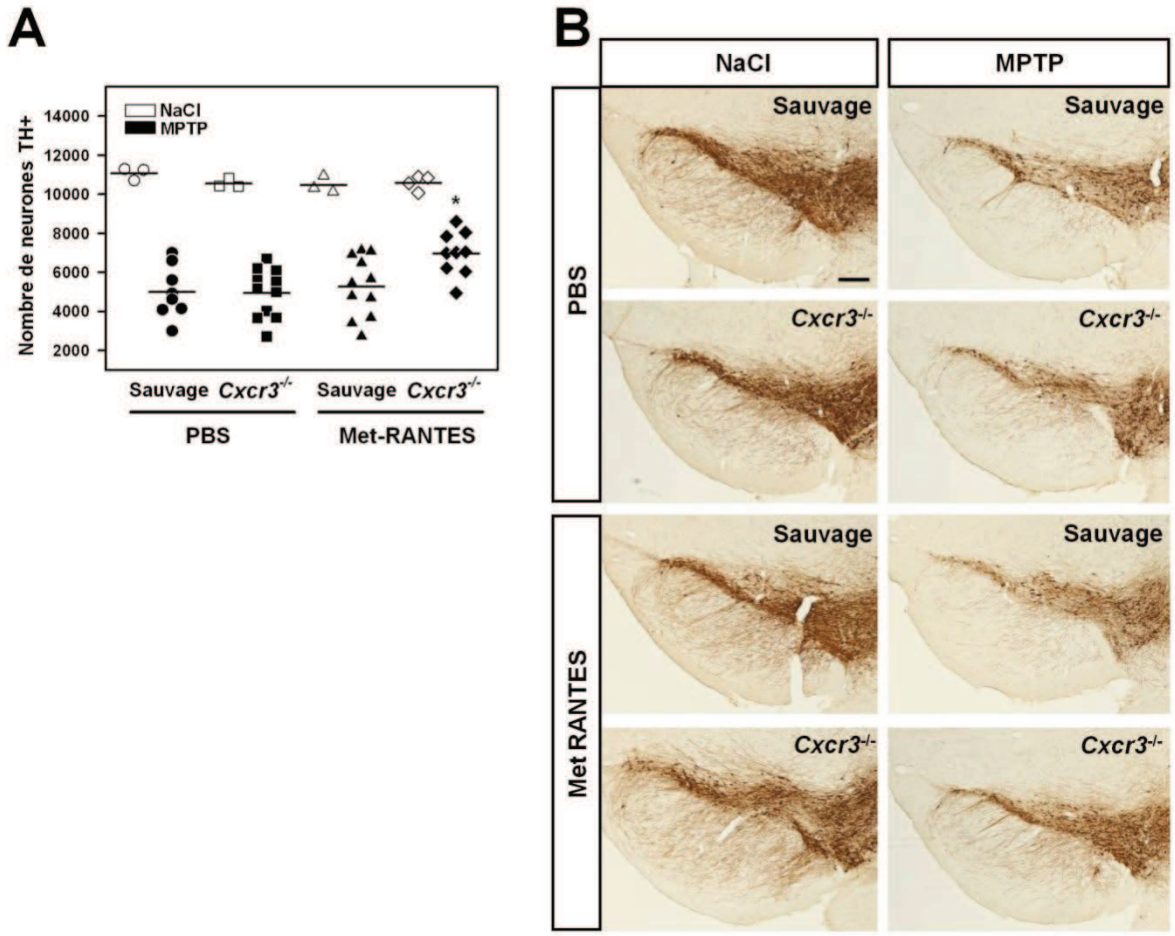


Figure 53 : Quantification des neurones TH^+ dans la SNpc de souris $Cxcr3^{-/-}$ et sauvages, recevant ou non du Met-RANTES, 7 jours après intoxication par le MPTP ou injection d'une solution saline. A : L'inhibition simultanée des récepteurs CCR1, CCR5 et CXCR3 protège partiellement les neurones dopaminergique des effets du MPTP (ANOVA à trois facteurs, *, p<0,05. B : Photographies représentatives de sections de mésencéphale ventral immunomarquées pour la TH de souris $Cxcr3^{-/-}$ et sauvages, recevant ou non du Met-RANTES et intoxiquées avec du MPTP ou recevant une solution saline (Barre d'échelle = 100 µm).

Les études quantitatives de l'infiltrat lymphocytaire dans la SNpc, qui sont en cours, nous permettront de déterminer si cette inhibition combinée des récepteurs CCR1, CCR5 et

CXCR3 est associée à une diminution du recrutement lymphocytaire dans la substance noire des animaux intoxiqués par le MPTP.

L'ensemble de ces données suggère qu'une inhibition combinée de plusieurs récepteurs aux chimiokines pourrait permettre de diminuer la dégénérescence dopaminergique.

3. Expériences de délétion de récepteurs aux chimiokines à l'échelle leucocytaire

Si l'inhibition combinée de plusieurs récepteurs aux chimiokines semble efficace pour diminuer la neurodégénérescence dopaminergique chez des souris MPTP, nous avons également voulu tester l'hypothèse selon laquelle une délétion ubiquitaire d'un récepteur en particulier pourrait masquer l'effet protecteur potentiellement conféré par l'absence du dit récepteur au niveau lymphocytaire. Pour cela, nous avons utilisé une stratégie de transfert passif. Cette technique consiste à transférer des splénocytes, déficients pour un récepteur donné, à des souris immunodéficientes rag1$^{-/-}$ dépourvues de lymphocytes T et B. Cette manipulation a pour conséquence, plusieurs semaines après la greffe, une reconstitution du système immunitaire des souris hôtes par des lymphocytes n'exprimant pas le récepteur d'intérêt. Ainsi, dans ces souris chimères, seules les populations lymphocytaires sont déficientes pour le récepteur aux chimiokines dont l'expression reste par ailleurs intacte dans le reste de l'organisme.

3.1. Etude des lymphocytes dans le sang périphérique

3.1.1. Présentation

Afin de vérifier que cette manipulation n'entraînait pas de modifications artefactuelles homéostatiques ou physiopathologiques des populations lymphocytaires, nous avons analysé par cytométrie en flux, avant et après induction de la pathologie, les proportions sanguines circulantes des principales populations lymphocytaires T.

3.1.2. Résumé des principaux résultats

Quelque soit le type de reconstitution (splénocytes sauvages ou déficients pour les récepteurs CCR1, CCR5 ou CXCR3), les souris chimères présentaient une diminution de 50 à 60% du taux de lymphocytes T circulants par rapport à des souris C57BL/6 sauvages (Figure 54). Les souris rag1$^{-/-}$, quant à elles, présentaient extrêmement peu de lymphocytes T circulants (Figure 54). Par ailleurs, le rapport CD4^{+}/CD8^{+} était diminué chez les souris reconstituées par rapport aux souris C57BL/6 sauvages. Avec notamment une diminution de 30% du taux de lymphocytes T CD4^{+} circulants. A l'inverse, le taux de lymhocytes CD8^{+} circulants semble augmenter chez les animaux reconstitués (augmentation de 35% ; Figure 54). Toutefois, ces modifications sont identiques quelque soit le type de reconstitution (Figure 54).

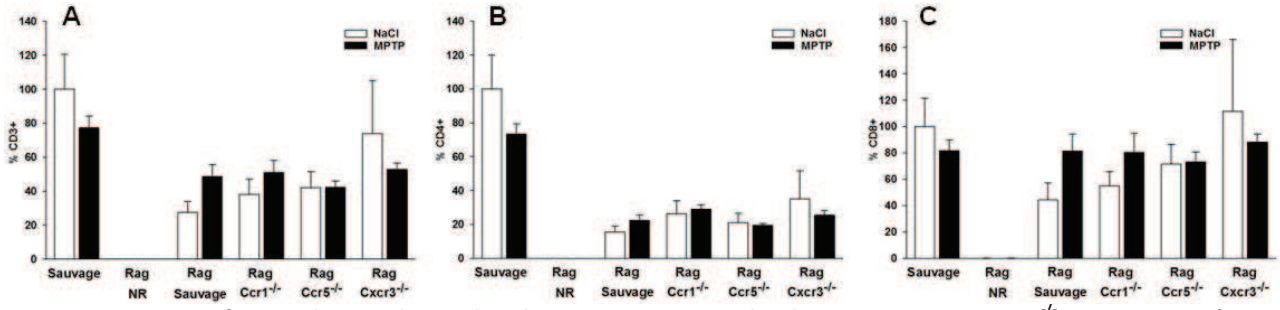


Figure 54 : Quantification des populations lymphocytaires sanguines chez les souris sauvages, rag1$^{-/-}$ non reconstituées, reconstituées avec des splénocytes de souris sauvages, Ccr1$^{-/-}$, Ccr5$^{-/-}$ ou Cxcr3$^{-/-}$, 7 jours après intoxication par le MPTP ou injection d'une solution saline. Pourcentage de lymphocytes T CD3^{+} (A), T CD4^{+} (B) et T CD8^{+} (C) circulants dans les différents groupes de souris. Aucune différence significative n'est observée entre les souris reconstituées. NaCl n=3-4 par groupe. MPTP n=8-11 par groupe.

D'autre part les cellules CD8^{+} des souris reconstituées sont, dans leur grande majorité (97% de CD8^{+}/CD45RA^{-}), activées alors qu'elles ne représentent que 75% chez les souris sauvages. Enfin la proportion de cellules CD4^{+}CD25^{+} est augmentée de façon significative chez les souris reconstituées par rapport aux souris sauvages (augmentation de 2 fois, $p<0,05$ Mann-Whitney Rank Sum Test). Néanmoins, là encore, ces différences sont identiques quelque soit le génotype des splénocytes transférés.

De façon intéressante, nous observons une augmentation d'expression de l'IFNγ par les lymphocytes CD8^{+} circulants et de T-bet par les cellules CD4^{+} et CD8^{+} chez les souris sauvages, 7 jours après intoxication par le MPTP.

Au total, ces données nous ont permis de confirmer l'absence de différence majeure entre les différents groupes expérimentaux de souris reconstituées avec des splénocytes de génotypes différents. En effet, bien qu'il existe des différences entre les souris C57BL/6 sauvages et les souris reconstituées quant à la proportion de cellules T circulantes, celles-ci sont similaires quelques soit le génotype des splénocytes utilisés pour le transfert passif. Enfin, l'intoxication par le MPTP des souris ne semble pas modifier le nombre de cellules $CD4^+$ et $CD8^+$ circulantes ni leur état d'activation mais semble néanmoins provoquer un changement phénotypique de type proinflammatoire comme en atteste l'augmentation de production d'IFNγ et du facteur de transcription T-bet qui est considéré comme un marqueur des cellules Th1 et Tc1.

3.2. Dégénérescence dopaminergique et infiltration lymphocytaire

3.2.1. Présentation

Afin de déterminer si l'invalidation lymphocytaire du récepteur CCR1 ou CCR5 ou CXCR3 pourrait avoir un impact négatif sur le comportement migratoire des lymphocytes T et un effet protecteur vis-à-vis des neurones dopaminergiques, nous avons entrepris d'évaluer et de comparer ces deux paramètres chez des souris sauvages et chimères intoxiquées par le MPTP.

3.2.2. Résumé des principaux résultats

Les analyses quantitatives de la perte neuronale et des infiltrats lymphocytaires sont en cours.

III. Expression des chimiokines dans la maladie de Parkinson

1. Présentation

Afin de confronter nos résultats obtenus dans le modèle murin d'intoxication par le MPTP avec la pathologie réelle, nous avons recherché des modifications d'expression des chimiokines CCL3, CCL4 et CXCL10 dans la SNpc de sujets témoins et parkinsoniens. Etant donné que l'expression des chimiokines semble relativement faible dans le cerveau nous avons utilisé la technique, très sensible, de PCR quantitative. Notre premier objectif a été d'identifier et de valider des gènes de référence utilisés pour normaliser les niveaux

d'expression de nos gènes d'intérêt. Par ailleurs, nous avons analysé l'expression de la TH comme marqueur dopaminergique et HLA-DRa, une région conservée du gène HLA, comme marqueur des cellules microgliales.

2. Résumé des principaux résultats

Sur 8 gènes de référence potentiels (ACTB, EIF4A2, GAPDH, HPRT, SF3A1, TBP, TOP1 et YWHAZ), une analyse avec le logiciel GeNorm (Vandesompele et coll., 2002) révèle que TOP1 et SF3A1 montrent l'expression la plus stable au sein des cohortes de patients parkinsoniens et témoins (Figure 55). L'expression de TOP1 et SF3A1 a donc été utilisée pour normaliser les valeurs d'expression de TH, HLA-Dra, CCL3, CCL4 et CXCL10. A noter que l'expression de l'ACTB, d'HPRT, de la GAPDH, de TBP et d'YWHAZ était diminuée de façon significative chez les sujets parkinsoniens par rapport aux sujets témoins (Test T de Student ou test de Mann-Whitney, $p<0,05$).

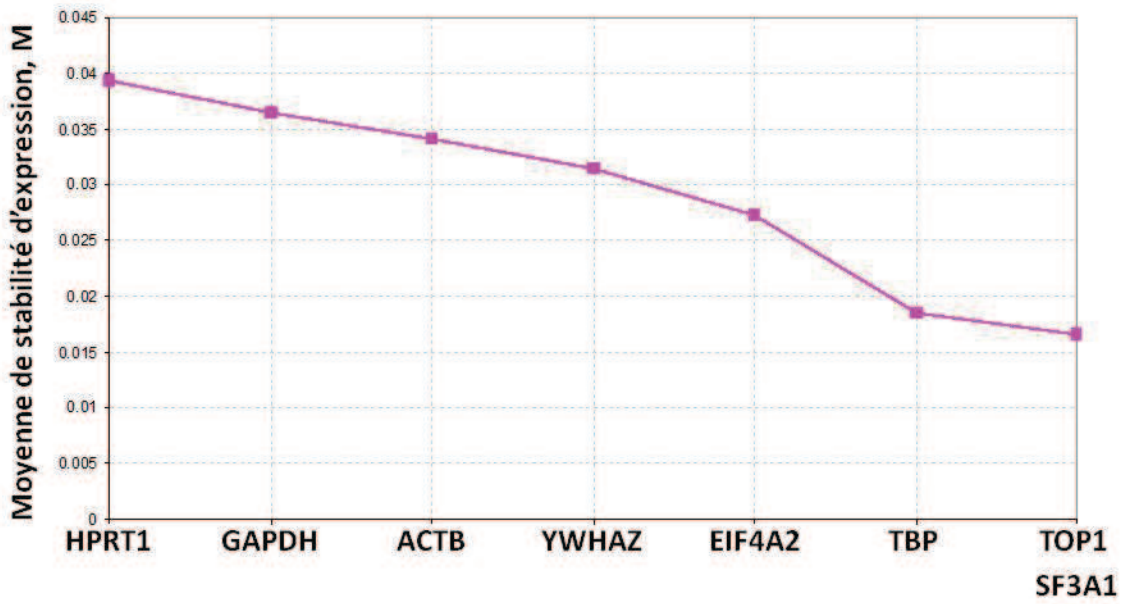


Figure 55 : Analyse par qPCR de la stabilité d'expression de 8 gènes de référence danss la SNpc de sujets contrôles et parkinsoniens. La valeur d'expression de stabilité moyenne (M) des gènes de référence est représentée après exclusion séquentielle du gène le moins stable. TOP1 et SF3A1 s'avèrent être les gènes dont l'expression est la plus stable.

Par ailleurs, nos résultats montrent que l'expression de la TH est fortement diminuée dans la SNpc des patients parkinsoniens alors que l'expression d'HLA-Dra n'est pas modifiée au niveau transcriptionnel chez ces patients (Figure 56).

Enfin, s'agissant des gènes d'intérêt, nous avons observé une augmentation significative de l'expression de CCL3 et CCL4 chez les sujets parkinsoniens alors que

l'expression de CXCL10, bien que montrant une tendance à l'augmentation, n'était pas significativement différente par rapport aux sujets contrôles (Figure 56).

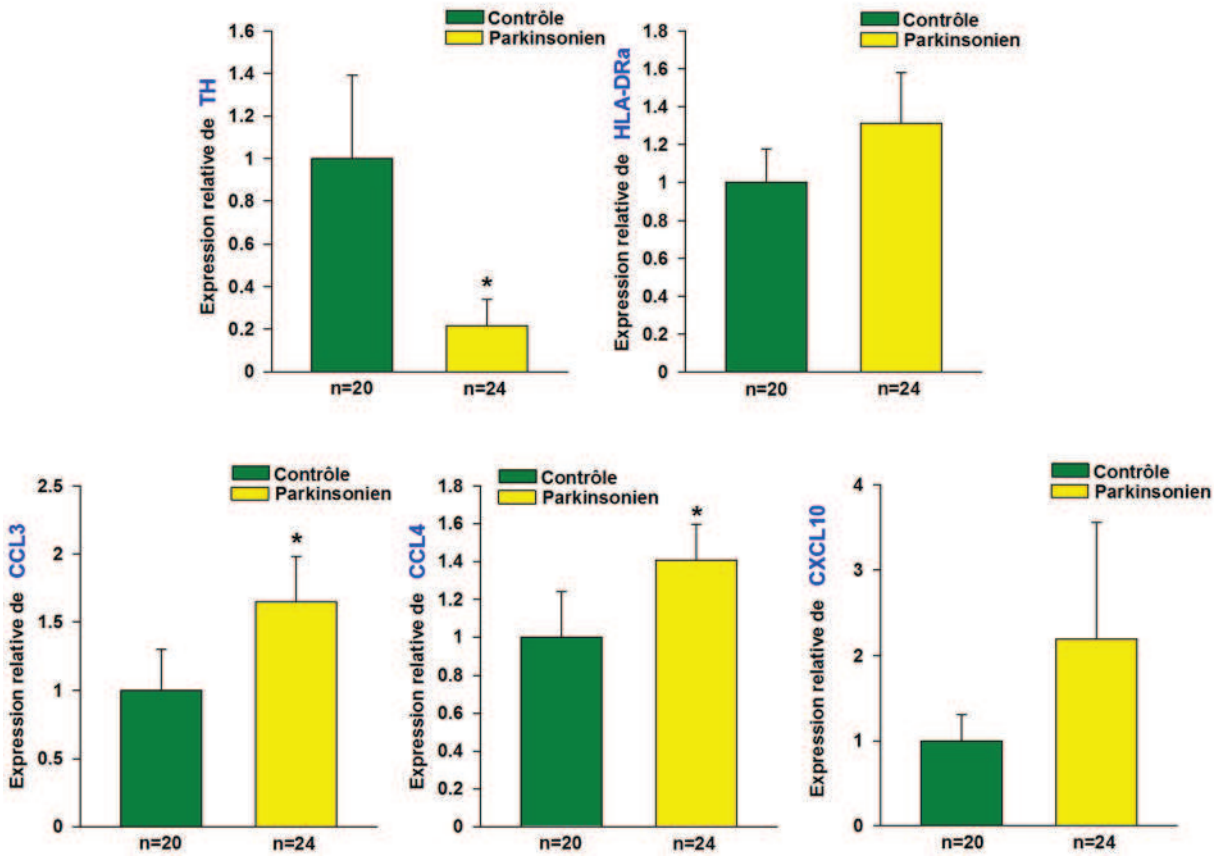


Figure 56 : Expression des marqueurs cellulaires et des chimiokines dans la SNpc de sujets sains ou parkinsoniens par PCR quantitative. L'expression de la TH est significativement diminuée chez les sujets parkinsoniens. L'expression d'HLA-Dra n'est pas modifiée. L'expression de CCL3 et CCL4 est sgnificativement augmentée dans la SNpc des patients. L'expression de CXCL10 n'est pas significativement modifiée. (ANOVA sur les rangs, *, P<0,05 vs contrôles).

Article

Neuroprotection achieved by multi-chemokine receptor targeting in a mouse model of Parkinson disease

Amaury Bekaert, Christophe Combadiere, Vanessa Brochard, Yann Monnet, Cécile Dalard, Sébastien Jacquelin, Lucie Poupel, Annick Prigent, Véronique Sazdovitch, Lixia Lu, Amanda Proudfoot, Serban Morosan, Charles Duyckaerts, Christian Lobsiger, Etienne C. Hirsch & Stéphane Hunot

Neuroprotection achieved by multi-chemokine receptor targeting in a mouse model of Parkinson disease

Amaury Bekaert[1,2,3], Christophe Combadiere[2,4,5], Vanessa Brochard[1,2,3], Yann Monnet[1,2,3], Cécile Dalard[1,2,3], Sébastien Jacquelin[2,4], Lucie Poupel[2,4], Annick Prigent[1,2,3] Véronique Sazdovitch[5], Lixia Lu[1,2,3], Amanda Proudfoot[6], Serban Morosan[2,7], Charles Duyckaerts[1,2,3,5], Christian Lobsiger[1,2,3], Etienne C. Hirsch[1,2,3] and Stéphane Hunot[1,2,3]

1 CNRS, UMR 7225, Experimental Therapeutics of Neurodegeneration, F-75013, Paris, France.
2 UPMC Univ Paris06, UMR_S975, F-75013, Paris, France.
3 INSERM, UMR_S975, CRICM, F-75013, Paris, France.
4 INSERM, UMR S945, Laboratory of Immunity and Infection, Paris, France
5 Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (AP-HP), Salpêtrière Hospital, F-75013, Paris, France.
6 Serono Pharmaceutical Research Institute, Geneva, Switzerland.
7 Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, Centre d'Expérimentation Fonctionnelle, Paris, France.

*Corresponding author at: Centre de Recherche ICM, INSERM/UPMC UMR S975, CNRS UMR 7225, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, 47 Bd de l'Hôpital, Bat. ICM, 5e étage, F-75013, Paris, France.
Tel: (33) 1 5727 4556
Fax: (33) 1 5727 4782
E-mail: stephane.hunot@upmc.fr (S. Hunot)

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by a loss of dopamine-containing neurons (DNs). While there is mounting evidence to suggest that adaptive immunity, primarily associated with T cell infiltrates, significantly contributes to dopaminergic cell death, the mechanism of leukocyte brain extravasation in PD remains largely unknown. In particular, whether the chemokine network known to play a crucial role in leukocyte emigration at sites of inflammation could be involved in such process has not been elucidated so far. Here, we show that among 32 chemokine ligands, glial-derived CCL3, CCL4 and CXCL10 expression was strongly induced in the substantia nigra of mice exposed to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) during the course of neuronal degeneration. Interestingly, similar up-regulated expression of CCL3 and CCL4 was identified in the SN from PD patients compared to control subjects. Surprisingly, however, MPTP-induced DN cell death was neither abrogated nor even reduced in CCR5-deficient and CXCR3-deficient mice whereas only a moderate 10% reduction in DN cell loss was observed in CCR1-deficient animals. Importantly, the lack of neuroprotection in mutant mice correlated with a mild or no reduction of T cell brain infiltration. However, combined inhibition of CCR1, CCR5 and CXCR3 through administration of the CCR1/CCR5 antagonist Met-RANTES to CXCR3-deficient mice, resulted in a significant neuroprotection against MPTP-induced DN cell death. Altogether, our data suggest that T cell brain extravasation during parkinsonism may proceed through distinct chemokine ligand/receptor pathways playing redundant roles in PD pathogenesis.

Introduction

Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder characterized by the loss of dopamine-containing neurons (DNs) in the substantia nigra pars compacta (SNpc). Except for rare genetic forms, PD is a sporadic condition of unknown cause. Yet, several scenarios regarding the mechanisms by which DNs degenerate have been suggested including mitochondrial dysfunction, oxidative stress and the impairment of protein degradation machinery (Dauer and Przedborski, 2003). Besides these cell-autonomous mechanisms of neuronal cell death, a growing body of evidence points towards the involvement of innate and adaptive immune responses in the degenerative process (Hirsch and Hunot, 2009). In particular, we and others have shown that peripheral T cells infiltrate the brain parenchyma during experimental parkinsonism and that accumulation of $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells in the SNpc is a neuropathological characteristic of human PD (McGeer et al., 1988; Brochard et al., 2009; Kurkowska-Jastrzebska et al., 1999; Theodore et al., 2008; Sanchez-Guajardo et al., 2010). Importantly, we have previously demonstrated that in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model of PD, infiltrated $CD4^+$ T cells are deleterious and participate to the demise of DN (Brochard et al., 2009). On the basis of these findings, preventing T cell infiltration during parkinsonism may represent an attractive therapeutic strategy for PD patients. Yet, the mechanism underlying such extravasation process is still largely unknown. In absence of major blood-brain-barrier (BBB) breakdown, the emigration of circulating leukocytes from the blood-stream to the brain parenchyma is tightly regulated by integrin-mediated adhesions and chemokine signals. Whereas chemokine pathways have been shown to play an instrumental role in orchestrating this infiltration in various inflammatory and neurodegenerative contexts (Bromley et al., 2008), their function in PD pathogenesis and in particular in T cell trafficking across the BBB remains uncertain. Indeed,

the few studies reporting on the functional importance of the chemokine network in PD have been focused on pathways preferentially involved in myeloid cell biology and trafficking (Cardona et al., 2006; Sriram et al., 2006, Pattarini et al., 2007; O'Callaghan et al., 2008).

In this study, we sought to determine changes in the chemokine signature associated with nigrostriatal pathway injury and identified potential candidates that may play a critical role in T cell brain recruitment and neurodegeneration during parkinsonism. We found that glial-derived CCL3, CCL4 and CXCL10 were strongly induced in the SN of mice exposed to MPTP intoxication. A similar up-regulated expression of *Ccl3* and *Ccl4* was further observed in the SNpc of parkinsonian patients suggesting similarities between the experimental model and the human disease. We also show that combined, but not individual, inhibition of CCR1, CCR5 and CXCR3 afforded neuroprotection suggesting that T cell brain recruitment during parkinsonism proceeds through different, but redundant, chemokine pathways.

Results

MPTP-induced nigrostriatal pathway injury is associated with increased expression of CCL3, CCL4 and CXCL10.

In mouse, MPTP-induced nigrostriatal pathway injury is associated with a nigral recruitment of circulating T cells in the absence of major BBB breakdown suggesting that leukocyte extravasation is likely to be regulated by integrin-mediated adhesions and chemokine signals (Brochard et al., 2009). To identify chemokine factors that could possibly be involved in the emigration of peripheral T cells into the brain in this experimental model of PD, we determined the chemokine signature in the ventral mesencephalon of MPTP-treated mice. To validate our experimental material, we first assessed changes in the expression level of cellular and inflammatory markers before and after disease induction. As expected, 2 days after MPTP intoxication, *Th* mRNA level in the ventral mesencephalon was strongly reduced whereas expression of glial cell activation markers (*Gfap*, *H2-K1, Trem2*, *B2m*) and inflammatory cytokines (*Tnfa*, *Ifng*) were found to increase significantly compared to saline-injected animals (Fig. 1A). At this time point, when microglial cell-associated innate immune response is in full progress and SN invasion by peripheral T cells is initiated, the CXCR3 ligand CXCL10 (IP-10) was the most highly up-regulated chemokine in terms of mRNA level (23-fold induction) (Fig. 1B). In addition to this CXCR3 ligand, the CC chemokines CCL3 (MIP-1α) and CCL4 (MIP-1β) (ligands for CCR1 and CCR5), and CCL2 and CCL12 (ligands for CCR2) were also induced but to lower levels than CXCL10 (Fig. 1B). Finally, a modest but significant increased in CCL6 and CCL9 was also noticed whereas CCL19, CXCL4, CXCL12 and CXCL13 were slightly reduced. All other tested chemokines (n=22) did not show significant changes in expression following MPTP intoxication. As peripheral T cells continuously infiltrate into the brain from 2 to 7 days after disease induction (Brochard et al., 2009), we assessed mRNA expression for

these chemokine ligands at this latter time point. Of note, reduced *Th* expression and increased levels of some glial cell markers (*Trem2*, *B2m*) were still observed at this stage of disease development together with an increase of T cell-associated phenotypic and differenciation markers (*Cd3e*, *Cd3g*, *Cd3d*, *Tbx21*, *Foxp3*, *Rorc*). By day 7 after MPTP intoxication, most of the chemokine ligands showing increased expression at day 2 were down-regulated to levels that were not statistically different from saline-injected control animals. Yet, significant up-regulation of CCL2 and CCL3 was still detected at 7 days after MPTP exposure. Finally, a slight increase in CCL5 (RANTES, a CCR5 ligand) was also noticed at this later time point (Fig. 1B *inset*). Thus, the chemokine signature in the injured SN changes as a function of time in this mouse model of PD.

To further assess changes in chemokine expression following nigrostriatal pathway injury, we measured by ELISA chemokine protein levels in brain homogenates from mice previously used for qPCR analysis. We focused our analysis on CCL3, CCL4, CCL5 and CXCL10 which, unlike the macrophage attracting factors CCL2 and CCL12, have been strongly implicated in T cell recruitment in inflamed tissues (Bromley et al., 2008). Consistent with qPCR data, the content of CCL3, CCL4 and CXCL10 in the ventral mesencephalon was increased by day 2 after MPTP exposure but decreased by day 7 at a level that was not significantly different from levels detected in saline-treated mice (Fig. 2). Interestingly, a strong and positive correlation was found between mRNA and protein expression levels for these 3 ligands. By contrast, CCL5 was barely detectable in both saline- and MPTP-injected mice and changes in expression could not be determined for this factor (data not shown).

Glial cells are a major source of CCL3, CCL4 and CXCL10 during nigrostriatal pathway injury.

The above data suggest that CCL3, CCL4 and CXCL10 are induced in the ventral mesencephalon following MPTP-mediated DA injury in mouse. To further confirm these data and determine the cellular origin of inflammatory chemokines during PD-like neurodegeneration, we performed immunohistochemical analysis of CCL3, CCL4 and CXCL10 on mesencephalon tissue sections. We first validated the specificity of primary antibodies directed against CCL3, CCL4 or CXCL10 using multiple approaches including gene targeting deletion and immunoadsorption in a mouse model of nigral neuroinflammation induced by stereotaxic LPS injection (Castano et al., 1998). In this model, a robust expression of CCL3 and CXCL10 was observed in the SNpc of C57BL6J mice 24 hours after LPS administration. This expression was associated with strong microglial cell activation and astrogliosis. The CCL3 staining observed following LPS injection was completely abolished in *Ccl3*$^{-/-}$ mice whereas CXCL10 staining in these mice remained as strong as in wild-type animals indicating that the absence of CCL3 did not hamper LPS-induced neuroinflammation in mutant mice (Fig. S1). Similarly, CXCL10 staining was completely abolished in *Cxcl10*$^{-/-}$ mice whereas CCL3 staining was still observed in mutant mice (Fig. S2). Because *Ccl4*$^{-/-}$ mice were not available, we tested CCL4 staining specificity by pre-incubating the anti-CCL4 primary antibody with CCL4 recombinant protein. In these conditions, CCL4 staining in MPTP-intoxicated C57BL6J mice was absent (Fig. S10B). Similar conclusions were driven for CCL3 and CXCL10 staining specificity using preadsorption tests. Finally, omission of anti-chemokine primary antibodies resulted in absence of staining (Fig. S6A, S10A and S14A).

Having validated the specificity of the chemokine antibodies, we performed triple immunofluorescence straining experiments on ventral midbrain tissue sections from mice exposed or not to MPTP. Figures 3 and 4 show that nigral Iba1^{+} microglial cells are the main

producer of both CCL3 and CCL4 after MPTP-induced DA injury. By contrast, CCL3 and CCL4 were never observed in $GFAP^+$ astrocytes and $PECAM^+$ vascular endothelial cells (Fig. S4, S5, S8 and S9). Interestingly, CCL3 and CCL4 were detected clustered and/or in vesicle-like structures distributed in the cell body of microglial cells (Fig. 3E, 3F, 4E and 4F). Unlike CCL3 and CCL4, CXCL10 was only detected within $GFAP^+$ astrocytes (Fig 5A-E). However, some CXCL10 staining was also observed on cellular elements displaying astrocytic-like morphology characterized by low or no GFAP expression reminiscent to immature astrocytes (Fig. 5C-D). Absence of co-localization between CXCL10 and Iba1, TH or PECAM confirms the strict astrocytic source of this chemokine in the lesioned SNpc (Fig. S12 and S13). Finally, CXCL10 astrocytic staining was detected in several clusters distributed in the cell body (Fig. 5E).

Single deficit for Ccr1 but not Ccr5 is mildly protective against MPTP toxic effects.

Combined inhibition of Ccr1, Ccr5 and Cxcr3 but not single deficit for Cxcr3 protects against MPTP injury.

The elevated and early nigral expression of CCL3, CCL4 and CXCL10 after MPTP treatment indicates that these inflammatory chemotactic factors could be involved in the extravasation of circulating T cell within the injured SN. Indeed, effector and memory T cells are known to be equipped with several chemokine receptors such as CCR1 and CCR5 (receptors for CCL3 and CCL4) and CXCR3 (receptor for CXCL10), allowing them to respond to chemokine gradient at sites of inflammation. To test this hypothesis, we compared the effects of MPTP in mutant mice lacking either the chemokine receptor CCR1, CCR5 or CXCR3 and in their wild-type (WT) littermates. We found that whereas only 49% of nigral TH^+ DNs survived MPTP injection in WT mice, 59% of these neurons survived in *Ccr1*$^{-/-}$ mice exposed to a

similar MPTP regimen (Fig. 6A). This modest increase in TH^+ DA survival was associated with a small reduction of infiltrated $CD8^+$ T cells whereas the number of $CD4^+$ T cells was similar in both genotypes (Fig. 6B and D). Unlike CCR1-deficient animals, *Ccr5*$^{-/-}$ and *Cxcr3*$^{-/-}$ mice were equally susceptible to MPTP-induced DA cell death as their WT littermates with no major differences in the number of infiltrated T cells except that of $CD8^+$ T cells that was slightly decreased in *Ccr5*$^{-/-}$ mice (Fig. 6C, 6D and 7A).

The absence of major impact on neuropathological outcomes in mice lacking a single chemokine receptor following MPTP intoxication may indicate that different chemokine pathways could cooperate to promote T cell accumulation in the inflamed SN. Indeed, it has been previously documented that efficient blockade of lymphocyte brain extravasation may require multiple receptor inhibition (Shulman et al., 2012). To address such possibility we used genetic and pharmacological approaches to achieve combined and simultaneous inhibition of CCR1, CCR5 and CXCR3. To that end, we took advantage of Met-RANTES, a nanomolar antagonist of both CCR1 and CCR5 (Proudfoot et al., 1999) that was administrated to WT or *Cxcr3*$^{-/-}$ mice. As shown in Figure 7, whereas i.p. administration of Met-RANTES in WT mice does not change the rate of DA cell death obtained in PBS-treated WT and *Cxcr3*$^{-/-}$ animals following MPTP exposure, a significant reduction of DA cell loss was observed in *Cxcr3*$^{-/-}$ mice that were co-administrated with the antagonist (36% protection). Together, our data suggest that CCR1, CCR5 and CXCR3 play independent and additive role in mediating T cell-induced neurodegeneration in the MPTP mouse model of PD.

Ccl3 and Ccl4 mRNA are up-regulated in the *substantia nigra* of parkinsonian patients.

To determine the relevance of our findings obtained in a toxin-based animal model of the disease, we examined by real-time qPCR the expression of *Ccl3*, *Ccl4* and *Cxcl10* in brain

tissue samples obtained *postmortem* from parkinsonian patients and control individuals. We first identified and validated reference genes to be used for proper normalization of chemokine gene expression. Among 8 putative reference genes tested (*Actb*, *Eif4a2*, *Gapdh*, *Hprt*, *Sf3a1*, *Tbp*, *Top1* and *Ywhaz*), we found that *Top1* and *Sf3a1* were the most stable in terms of expression level in the SN across PD patients (n=24) and control subjects (n=20) whereas *Actb*, *Gapdh*, *Tbp* and *Ywhaz* were significantly down-regulated in parkinsonian patients compared to control individuals ($P < 0.05$, data not shown). Using these 2 genes as normalizers, we observed a significant increase in *Ccl3* and *Ccl4* mRNA expression level in the SN of PD patients compared to control subjects (Fig. 8). Although *Cxcl10* showed a trend to increased expression in parkinsonian patients, this difference did not reached statistical significance (Fig. 8; P=0.612, Mann-Whitney U test). Finally, consistent with the massive loss of dopaminergic neurons in the SN during PD, *Th* mRNA expression level was reduced by 78% in nigral tissue from PD patients (data not shown) thus confirming the neuropathological diagnosis of our PD cases.

Discussion

Mounting evidence support a role for the adaptive arm of the immune system in PD pathogenesis (Hirsch and Hunot, 2009). Not only circulating T cells were found to infiltrate the injured nigrostriatal pathway in both PD patients and MPTP-intoxicated mice, but also infiltrated T cells were shown to mediate DN cell death in the MPTP mouse model (McGeer et al., 1988; Kurkowska-Jastrzebska et al., 1999; Brochard et al., 2009). This raises the tantalizing hypothesis that targeting this adaptive immune response may represent an interesting therapeutic perspective for PD patients. One strategy that can be though about to combat such T cell-mediated neurodestructive mechanism would be to prevent circulating T cells to emigrate into the inflamed brain tissue. Yet, this requires a deep understanding of the molecular mechanisms underlying such leukocyte extravasation across the BBB. In this study, we present evidence that glial-cell derived chemokines are induced under DN injury. Importantly, we have shown that combined blockade of multiple chemokine receptors was necessary to achieve marked neuroprotection in this context suggesting that chemokine pathways may constitute a valid therapeutic target.

Consistent with previous reports, we found that experimental lesion of the nigrostriatal pathway in MPTP intoxicated mice results in an up-regulation of *Ccl3*, *Ccl4* and *Cxcl10* genes expression in the ventral mesencephalon (Kalkonde et al., 2007; Pattarini et al., 2007; L'Episcopo et al., 2011). Importantly, such changes in chemokine gene expression were also observed in the SN of PD patients suggesting that the MPTP mouse model recapitulates, at least to some extent, the neuroinflammatory characteristics of the human disease and represents therefore a legitimate disease model to study the function of chemokine pathways in T cell brain recruitment and dopaminergic neurodegeneration. Unlike previous studies, we not only showed that CCL3, CCL4 and CXCL10 protein levels were also increased

in the ventral mesencephalon following MPTP-induced DN injury but also determined the precise localization of these ligands i.e. in the vicinity of midbrain DNs of the SN. Within the injured SN, microglia and astrocytes were identified as the main cellular sources of CCL3/CCL4 and CXCL10, respectively. Our observations are consistent with previous studies showing that, in various pathological contexts, microglial cells represent one the main cell population capable of producing both CCL3 and CCL4 (Peterson et al., 1997; Simpson et al., 1998; Balashov et al., 1999; Bianchi et al., 2011; Johnson et al., 2011; Mayer et al., 2011). Similarly, the restricted astrocytic expression of CXCL10 in the lesioned SN is consistent with previous reports describing CXCL10 expression pattern in various neuroinflammatory contexts including Alzheimer's disease (Ransohoff et al., 1993; Vanguri, 1995; Tani et al., 1996; Lane et al., 1998; Ren et al., 1998; Sauder et al., 2000; Xia et al., 2000; Asensio et al., 2001; Muller et al., 2007). Thus, glial cells which get rapidly activated upon DN injury produce factors that participate to the inflammatory remodeling of DN microenvironment which in turn may favor and drive emigration of circulating leukocytes at site of neuronal injury. In line with this, we could observe CCL3 and CXCL10 staining in close contact to blood vessel walls in the SN of mice intoxicated with MPTP. As CCL3 and CXCL10 were not detected in vascular $PECAM^+$ endothelial cells, it is likely that $CCL3^+$ microglial and $CXCL10^+$ astrocytic processes contacting blood vessels may deliver chemotactic signals necessary for lymphocyte extravasation across the BBB. Chemokines are generally secreted factors and their detection in the Golgi compartment as well as secretory granules have been previously reported in many different cell populations including endothelial cells and $CD8^+$ lymphocytes (Oynebraten et al., 2004; Catalfamo et al., 2004; Oynebraten et al., 2005; Shulman et al., 2012). Interestingly, CCL3, CCL4 and CXCL10 presented different subcellular localization patterns within their respective producer in our MPTP mouse model. Whereas in microglial

cells both CCL3 and CCL4 were distributed in structures reminiscent of Golgi and secretory granules, CXCL10 was observed in numerous clusters throughout the astrocytic cell body. Collectively, our results showing early changes of the chemokine network associated with dopaminergic lesion suggest that chemokine pathways could be involved in the mechanisms driving the recruitment of T cells in the SN. In particular, expression of CCL3, CCL4 and CXCL10 as early as 24 hours after MPTP exposure, i.e. before the first wave of T cell infiltration, is compatible with the view that these ligands may be involved in cerebral T lymphocyte extravasation in this animal model of PD (Kurkowska-Jastrzebska et al., 1999; Brochard et al., 2009). It is worth noting, however, that besides the continuous brain recruitment of leukocytes up to 7 days after disease initiation, expression of CCL3, CCL4 and CXCL10 dramatically decreases at this later time point suggesting that these chemokine ligands may play important role in early but not late infiltration process. Yet, other chemokine factors may take over CCL3, CCL4 and CXCL10 in orchestrating T cell brain extravasation. This hypothesis is supported by the increased expression of a different subset of chemokines (*Ccl5*, *Ccl6* and *Ccl9*) 7 days after MPTP injection. Thus, the chemokine signature of the injured SN changes dynamically along with the different phases of the degenerative process. These changes may in turn control the recruitment of different T cell populations expressing distinct class of chemokine receptors.

Another contribution of our study is the demonstration that targeting chemokine receptors for CCL3, CCL4 and CXCL10 can afford neuroprotection in experimental parkinsonism. In particular, combined inhibition of CCR1, CCR5 and CXCR3 was necessary to improve disease outcome after MPTP exposure whereas individual inhibition of each of these receptors had little if no impact on the neurodegenerative process. Two potential nonexclusive explanations may be offered for this finding. First, chemokine pathways could play

redundant roles in T cell brain infiltration during MPTP-induced nigrostriatal pathway injury. Our multi-chemokine receptor targeting strategy supports such hypothesis. Second, systemic deletion of a given chemokine receptor as achieved in genetically engineered mouse with targeted deletion of CCR1, CCR5 or CXCR3, may have multiple biological consequences within and outside the central nervous system that could mask or overrule a potential neuroprotective effect. For instance, distinguishing between the role of chemokine pathways in the development of immunity versus trafficking of cells to the CNS represent an important issue (Trifilo and Lane, 2004). In line with this, the mild, but significant neuroprotection observed in CCR1-deficient mice despite similar $CD4^+$ T cell infiltration as compared to WT mice is intriguing. Because macrophages also express CCR1 (Charo and Taubman, 2004), one possible explanation is that CCR1 deficiency may affect primarily brain recruitment of blood-born monocyte/macrophages that has been shown to occur in the SN after MPTP-induced nigrostriatal pathway injury (Kokovay and Cunningham, 2005; Kokovay and Cunningham, 2005). Since bone marrow-derived microglia contribute to the neuroinflammatory response and express iNOS in this context (Kokovay and Cunningham, 2005), limiting their emigration into the brain through CCR1 blockade could have afforded partial neuroprotection as seen in our experiments. To overcome potential confounding effect of systemic chemokine receptor deletion, it would be valuable in the future to use adoptive transfer of WT versus chemokine receptor-deficient splenocytes to specifically address the role of the chemokine pathways in T cell brain recruitment during parkinsonism.

In summary, our findings support a role for the chemokine network in PD pathogenesis. Results presented here identify glial cells as the source of CCL3, CCL4 and CXCL10 chemokine ligands which are induced in the SN of MPTP-intoxicated mice and of PD patients. Moreover, we have shown that inhibition of a single chemokine pathway was ineffective in

preventing T cell brain infiltration and DN cell death. However, neuroprotection against MPTP-induced toxicity could be achieved by combined inhibition of CCR1, CCR5 and CXCR3 suggesting redundancy in the function of different chemokine pathways in our experimental model. Therefore, therapeutic strategies targeting the chemokine network in PD will have to take into account this critical aspect for successful intervention.

Material and methods

Animals. Ten- to twelve-week-old male C57BL/6J mice, weighing 25–30 g were purchased from the Centre d'Elevage R Janvier (CERJ, , France). The following strains were obtained from The Jackson Laboratory: B6.129P2-*Ccl3*^{tm1Unc}/J, B6.129S4-*Cxcl10*^{tm1Adl}/J, B6.129P2-*Cxcr3*^{tm1Dgen}/J, and corresponding parental wild-type inbred C57BL/6J. *Ccr1*$^{-/-}$ and *Ccr5*$^{-/-}$ mice were obtained from Dr. C. Combadière. Mice were kept in a temperature-controlled room (23°C ± 1°C) under a 12-hour light/dark cycle and had *ad libitum* access to food and water. Animal handling was carried out according to ethical regulations and guidelines (*Guide for the care and use of laboratory animals*. NIH publication no. 85-23. Revised 1985) and the European Communities Council Directive 86/609/EEC. Experiments using vertebrates were approved by the Services Vétérinaires de Paris.

Treatment and tissue preparation. Groups of mice received 4 i.p. injections of MPTP-HCl (20 mg/kg, except where otherwise stated) at 2-hour intervals and were sacrificed from 1 to 7 days after the last injection. Control mice received an equal volume of saline solution (0.09% NaCl). Treatment with Met-RANTES (Met-CCL5), an antagonist of the CCL5 receptors CCR1 and CCR5 (Proudfoot et al., 1996; Proudfoot et al., 1999), was performed by intraperitoneal injection (50 µg in PBS) three times at two days interval starting the day prior to MPTP injection. For stereotaxic surgery animals were deeply anesthetized with i.p. injection of 65 mg/kg ketamine and 6.5 mg/kg xylazine. Injection of LPS (1 µg/µl *Escherichia coli* LPS; Sigma-Aldrich) was made unilaterally above the SNpc using a 33-gauge syringe connected to a microinjector (Hamilton). The animals were subjected to stereotaxic surgery with the incisor bar set at the following coordinates: 2.90 mm posterior to the bregma, 1.30 mm bilateral to the midline, and 4.60 mm ventral to the skull surface. The volume of injection was 1 µl. Mice

were sacrificed one day after LPS administration. For qPCR and ELISA assays, mice were sacrificed by cervical dislocation and their brain rapidly extracted and dissected to recover the ventral mesencephalon that was frozen in liquid nitrogen. For immunohistochemistry, mice were euthanized with 100 mg/kg pentobarbital and transcardially perfused with 50 ml of heparin solution (5 U/ml) followed by 100 ml of 4% paraformaldehyde. Brains were then processed for sectioning according to previous protocol (Hunot et al., 2004) and 20µm-thick free-floating midbrain sections were prepared using a frozen microtome (Leica).

Human Samples. The study was performed on autopsy brain tissue from 20 control subjects and 24 parkinsonian patients, which were well-characterized clinically and neuropathologically (Hôpital de la Salpêtrière and CRicm Brain Bank). PD patients and control subjects did not differ significantly in terms of their mean age at death (PD patients, 79.71 ± 2.75 years of age; controls, 74.57 ± 1.38 years of age; P = 0.072, Student's t test; mean ± SEM). Mean interval from death to the freezing of tissue was significantly lower in PD patients compared to control individuals (PD patients, 15.77 ± 2.70 hours; controls, 26.24 ± 2.95 hours; P = 0.025, Mann-Whitney U test; mean ± SEM). Experiments using human postmortem material were approved by the Comité de Protection des Personnes review board (Ile de France 1, Paris, France). Frozen substantia nigra tissue was obtained either from blocks of mesencephalon or from 20 µm-thick tissue sections recovered on SuperFrost Plus slides (Kindler O GmbH).

Quantitative RT-PCR assay. Total RNA was harvested from homogenized brain tissue using the RNeasy Lipid Tissue Kit (QIAGEN). RNA samples were quantified using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) and their quality was assessed using a

Bioanalyzer (Agilent Technologies). For mice studies, RNA quality limits were A260/280 >2 and RIN >7. Human RNA quality was A260/280 >1.8 and 4>RIN>7 (to limit amplification variability due to differences in RNA quality; Fleige et al., 2006). Messenger RNA was then reverse transcribed using either SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Life Technologies ; mice studies) containing oligo-déoxy-thymine and random hexamers or High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies ; human studies) containing only random hexamers to prevent from potential bias due to RNA degradation with oligo-déoxy-thymine primers. To eliminate contaminating genomic DNA, RNA preparations were treated with RNase-free DNase (QIAGEN). Primers were chosen by using the computer program Primer Express 3.0 (Life Technologies). Whenever possible, oligonucleotides were designed to overlap exon–intron borders to avoid amplification of genomic DNA and amplicons size was always between 59 and 100 bp to limit amplification variability due to RNA quality differences (Fleige Biotechnol Lett 2006). The sequences of the specific PCR primers were as follows (5' to 3'): *hActb*, forward: CTGGCACCCAGCACAATG, reverse: GCCGATCCACACGGAGTACT; *hCcl3*, forward: CAACCAGTTCTCTGCATCACTTG, reverse: CGGGAGGTGTAGCTGAAGCA; *hCcl4*, forward: AGCGCTCTCAGCACCAATG, reverse: AGCTTCCTCGCAGTGTAAGAAAA; *hCxcl10*, forward: CCACGTGTTGAGATCATTGC, reverse: TTCTTGATGGCCTTCGATTC; *hEif4a2*, forward: CAAGGAGACCCAAGCACTAGTATTG, reverse: CTCCAAGTGCCAGAATTACCTTTT; *hGapdh*, forward: AATCCCATCACCATCTTCCA, reverse: TGGACTCCACGACGTACTCA; *hGfap*, forward: CTGGAGGTTGAGAGGGACAA, reverse: CAGCCTCAGGTTGGTTTCAT; *hHla-drα*, forward: TGGCGGCTTGAAGAATTTG, reverse: TTGGCCAATGCACCTTGAG; *hHprt1*, forward: GCAGACTTTGCTTTCCTTGG, reverse: AACACTTCGTGGGGTCCTTT; *hSf3a1*, forward: CCACCCAAAGGTTTATTTTCAAA, reverse: GGTAACACACCTGATCCAAAACTTC; *hTbp*, forward: CACCACAGCTCTTCCACTCA, reverse:

GGGGAGGGATACAGTGGAGT; *hTh*, forward: CCTCGGATGAGGAAATTGAG, reverse: CTGCTTACACAGCCCGAACT; *hTop1*, forward: AATGCCTCCATCACGCTACAG, reverse: GGCACGGTTATAAGAAAGGATCTTC; *hYwhaz*, forward: CTGGTGATGACAAGAAAGGGATT, reverse: GCATTTCCTTTTTGCTGATTTCA; *mβ2m*, forward: CACTGACCGGCCTGTATGC, reverse: GGTGGCGTGAGTATACTTGAATTTG; *mCxcl10*, forward: CATCCCTGCGAGCCTATCC, reverse: GGATTCAGACATCTCTGCTCATCA; *mCD68*, forward: TGGCGGTGGAATACAATGTG, reverse: GAGATGAATTCTGCGCCATGA; *mCD11b*, forward: CCGAGGTGCTCCTAAAACCA, reverse: GATGCTTACCTGGGTTATGCTTCT; *mCx3cr1*, forward: ATCAGCATCGACCGGTACCT, reverse: CTGCACTGTCCGGTTGTTCA; *mGapdh*, forward: TGTGTCCGTCGTGGATCTGA, reverse: CCTGCTTCACCACCTTCTTGA; *mGfap*, forward: CGCTCAATGCTGGCTTCA, reverse: AAGCGGTCATTGAGCTCCAT; *mHprt*, forward: CTTCCTCCTCAGACCGCTTTT, reverse: AACCTGGTTCATCATCGCTAATC; mF4/80, forward: GATGAATTCCCGTGTTGTTGGT, reverse: ACATCAGTGTTCCAGGAGACACA; *mTh*, forward: GGATGTGTCTCACTTCTTGAAGGA, reverse: AGAAAATCACGGGCAGACAGTAG. Quantitative RT-PCR was performed using SYBRGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems) on a *7500 Real-Time PCR System* (Life Technologies). In mice, all quantitative PCR reactions were normalized to *Gapdh* and *Hprt* transcripts expression. Gene expression assays were performed with custom TaqMan Low Density Arrays following manufacturer's instructions (Life Technologies). In humans, because the widely used transcript of *Gapdh* can be subject to regulation, thus making it less suitable for normalization (Coulson et al., 2008) and 1 gene may be insufficient for proper normalization (Vandesompele et al., 2002), we analyzed transcripts for *Actb*, *Eif4a2*, *Gapdh*, *Hprt1*, *Sf3a1*, *Tbp*, *Top1*, *Ywhaz* with geNorm software (Vandesompele et al., 2002; Biogazelle). Because *Top1* and *Sf3a1* transcripts were found to be the most stable genes between control and

parkinsonian SN, all quantitative PCR reactions were normalized to their expression. Data were analyzed with qBASE plus software (Biogazelle).

ELISA. Hemi-ventral mesencephalons were homogenized in sterile Tris-NaCl buffer containing proteases inhibitors (cOmplete ULTRA, Roche) and centrifuged at 12000g for 30 minutes. Protein homogenates were concentrated on Amicon Ultra columns (Millipore) prior to chemokine measurement using murine Quantikine Immunoassay kits according to the manufacturer's recommendations (R§D systems).

Immunohistochemistry. For immunohistochemical staining, mouse midbrain sections were incubated with primary antibodies directed against TH (T9237-13; rabbit polyclonal; dilution 1:500; US Biological), CD4 (clone YTS191.1; rat monoclonal IgG2b; dilution 1/100; Abd Serotec), CD8α (clone KT15; rat monoclonal IgG2a ; dilution 1/100; Abd Serotec), at 4°C for 24 to 48 hours. Staining was revealed by the ABC method (Vector Laboratories, Burlingame, CA) using biotin-conjugated secondary antibody (BA-1000, anti-rabbit IgG, dilution 1/250, Vector laboratories; STAR131B, polyclonal anti-rat IgG, dilution 1/200, Abd Serotec) followed by avidin–biotin conjugated peroxidase and 3,3′-diaminobenzidine as the peroxidase substrate (Sigma-Aldrich). For multiple antigen detection, brain sections were incubated for 48 hours at 4°C with a combination of 3 different primary antibodies developed in different species: anti-CCL3 (AF-450-NA; Goat IgG; dilution 1:100; R§D Systems), anti-CCL4 (AF-451-NA; Goat IgG; dilution 1:100; R§D Systems), anti-CXCL10 (AF-466-NA; Goat IgG; dilution 1:100; R§D Systems), anti-TH (22941; mouse monoclonal IgG1; dilution 1:500; Immunostar), anti-Iba1 (019-19741; rabbit polyclonal; dilution 1/500; Wako), anti-GFAP (Z0334; rabbit polyclonal; dilution 1/4000; Dako) and anti-PECAM1 (ab28364; rabbit polyclonal; dilution

1/15; Abcam). Appropriate donkey Alexa Fluor 488-, Alexa Fluor 555- and Alexa Fluor 647-conjugated secondary antibodies (Life Technologies) were then applied for 1 hour at room temperature at 1:1000 dilution.

Image and data analysis. DAB-immunostained sections were analysed by bright field microscopy using a Leitz microscope equipped with image analysis software (Mercator, ExploraNova, La Rochelle, France). TH^+ cell bodies were quantified stereologically on regularly spaced sections covering the whole SNpc using the VisioScan stereology tool. The investigator performing the quantification was blinded to the treatment and genotype groups during the analysis. Fluorescent sections were analysed on a Zeiss Axioplan 2 using ExploraNova FluoUp 1.0 software.

Total numbers of TH-, CD4- and CD8-positive cells were counted in one SNpc according to criteria defined by German et al. and Paxinos et al. (German et al., 1996; Paxinos, 2001).

Sections were examined with *i)* a fluorescence microscope Zeiss Axioplan 2, equipped with an Evolution QEi digital camera and using ExploraNova FluoUp 1.0 software and *ii)* an upright confocal laser scanning microscope Olympus FV-1000 and using Olympus FV-1000 software. Images were then prepared with Image J software.

Statistics. All values are expressed as the mean ± SEM. Differences in means between 2 groups were analyzed using 2-tailed Student's *t* test or, when data were not normally distributed, with a nonparametric Mann-Whitney *U* test. Differences in means among multiple data sets were analyzed using 1-, 2- or 3-way ANOVA with time, treatment, or genotype as the independent factors. When ANOVA showed significant differences, pair-wise comparisons between means were tested by Holm-Sidak post-hoc analysis. When data

were not normally distributed, ANOVA on ranks was used (Kruskal-Wallis test followed by pairwise comparison using Dunn test). Spearman rank correlation coefficient was used to evaluate statistical dependence between two variables of non-parametric distribution. In all analyses, *P* values of less than 0.05 were considered significant (SigmaStat Statistical Software, Jandel Scientific).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Aknowledgments

The authors wish to thank Dr. M.C. Dieu-Nosjean and T. Fredriksen for their advices in using TaqMan microfluidic arrays; A. Dauphin and A. Rouche from the Cellular Imaging facility (Pitié Salpêtrière - PICPS) for their help in confocal microscopy; J. Garrigue from the Genomic facility (ICM) for assistance in quantitative PCR and genotyping; and S. Turban from the national brain bank NeuroCeb (France) for preparing and providing *post-mortem* material. This work was supported by grants from The Michael J. Fox Foundation for Parkinson Research (SH), ANR (ParKemos grant; SH and CC) and IHU-A-ICM (SH). Amaury Bekaert was supported by fellowships from the Ministère de la Recherche et des Technologies and the Fondation pour la Recherche Médicale. SH and ECH are investigators at the CNRS.

References

Asensio, V.C., J. Maier, R. Milner, K. Boztug, C. Kincaid, M. Moulard, C. Phillipson, K. Lindsley, T. Krucker, H.S. Fox, and I.L. Campbell. 2001. Interferon-independent, human immunodeficiency virus type 1 gp120-mediated induction of CXCL10/IP-10 gene expression by astrocytes in vivo and in vitro. *Journal of virology* 75:7067-7077.

Balashov, K.E., J.B. Rottman, H.L. Weiner, and W.W. Hancock. 1999. CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:6873-6878.

Bianchi, R., E. Kastrisianaki, I. Giambanco, and R. Donato. 2011. S100B protein stimulates microglia migration via RAGE-dependent up-regulation of chemokine expression and release. *The Journal of biological chemistry* 286:7214-7226.

Brochard, V., B. Combadiere, A. Prigent, Y. Laouar, A. Perrin, V. Beray-Berthat, O. Bonduelle, D. Alvarez-Fischer, J. Callebert, J.M. Launay, C. Duyckaerts, R.A. Flavell, E.C. Hirsch, and S. Hunot. 2009. Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *The Journal of clinical investigation* 119:182-192.

Bromley, S.K., T.R. Mempel, and A.D. Luster. 2008. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nature immunology* 9:970-980.

Cardona, A.E., E.P. Pioro, M.E. Sasse, V. Kostenko, S.M. Cardona, I.M. Dijkstra, D. Huang, G. Kidd, S. Dombrowski, R. Dutta, J.C. Lee, D.N. Cook, S. Jung, S.A. Lira, D.R. Littman, and R.M. Ransohoff. 2006. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature neuroscience* 9:917-924.

Castano, A., A.J. Herrera, J. Cano, and A. Machado. 1998. Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system. *Journal of neurochemistry* 70:1584-1592.

Catalfamo, M., T. Karpova, J. McNally, S.V. Costes, S.J. Lockett, E. Bos, P.J. Peters, and P.A. Henkart. 2004. Human CD8+ T cells store RANTES in a unique secretory compartment and release it rapidly after TcR stimulation. *Immunity* 20:219-230.

Charo, I.F., and M.B. Taubman. 2004. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circulation research* 95:858-866.

Coulson, D.T., S. Brockbank, J.G. Quinn, S. Murphy, R. Ravid, G.B. Irvine, and J.A. Johnston. 2008. Identification of valid reference genes for the normalization of RT qPCR gene expression data in human brain tissue. *BMC molecular biology* 9:46.

Dauer, W., and S. Przedborski. 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889-909.

Fleige, S., V. Walf, S. Huch, C. Prgomet, J. Sehm, and M.W. Pfaffl. 2006. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnology letters* 28:1601-1613.

German, D.C., E.L. Nelson, C.L. Liang, S.G. Speciale, C.M. Sinton, and P.K. Sonsalla. 1996. The neurotoxin MPTP causes degeneration of specific nucleus A8, A9 and A10 dopaminergic neurons in the mouse. *Neurodegeneration : a journal for neurodegenerative disorders, neuroprotection, and neuroregeneration* 5:299-312.

Hirsch, E.C., and S. Hunot. 2009. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet neurology* 8:382-397.

Hunot, S., M. Vila, P. Teismann, R.J. Davis, E.C. Hirsch, S. Przedborski, P. Rakic, and R.A. Flavell. 2004. JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:665-670.

Johnson, E.A., T.L. Dao, M.A. Guignet, C.E. Geddes, A.I. Koemeter-Cox, and R.K. Kan. 2011. Increased expression of the chemokines CXCL1 and MIP-1alpha by resident brain cells precedes neutrophil infiltration in the brain following prolonged soman-induced status epilepticus in rats. *Journal of neuroinflammation* 8:41.

Kalkonde, Y.V., W.W. Morgan, J. Sigala, S.K. Maffi, C. Condello, W. Kuziel, S.S. Ahuja, and S.K. Ahuja. 2007. Chemokines in the MPTP model of Parkinson's disease: absence of CCL2 and its receptor CCR2 does not protect against striatal neurodegeneration. *Brain research* 1128:1-11.

Kokovay, E., and L.A. Cunningham. 2005. Bone marrow-derived microglia contribute to the neuroinflammatory response and express iNOS in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease* 19:471-478.

Kurkowska-Jastrzebska, I., A. Wronska, M. Kohutnicka, A. Czlonkowski, and A. Czlonkowska. 1999. MHC class II positive microglia and lymphocytic infiltration are present in the

substantia nigra and striatum in mouse model of Parkinson's disease. *Acta neurobiologiae experimentalis* 59:1-8.

L'Episcopo, F., C. Tirolo, N. Testa, S. Caniglia, M.C. Morale, C. Cossetti, P. D'Adamo, E. Zardini, L. Andreoni, A.E. Ihekwaba, P.A. Serra, D. Franciotta, G. Martino, S. Pluchino, and B. Marchetti. 2011. Reactive astrocytes and Wnt/beta-catenin signaling link nigrostriatal injury to repair in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease* 41:508-527.

Lane, T.E., V.C. Asensio, N. Yu, A.D. Paoletti, I.L. Campbell, and M.J. Buchmeier. 1998. Dynamic regulation of alpha- and beta-chemokine expression in the central nervous system during mouse hepatitis virus-induced demyelinating disease. *Journal of immunology* 160:970-978.

Mayer, A.M., J.A. Clifford, M. Aldulescu, J.A. Frenkel, M.A. Holland, M.L. Hall, K.B. Glaser, and J. Berry. 2011. Cyanobacterial Microcystis aeruginosa lipopolysaccharide elicits release of superoxide anion, thromboxane B(2), cytokines, chemokines, and matrix metalloproteinase-9 by rat microglia. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 121:63-72.

McGeer, P.L., S. Itagaki, B.E. Boyes, and E.G. McGeer. 1988. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38:1285-1291.

Muller, M., S.L. Carter, M.J. Hofer, P. Manders, D.R. Getts, M.T. Getts, A. Dreykluft, B. Lu, C. Gerard, N.J. King, and I.L. Campbell. 2007. CXCR3 signaling reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling the parenchymal distribution of effector and regulatory T cells in the central nervous system. *Journal of immunology* 179:2774-2786.

O'Callaghan, J.P., K. Sriram, and D.B. Miller. 2008. Defining "neuroinflammation". *Annals of the New York Academy of Sciences* 1139:318-330.

Oynebraten, I., O. Bakke, P. Brandtzaeg, F.E. Johansen, and G. Haraldsen. 2004. Rapid chemokine secretion from endothelial cells originates from 2 distinct compartments. *Blood* 104:314-320.

Oynebraten, I., N. Barois, K. Hagelsteen, F.E. Johansen, O. Bakke, and G. Haraldsen. 2005. Characterization of a novel chemokine-containing storage granule in endothelial

cells: evidence for preferential exocytosis mediated by protein kinase A and diacylglycerol. *Journal of immunology* 175:5358-5369.

Pattarini, R., R.J. Smeyne, and J.I. Morgan. 2007. Temporal mRNA profiles of inflammatory mediators in the murine 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyrimidine model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 145:654-668.

Paxinos, G., Franklin, K.B.J. 2001. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.

Peterson, P.K., S. Hu, J. Salak-Johnson, T.W. Molitor, and C.C. Chao. 1997. Differential production of and migratory response to beta chemokines by human microglia and astrocytes. *The Journal of infectious diseases* 175:478-481.

Proudfoot, A.E., R. Buser, F. Borlat, S. Alouani, D. Soler, R.E. Offord, J.M. Schroder, C.A. Power, and T.N. Wells. 1999. Amino-terminally modified RANTES analogues demonstrate differential effects on RANTES receptors. *The Journal of biological chemistry* 274:32478-32485.

Proudfoot, A.E., C.A. Power, A.J. Hoogewerf, M.O. Montjovent, F. Borlat, R.E. Offord, and T.N. Wells. 1996. Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist. *The Journal of biological chemistry* 271:2599-2603.

Ransohoff, R.M., T.A. Hamilton, M. Tani, M.H. Stoler, H.E. Shick, J.A. Major, M.L. Estes, D.M. Thomas, and V.K. Tuohy. 1993. Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 7:592-600.

Ren, L.Q., N. Gourmala, H.W. Boddeke, and P.J. Gebicke-Haerter. 1998. Lipopolysaccharide-induced expression of IP-10 mRNA in rat brain and in cultured rat astrocytes and microglia. *Brain research. Molecular brain research* 59:256-263.

Sanchez-Guajardo, V., F. Febbraro, D. Kirik, and M. Romero-Ramos. 2010. Microglia acquire distinct activation profiles depending on the degree of alpha-synuclein neuropathology in a rAAV based model of Parkinson's disease. *PloS one* 5:e8784.

Sauder, C., W. Hallensleben, A. Pagenstecher, S. Schneckenburger, L. Biro, D. Pertlik, J. Hausmann, M. Suter, and P. Staeheli. 2000. Chemokine gene expression in astrocytes of Borna disease virus-infected rats and mice in the absence of inflammation. *Journal of virology* 74:9267-9280.

Shulman, Z., S.J. Cohen, B. Roediger, V. Kalchenko, R. Jain, V. Grabovsky, E. Klein, V. Shinder, L. Stoler-Barak, S.W. Feigelson, T. Meshel, S.M. Nurmi, I. Goldstein, O. Hartley, C.G. Gahmberg, A. Etzioni, W. Weninger, A. Ben-Baruch, and R. Alon. 2012. Transendothelial migration of lymphocytes mediated by intraendothelial vesicle stores rather than by extracellular chemokine depots. *Nature immunology* 13:67-76.

Simpson, J.E., J. Newcombe, M.L. Cuzner, and M.N. Woodroofe. 1998. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta-chemokines by resident glia and inflammatory cells in multiple sclerosis lesions. *Journal of neuroimmunology* 84:238-249.

Sriram, K., D.B. Miller, and J.P. O'Callaghan. 2006. Minocycline attenuates microglial activation but fails to mitigate striatal dopaminergic neurotoxicity: role of tumor necrosis factor-alpha. *Journal of neurochemistry* 96:706-718.

Tani, M., A.R. Glabinski, V.K. Tuohy, M.H. Stoler, M.L. Estes, and R.M. Ransohoff. 1996. In situ hybridization analysis of glial fibrillary acidic protein mRNA reveals evidence of biphasic astrocyte activation during acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *The American journal of pathology* 148:889-896.

Theodore, S., S. Cao, P.J. McLean, and D.G. Standaert. 2008. Targeted overexpression of human alpha-synuclein triggers microglial activation and an adaptive immune response in a mouse model of Parkinson disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 67:1149-1158.

Trifilo, M.J., and T.E. Lane. 2004. The CC chemokine ligand 3 regulates CD11c+CD11b+CD8alpha- dendritic cell maturation and activation following viral infection of the central nervous system: implications for a role in T cell activation. *Virology* 327:8-15.

Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3:RESEARCH0034.

Vanguri, P. 1995. Interferon-gamma-inducible genes in primary glial cells of the central nervous system: comparisons of astrocytes with microglia and Lewis with brown Norway rats. *Journal of neuroimmunology* 56:35-43.

Xia, M.Q., B.J. Bacskai, R.B. Knowles, S.X. Qin, and B.T. Hyman. 2000. Expression of the chemokine receptor CXCR3 on neurons and the elevated expression of its ligand IP-10 in reactive astrocytes: in vitro ERK1/2 activation and role in Alzheimer's disease. *Journal of neuroimmunology* 108:227-235.

Figure legends

Figure 1: CCL3, CCL4 and CXCL10 mRNA expression is highly up-regulated in MPTP-treated mice ventral mesencephalon.

(A) Relative expression of cellular markers and cytokines in the ventral mesencephalon of MPTP-intoxicated mice 2 days (grey) and 7 days (black) after MPTP exposure. (B) Relative expression of chemokine ligands in the ventral mesencephalon of MPTP-intoxicated mice 2 days and 7 days (inset) after intoxication. The relative expression of target gene were obtained in monoplicate and normalized against the transcript levels of *Gapdh* and *Hprt*. Data are represented as the mean ± SEM of the relative expression of 3 saline- and 7 MPTP-treated animals. **P* < 0.05 compared with saline injected mice (Student T test), §*P*<0.05 compared with saline injected mice (Mann Whitney U test).

Figure 2: CCL3, CCL4 and CXCL10 protein ligands are up-regulated in the ventral mesencephalon following MPTP intoxication.

ELISA assay for CCL3 (A), CCL4 (C) and CXCL10 (E) in the ventral mesencephalon of saline-injected (n=7) and MPTP-intoxicated mice 2 days (n=17) and 7 days (n=19) after MPTP exposure (4 X 23.5 mg/kg). **P* < 0.05 compared with saline injected mice (ANOVA on ranks). *Ccl3* (B), *Ccl4* (D) and *Cxcl10* (F) mRNA levels were strongly correlated with CCL3, CCL4 and CXCL10 protein levels, respectively. CCL3: R^2=0.95, Spearman Coefficient= 0,982, *P*<0.01. CCL4: R^2=0.93, Spearman Coefficient= 0,912, *P*<0.01. CXCL10: R^2=0.95, Spearman Coefficient= 0,986, *P*<0.01.

Figure 3: MPTP-induced nigrostriatal pathway injury stimulates microglial cell expression of CCL3 in the substantia nigra.

Immunofluorescent detection of CCL3 (red), $Iba1^+$ microglial cells (green) and TH^+ dopaminergic neurons (blue) in the ventral mesencephalon of saline-treated (A) or MPTP-intoxicated mice 24 hours after toxin exposure (C). (B) Higher view of yellow boxes in (A). (D) Higher view of yellow boxes in (C). CCL3 was detected in $Iba1^+$ microglial cells (arrows) after MPTP intoxication. Arrowheads point to $CCL3^{low}$ microglial cells. Bars: 100 µm (A and C); 20 µm (B and D). (E and F) Confocal microscopy analysis of CCL3, Iba1 and TH staining in the SNpc of mice treated by MPTP 24 hours after intoxication. Confocal analysis confirmed the colocalization of CCL3 with $Iba1^+$ microglial cells. Two different subcellular localization patterns of CCL3 could be observed i.e. large clustering within the microglial cell body (E) and in vesicle-like elements disseminated throughout the cell body (F). Bars: 5 µm.

Figure 4: MPTP-induced nigrostriatal pathway injury stimulates microglial cell expression of CCL4 in the substantia nigra.

Immunofluorescent detection of CCL4 (red), $Iba1^+$ microglial cells (green) and TH^+ dopaminergic neurons (blue) in the ventral mesencephalon of saline-treated (A) or MPTP-intoxicated mice 24 hours after toxin exposure (C). (B) Higher view of yellow boxes in (A). (D) Higher view of yellow boxes in (C). CCL4 was detected in $Iba1^+$ microglial cells (arrows) after MPTP intoxication. Arrowheads point to $CCL4^{low}$ microglial cells. Bars: 100 µm (A and C); 20 µm (B and D). (E and F) Confocal microscopy analysis of CCL4, Iba1 and TH staining in the SNpc of mice treated by MPTP 24 hours after intoxication. Confocal analysis confirmed the colocalization of CCL4 with $Iba1^+$ microglial cells. Two different subcellular localization patterns of CCL4 could be observed i.e. large clustering within the microglial cell body (E) and in vesicle-like elements disseminated throughout the cell body (F). Bars: 5 µm.

Figure 5: MPTP-induced nigrostriatal pathway injury stimulates astrocytic cell expression of CXCL10 in the substantia nigra.

Immunofluorescent detection of CXCL10 (red), $GFAP^+$ astrocytes (green) and TH^+ dopaminergic neurons (blue) in the ventral mesencephalon of saline-treated (A) or MPTP-intoxicated mice 24 hours after toxin exposure (C). (B) Higher view of yellow boxes in (A). (D) Higher view of yellow boxes in (C). CXCL10 was detected in $GFAP^+$ (big arrows), and $GFAP^{low}$ (small arrows) astrocytes after MPTP intoxication. Asterisks show $GFAP^-/CXCL10^+$ staining. Arrowheads point to $CXCL10^-$ astrocyte. Bars: 100 µm (A and C); 20 µm (B and D). (E and F) Confocal microscopy analysis of CXCL10, GFAP and TH staining in the SNpc of mice treated by MPTP 24 hours after intoxication. Confocal analysis confirmed the colocalization of CXCL10 with $GFAP^+$ astrocytes. Subcellular localization of CXCL10 could be observed as large clusters disseminated within the astrocytic cell body (E). Bars: 5 µm.

Figure 6: Mice deficient for *Ccr1* or *Ccr5* display little or no pathological improvement after MPTP intoxication.

(A and C) Quantification of TH^+ DNs in the SNpc at day 7 after MPTP (4 × 20 mg/kg) or saline treatment in WT, $Ccr1^{-/-}$ (A) and $Ccr5^{-/-}$ (C) animals. Bars represent the mean number of total nigral TH^+ DNs. Open symbols indicate saline-treated animals and filled symbols indicate MPTP-treated animals. Each symbol represents 1 individual animal. A modest but significant protection against MPTP-induced DN cell loss is observed in $Ccr1^{-/-}$ (A) whereas $Ccr5^{-/-}$ mice are equally susceptible to MPTP-induced TH^+ cell loss compared to their WT littermates (C). $*P < 0.05$ compared with MPTP-treated WT mice (Holm-Sidak post-hoc analysis). (B, D) Quantification of the total number of infiltrated $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in the

SNpc from MPTP-treated WT, *Ccr1*$^{-/-}$ (B) and *Ccr5*$^{-/-}$ (D) mice. **P* < 0.05 compared with MPTP-treated WT mice (Rank-Sum Test).

Figure 7: Combined inhibition of CCR1, CCR5 and CXCR3 is associated with neuroprotection against MPTP-induced DN injury.

(A) Quantification of TH^{+} DNs in the SNpc at day 7 after MPTP (4 × 23.5 mg/kg) or saline injection in WT and *Cxcr3*$^{-/-}$ mice treated with either the CCR1/CCR5 antagonist Met-RANTES or PBS. Bars represent the mean number of total nigral TH^{+} DNs. Open symbols indicate saline-treated animals and filled symbols indicate MPTP-treated animals. Each symbol represents 1 individual animal. A significant protection against MPTP induced DN cell loss is observed in *Cxcr3*$^{-/-}$ animals treated with Met-RANTES as compared to the other experimental groups. **P* < 0.05 compared with MPTP- and PBS-treated *Cxcr3*$^{-/-}$mice (Holm-Sidak post-hoc analysis). (B) Representative photomicrographs of mesencephalic sections immunostained for TH from saline- or MPTP-treated WT and Cxcr3 deficient mice. Scale bar: 100 µm.

Figure 8: *Ccl3* and *Ccl4* mRNA expression is up-regulated in the SN of PD patients.

Quantitative PCR analysis of *Ccl3*, *Ccl4* and *Cxcl10* mRNA expression levels in the SN of control subjects (n=20) and PD patients (n=24). The relative expression of chemokine genes is normalized against the expression level of both *Top1* and *Sf3a1* reference genes. Data represent the mean **±** SEM. **P* < 0.05 compared with controls (Mann-Whitney U test).

FIGURE 1:

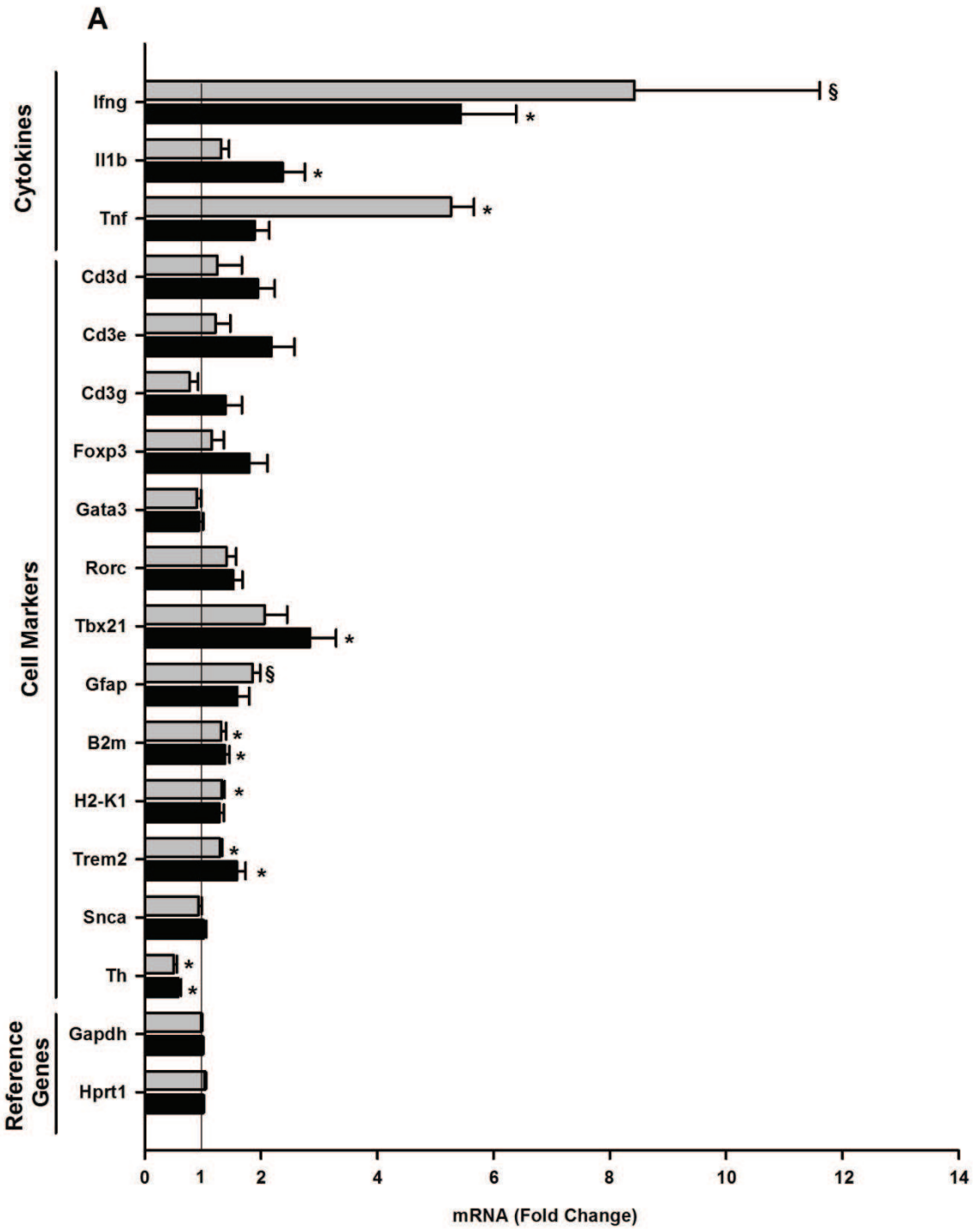

A
Cytokines
Cell Markers
Reference Genes
Ifng
Il1b
Tnf
Cd3d
Cd3e
Cd3g
Foxp3
Gata3
Rorc
Tbx21
Gfap
B2m
H2-K1
Trem2
Snca
Th
Gapdh
Hprt1
§
*
0
1
2
4
6
8
10
12
14
mRNA (Fold Change)

FIGURE 1:

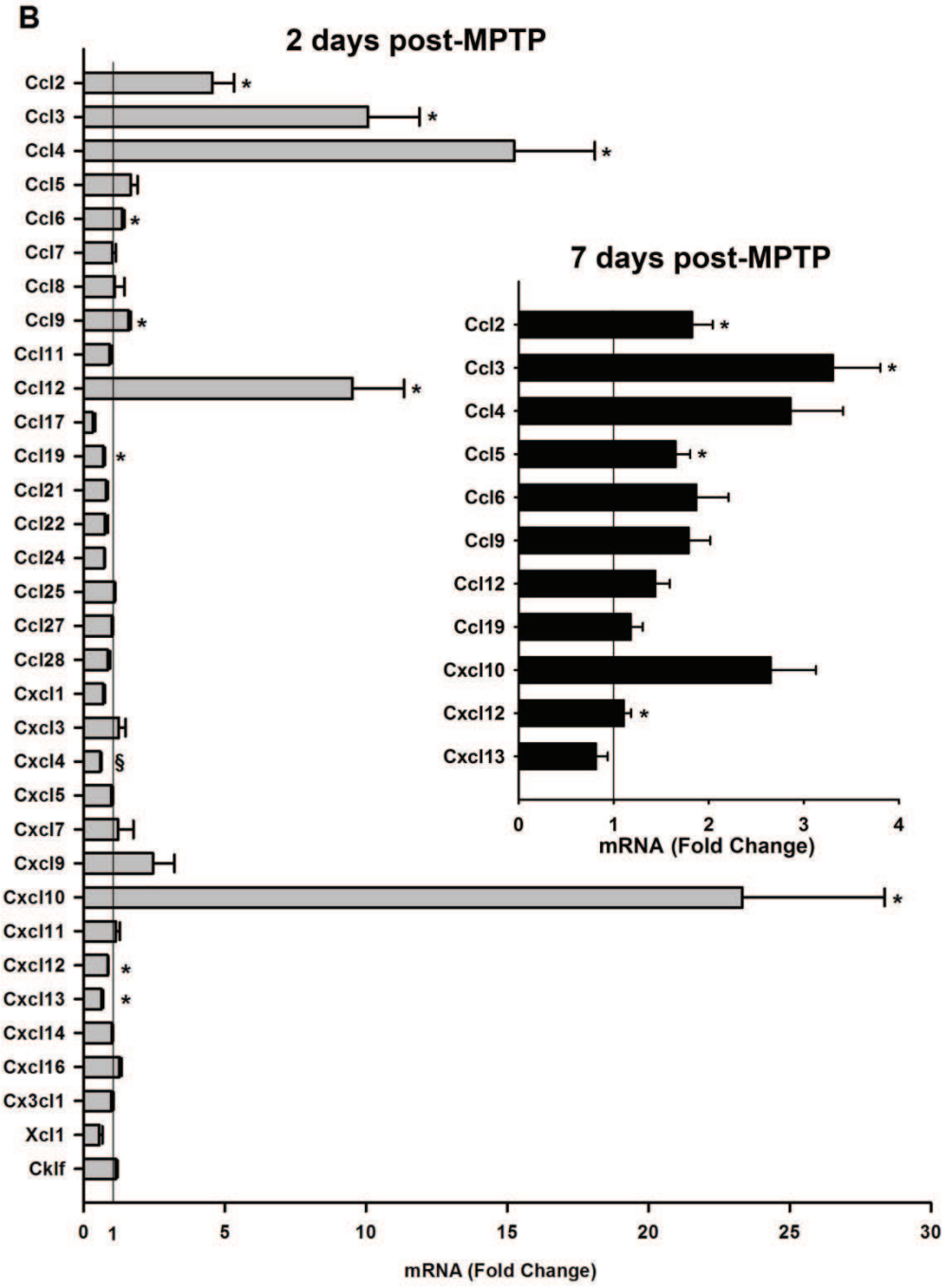

B
2 days post-MPTP
Ccl2
Ccl3
Ccl4
Ccl5
Ccl6
Ccl7
Ccl8
Ccl9
Ccl11
Ccl12
Ccl17
Ccl19
Ccl21
Ccl22
Ccl24
Ccl25
Ccl27
Ccl28
Cxcl1
Cxcl3
Cxcl4
Cxcl5
Cxcl7
Cxcl9
Cxcl10
Cxcl11
Cxcl12
Cxcl13
Cxcl14
Cxcl16
Cx3cl1
Xcl1
Cklf
0 1 5 10 15 20 25 30
mRNA (Fold Change)
7 days post-MPTP
Ccl2
Ccl3
Ccl4
Ccl5
Ccl6
Ccl9
Ccl12
Ccl19
Cxcl10
Cxcl12
Cxcl13
0 1 2 3 4
mRNA (Fold Change)

FIGURE 2:

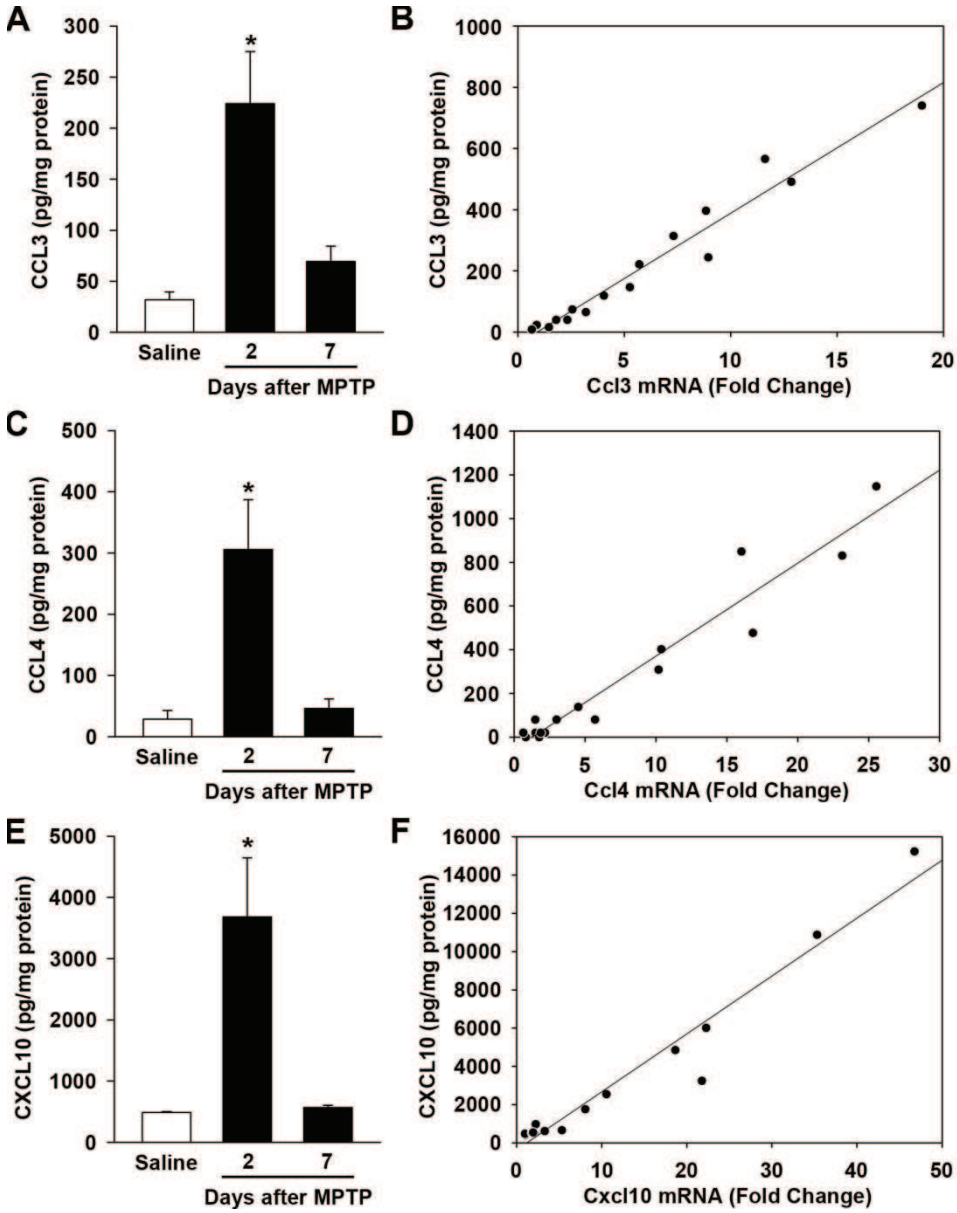

A
CCL3 (pg/mg protein)
300
250
200
150
100
50
0
*
Saline
2
7
Days after MPTP
B
CCL3 (pg/mg protein)
1000
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
Ccl3 mRNA (Fold Change)
C
CCL4 (pg/mg protein)
500
400
300
200
100
0
*
Saline
2
7
Days after MPTP
D
CCL4 (pg/mg protein)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
30
Ccl4 mRNA (Fold Change)
E
CXCL10 (pg/mg protein)
5000
4000
3000
2000
1000
0
*
Saline
2
7
Days after MPTP
F
CXCL10 (pg/mg protein)
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
10
20
30
40
50
Cxcl10 mRNA (Fold Change)

FIGURE 3:

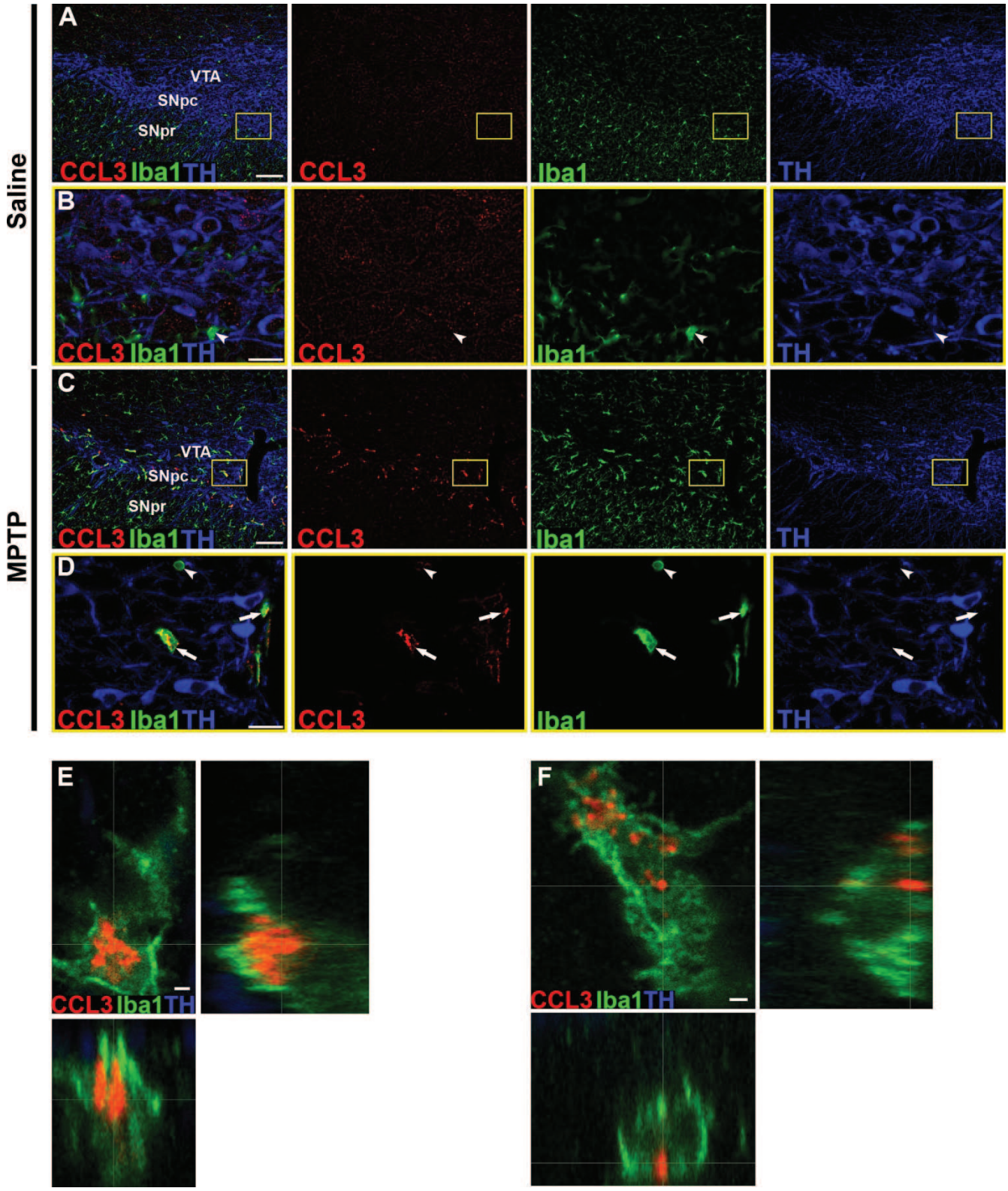


FIGURE 4:

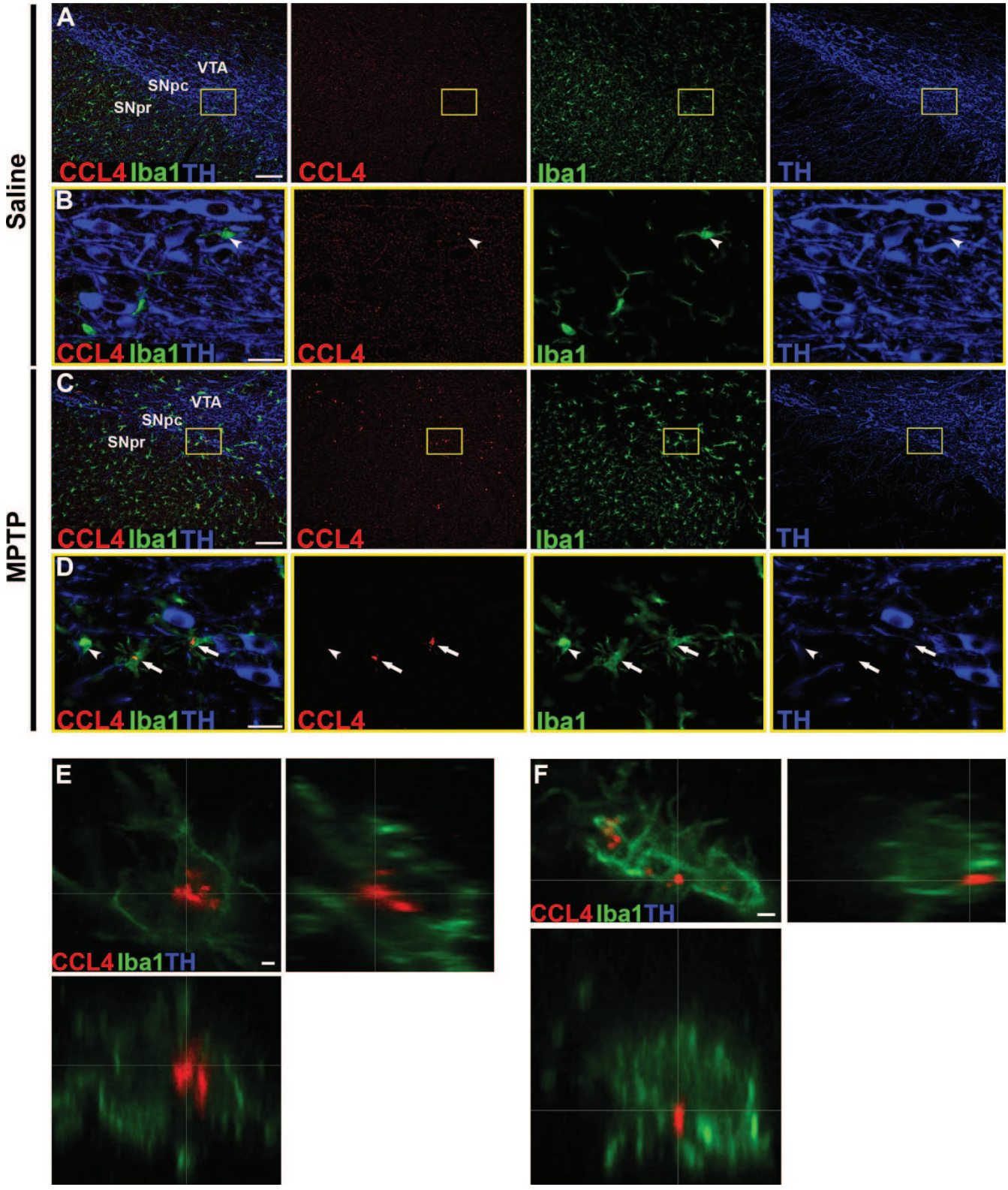


FIGURE 5:

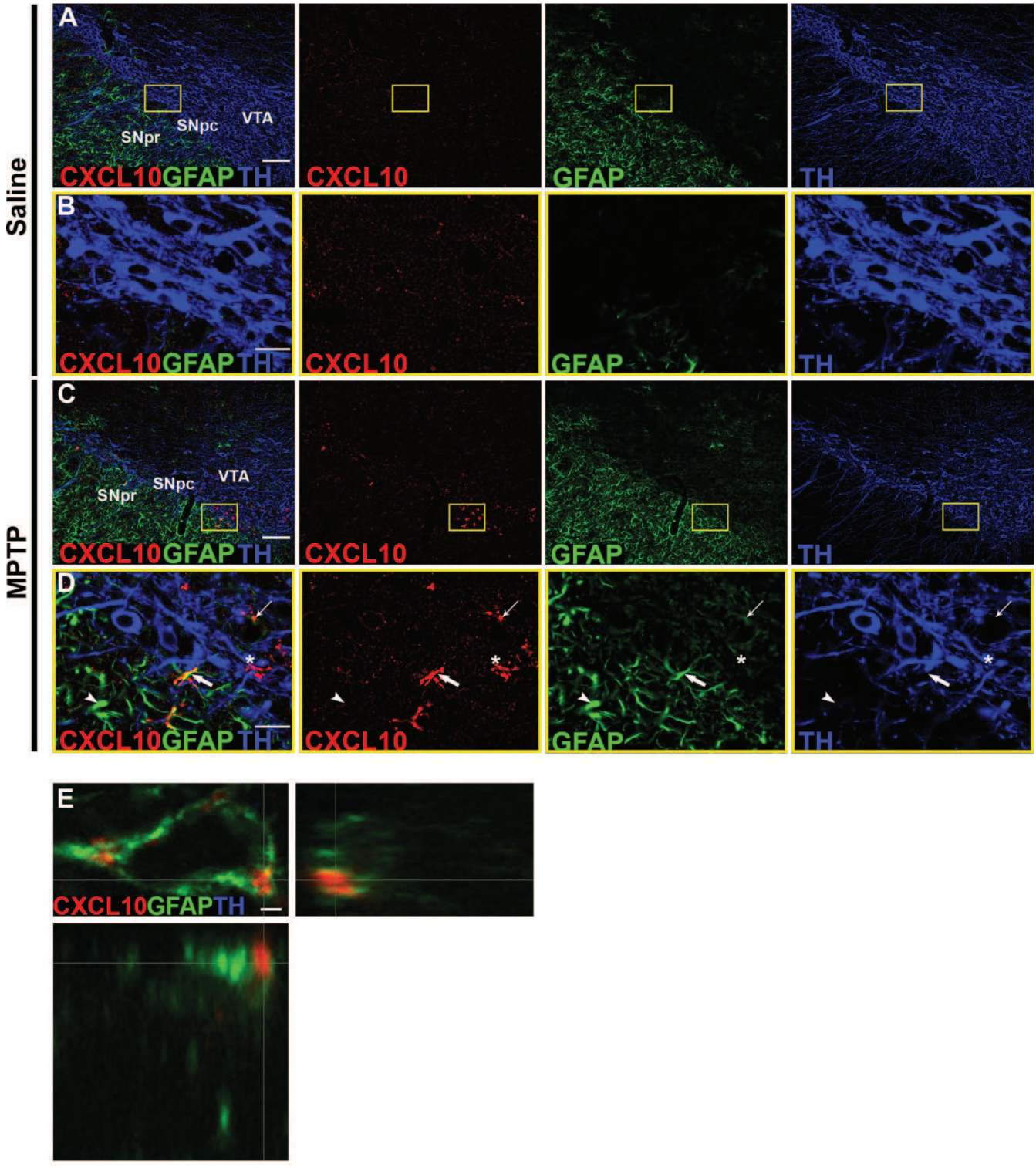

Saline
MPTP
A
SNpr
SNpc
VTA
CXCL10GFAP TH
CXCL10
GFAP
TH
B
C
D
E

FIGURE 6:

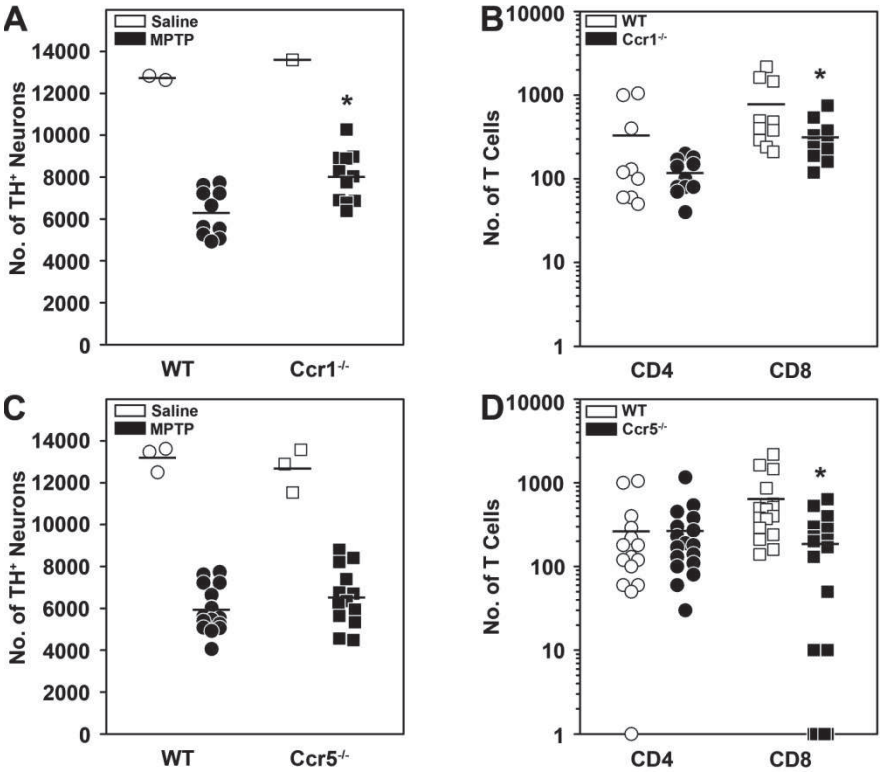

A
Saline
MPTP
No. of TH+ Neurons
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
WT
Ccr1-/-
*
B
WT
Ccr1-/-
No. of T Cells
10000
1000
100
10
1
CD4
CD8
*
C
Saline
MPTP
No. of TH+ Neurons
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
WT
Ccr5-/-
D
WT
Ccr5-/-
No. of T Cells
10000
1000
100
10
1
CD4
CD8
*

FIGURE 7:

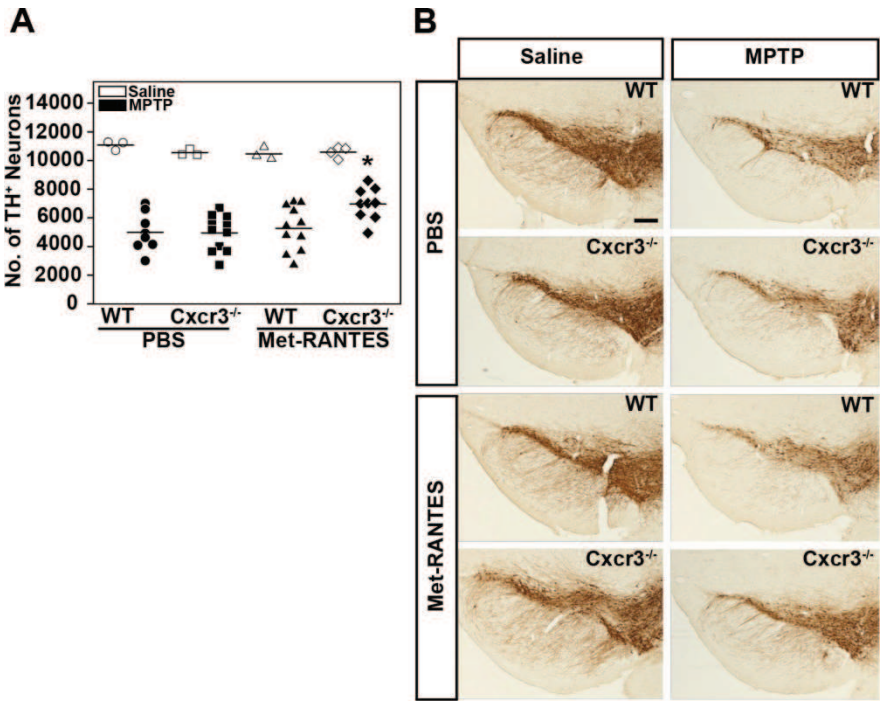
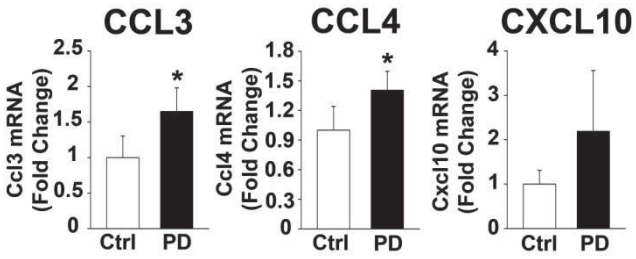

A
B
Saline
MPTP
No. of TH+ Neurons
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
WT
Cxcr3-/-
WT
Cxcr3-/-
PBS
Met-RANTES
*
Saline
MPTP
PBS
Met-RANTES
WT
Cxcr3-/-

FIGURE 8:


CCL3
Ccl3 mRNA (Fold Change)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
Ctrl
PD
CCL4
Ccl4 mRNA (Fold Change)
1.8
1.5
1.2
0.9
0.6
0.3
0
*
Ctrl
PD
CXCL10
Cxcl10 mRNA (Fold Change)
4
3
2
1
0
Ctrl
PD

Supplemental Material

FIGURE S1:

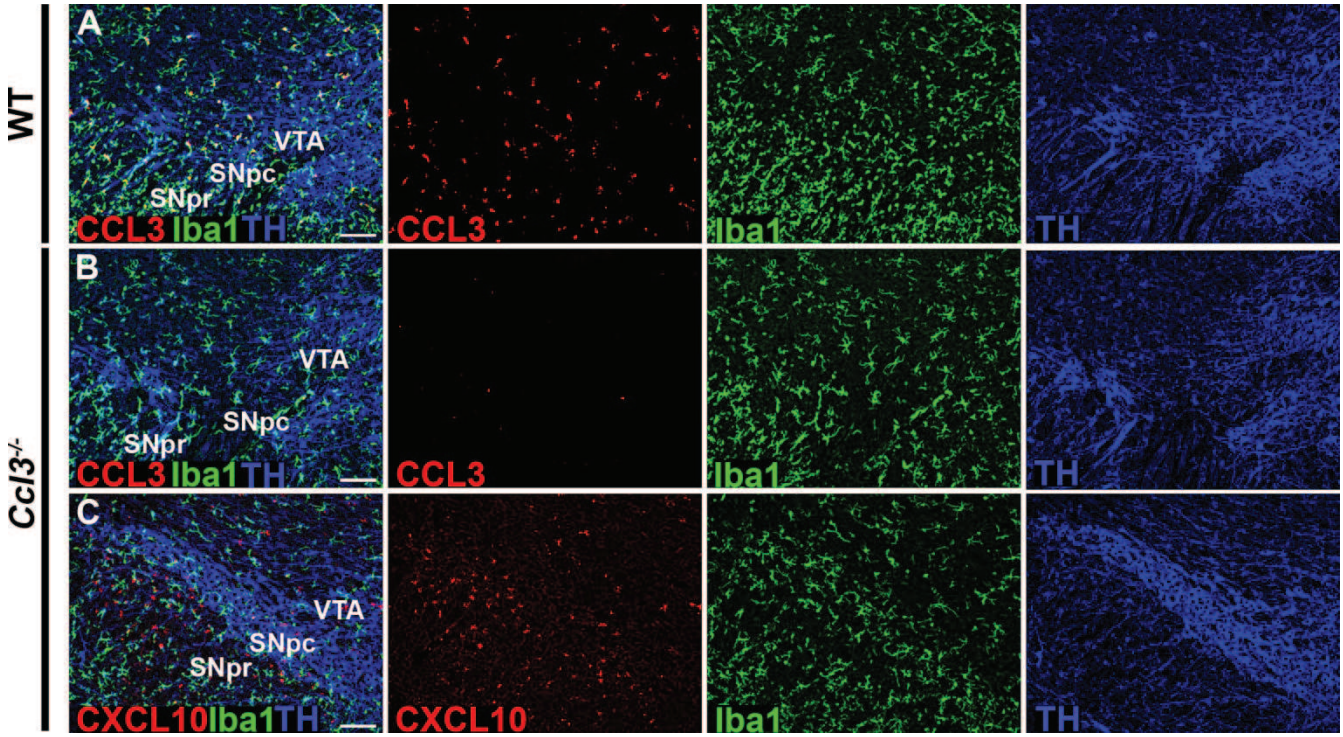


Figure S1: LPS-induced CCL3 expression in the SN is abolished in *Ccl3*$^{-/-}$ mice. Immunofluorescent detection of CCL3 and CXCL10 (red), Iba1^{+} microglial cells (green) and TH^{+} dopaminergic neurons (blue) in the ventral mesencephalon of LPS-treated WT (A) or *Ccl3*$^{-/-}$ (B and C) mice 24 hours after LPS exposure. CCL3 staining was detected in WT mice but almost abolished in *Ccl3*$^{-/-}$ animals after LPS treatment. CXCL10 staining remained in *Ccl3*$^{-/-}$ mice Bars: 100 µm.

FIGURE S2:

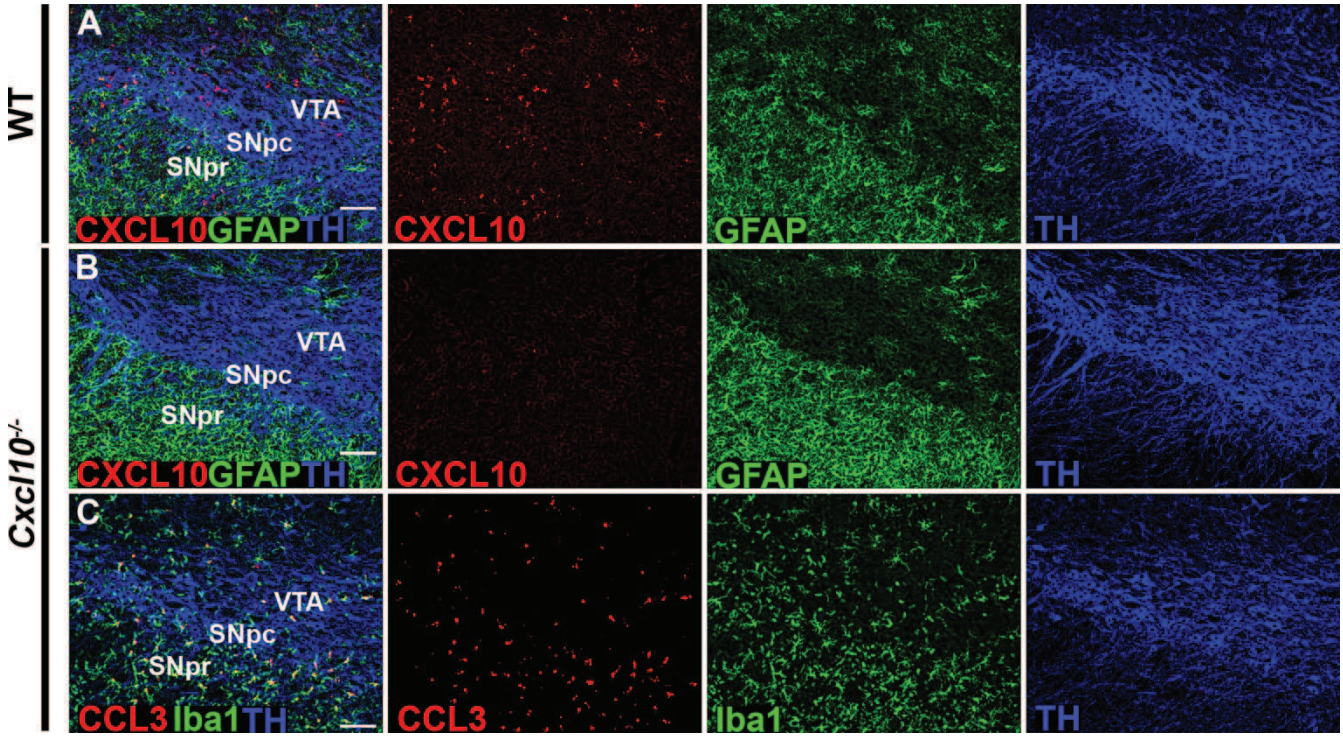


Figure S2: LPS-induced CXCL10 expression in the SN is abolished in *Cxcl10*$^{-/-}$ mice. Immunofluorescent detection of CXCL10 and CCL3 (red), Iba1^{+} microglial cells (green) and TH^{+} dopaminergic neurons (blue) in the ventral mesencephalon of LPS-treated WT (A) or *Cxcl10*$^{-/-}$ (B and C) mice 24 hours after LPS exposure. CXCL10 staining was detected in WT mice but almost abolished in *Cxcl10*$^{-/-}$ animals after LPS treatment. CCL3 staining remained in *CXCL10*$^{-/-}$ mice Bars: 100 µm.

FIGURE S3:

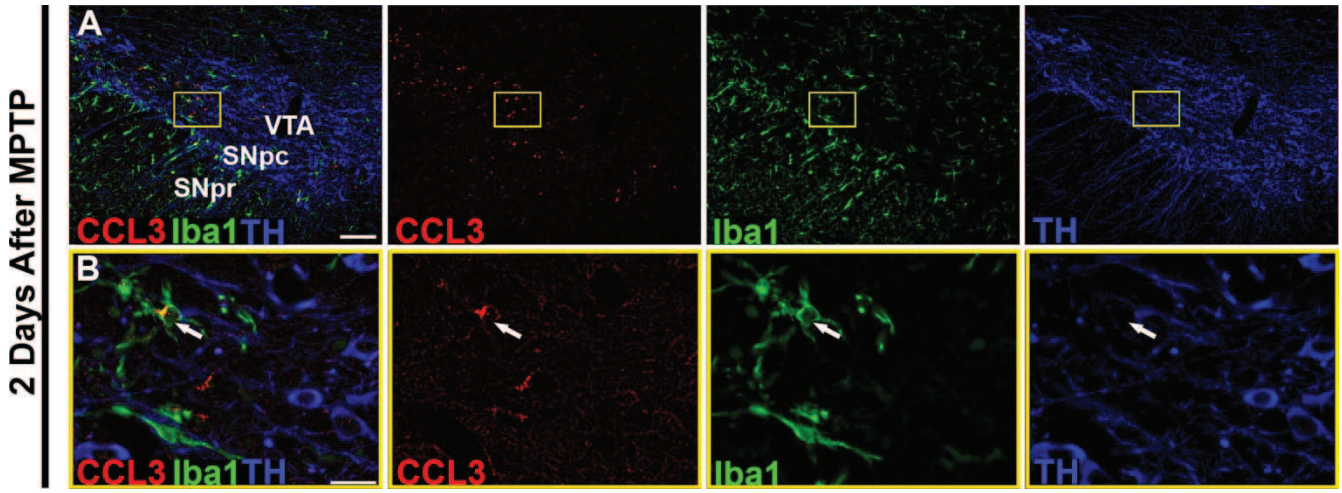


Figure S3: MPTP-induced nigrostriatal pathway injury stimulates microglial cell expression of CCL3 in the substantia nigra. Immunofluorescent detection of CCL3 (red), Iba1^{+} microglial cells (green) and TH^{+} dopaminergic neurons (blue) in the ventral mesencephalon of MPTP-intoxicated mice 48 hours after toxin exposure (A). (B) Higher view of yellow boxes in (A). CCL3 was detected in Iba1^{+} microglial cells (arrows) after MPTP intoxication. Bars: 100 µm (A); 20 µm (B).

FIGURE S4:

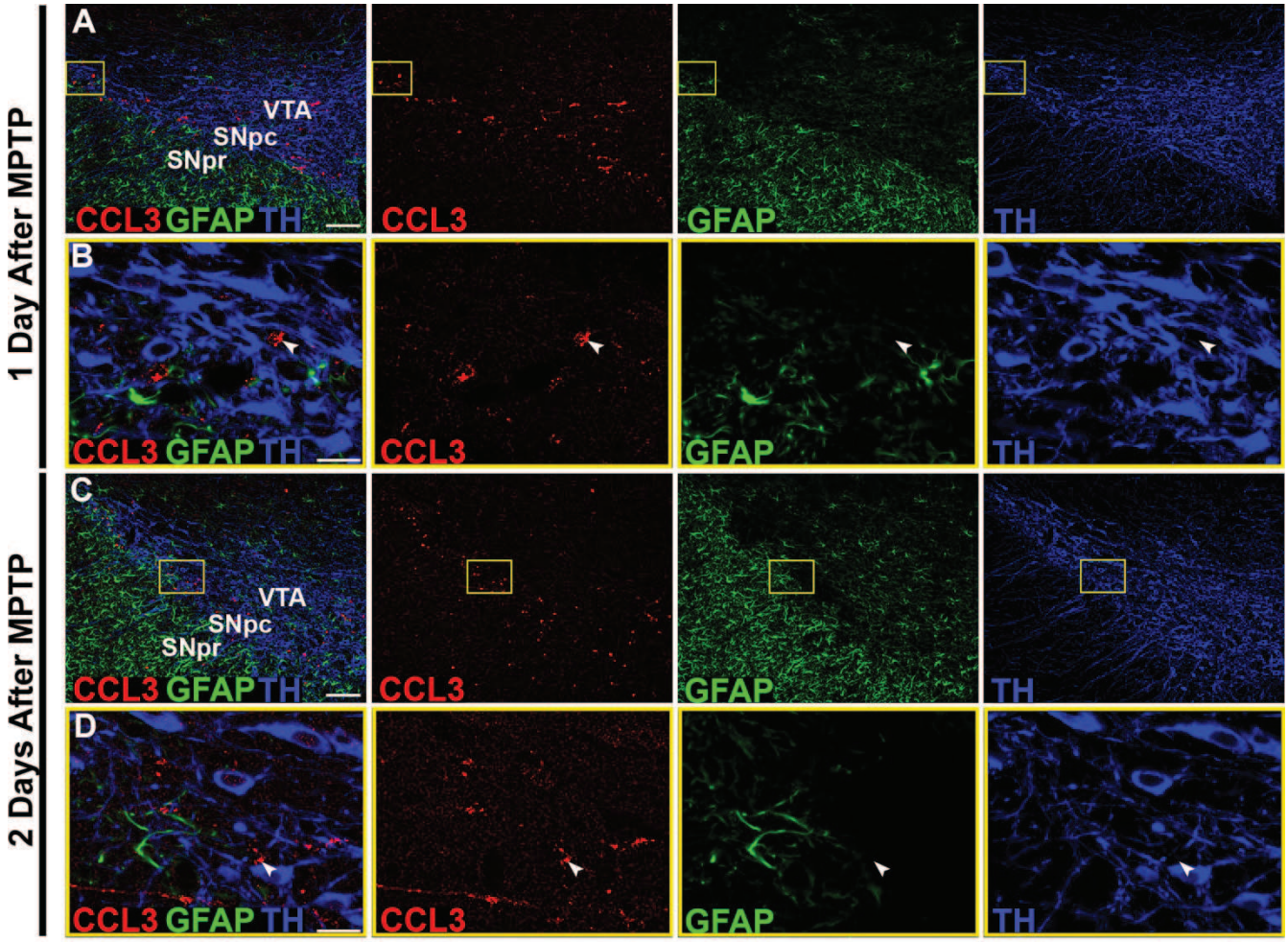


Figure S4: MPTP-induced nigral CCL3 expression is not localized in GFAP$^+$ cells. Immunofluorescent detection of CCL3 (red), GFAP$^+$ astrocytes (green) and TH$^+$ dopaminergic neurons (blue) in the ventral mesencephalon of MPTP-intoxicated mice 24 (A and B) or 48 hours after toxin exposure (C and D). (B) Higher view of yellow boxes in (A). (D) Higher view of yellow boxes in (C). CCL3 was not detected in GFAP$^+$ astrocytes (arrowheads) after MPTP intoxication. Bars: 100 µm (A and C); 20 µm (B and D).

FIGURE S5:

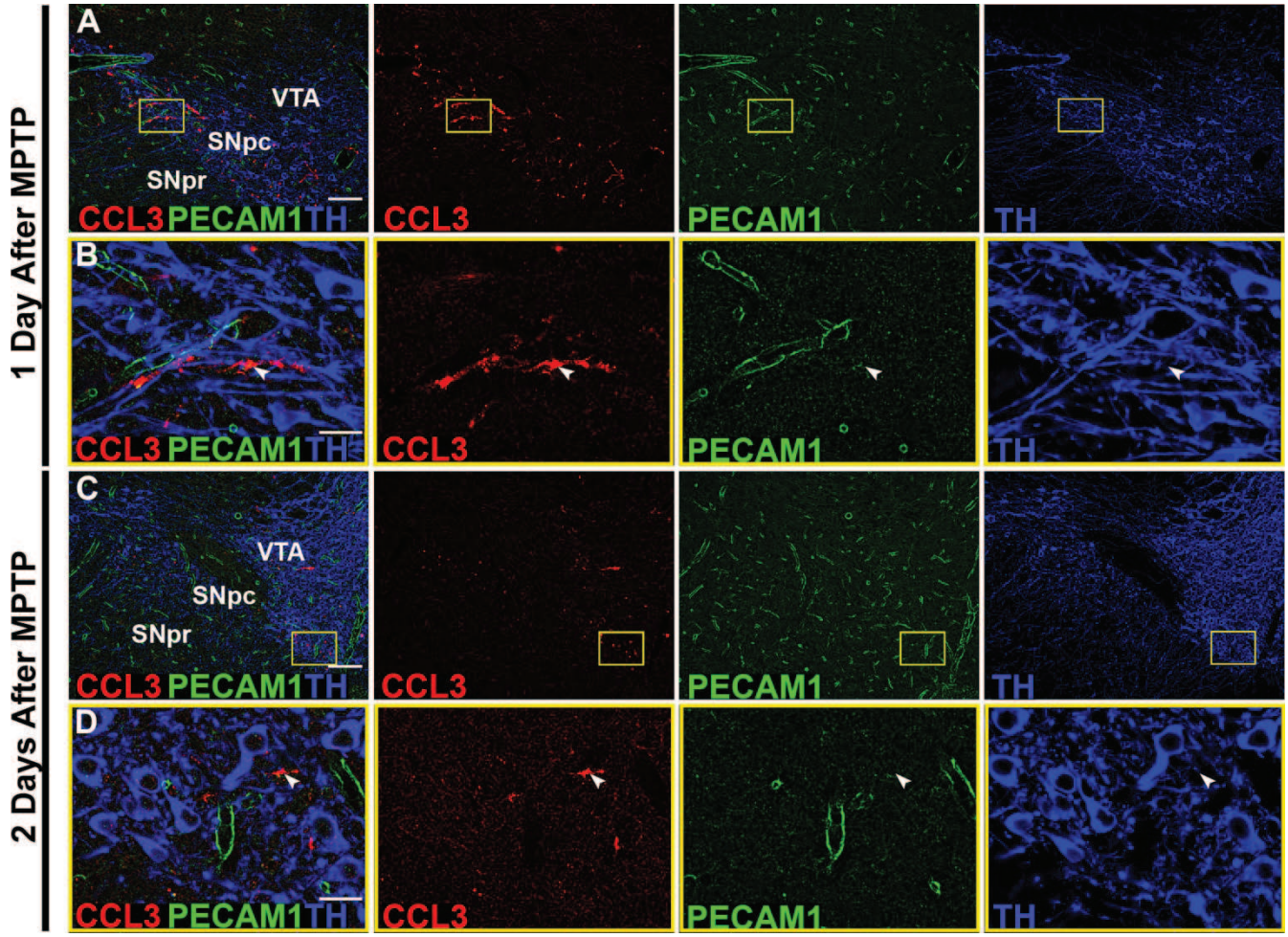


Figure S5: MPTP-induced nigral CCL3 expression is not localized in PECAM1$^+$ cells. Immunofluorescent detection of CCL3 (red), PECAM1$^+$ endothelial cells (green) and TH$^+$ dopaminergic neurons (blue) in the ventral mesencephalon of MPTP-intoxicated mice 24 (A and B) or 48 hours after toxin exposure (C and D). (B) Higher view of yellow boxes in (A). (D) Higher view of yellow boxes in (C). CCL3 was not detected in PECAM1$^+$ endothelial cells (arrowheads) after MPTP intoxication. Bars: 100 µm (A and C); 20 µm (B and D).

FIGURE S6:

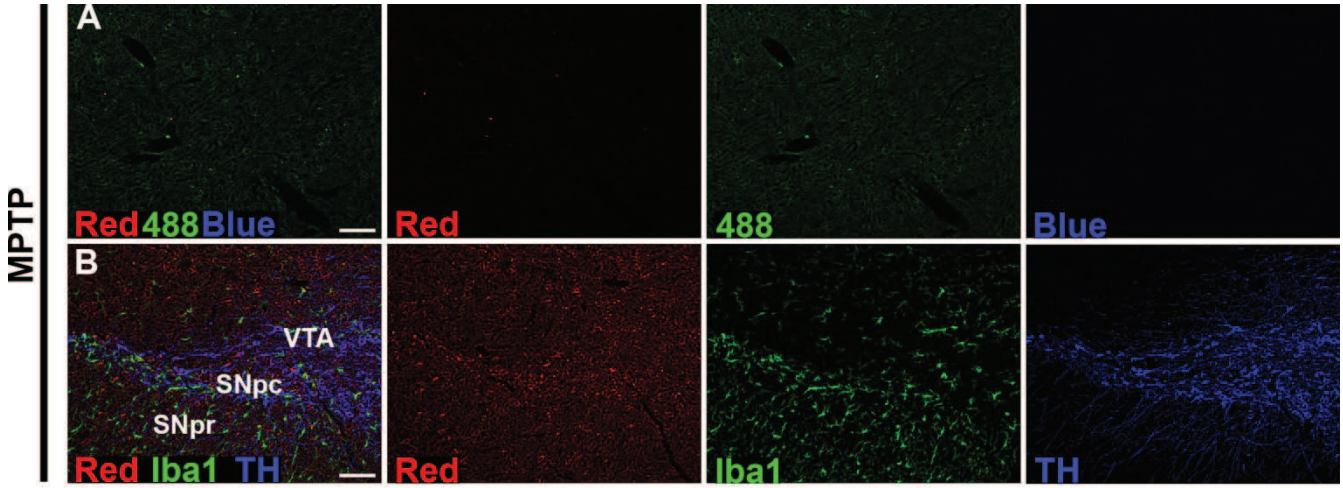


Figure S6: MPTP-induced nigral CCL3 staining is absent in omit and reduced in antigene absorption controls. Slices were incubated with primary antibody raised against CCL3 and secondary antibody directed against the primary anti-Iba1 antibody (A). CCL3 was not detected after MPTP intoxication. Primary antibody directed against CCL3 was pre-incubated with recombinant CCL3 protein before staining (B). MPTP-induced nigral CCL3 staining is markedly reduced. Bars: 100 µm (A and B).

FIGURE S7:

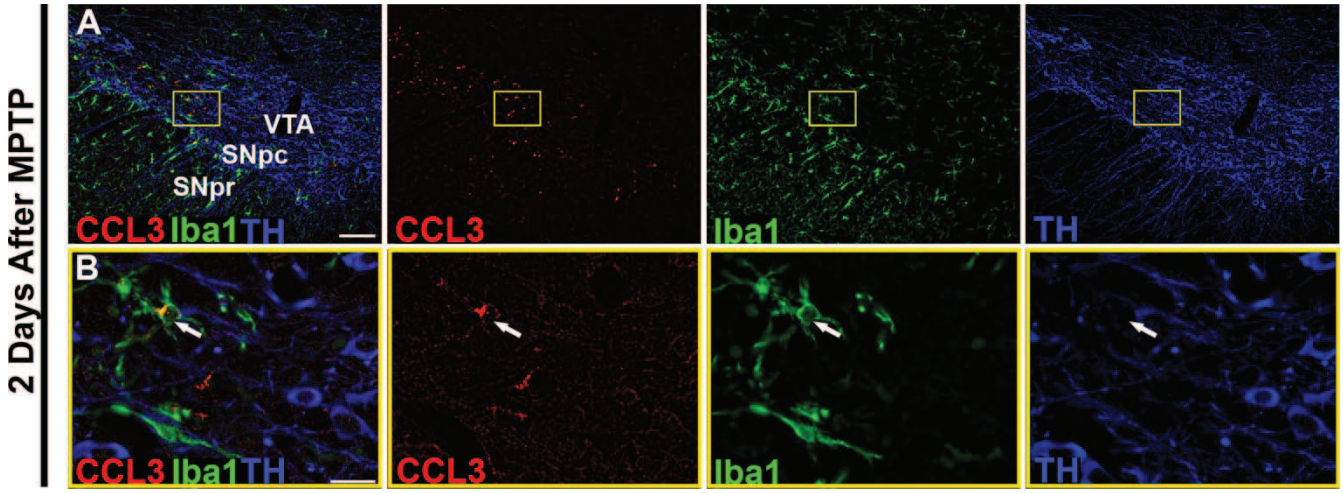


Figure S7: MPTP-induced nigrostriatal pathway injury stimulates microglial cell expression of CCL4 in the substantia nigra. Immunofluorescent detection of CCL4 (red), Iba1^{+} microglial cells (green) and TH^{+} dopaminergic neurons (blue) in the ventral mesencephalon of MPTP-intoxicated mice 48 hours after toxin exposure (A). (B) Higher view of yellow boxes in (A). CCL4 was detected in Iba1^{+} microglial cells (arrows) after MPTP intoxication. Bars: 100 µm (A); 20 µm (B).

FIGURE S8:

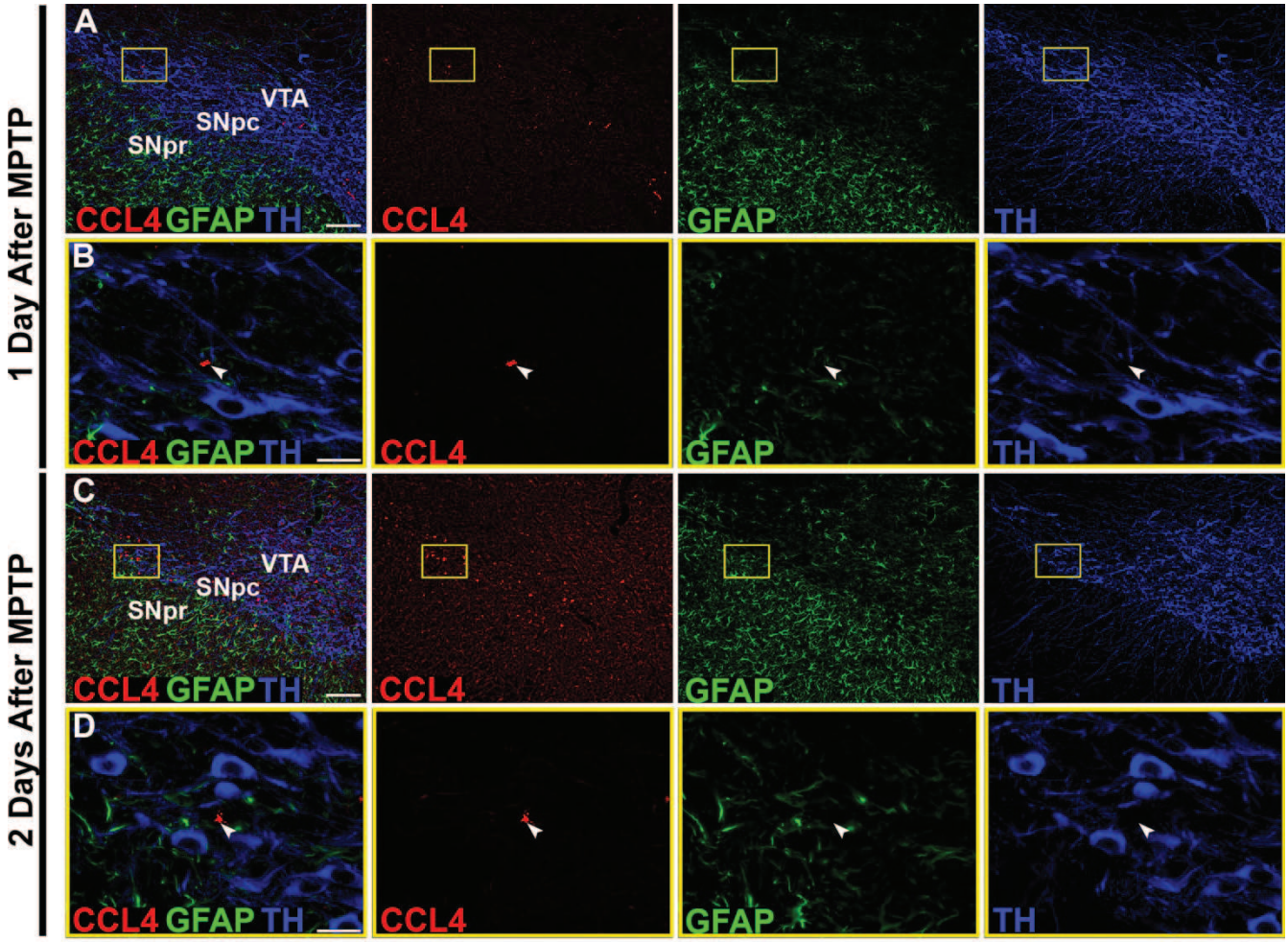


Figure S8: MPTP-induced nigral CCL4 expression is not localized in GFAP$^+$ cells. Immunofluorescent detection of CCL4 (red), GFAP$^+$ astrocytes (green) and TH$^+$ dopaminergic neurons (blue) in the ventral mesencephalon of MPTP-intoxicated mice 24 (A and B) or 48 hours after toxin exposure (C and D). (B) Higher view of yellow boxes in (A). (D) Higher view of yellow boxes in (C). CCL4 was not detected in GFAP$^+$ astrocytes (arrowheads) after MPTP intoxication. Bars: 100 µm (A and C); 20 µm (B and D).

FIGURE S9:

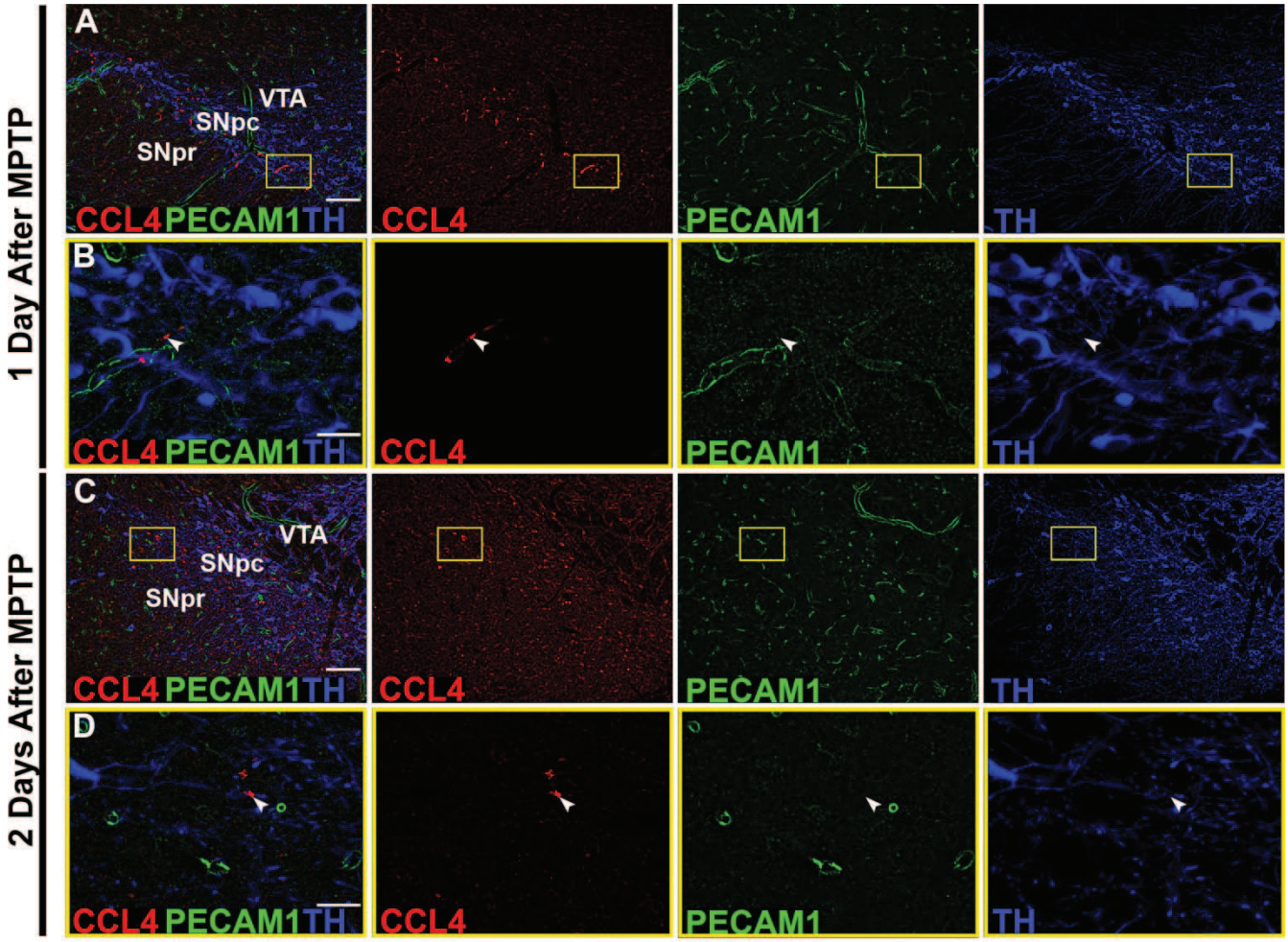


Figure S9: MPTP-induced nigral CCL4 expression is not localized in PECAM1$^+$ cells. Immunofluorescent detection of CCL4 (red), PECAM1$^+$ endothelial cells (green) and TH$^+$ dopaminergic neurons (blue) in the ventral mesencephalon of MPTP-intoxicated mice 24 (A and B) or 48 hours after toxin exposure (C and D). (B) Higher view of yellow boxes in (A). (D) Higher view of yellow boxes in (C). CCL4 was not detected in PECAM1$^+$ endothelial cells (arrowheads) after MPTP intoxication. Bars: 100 µm (A and C); 20 µm (B and D).

FIGURE S10:

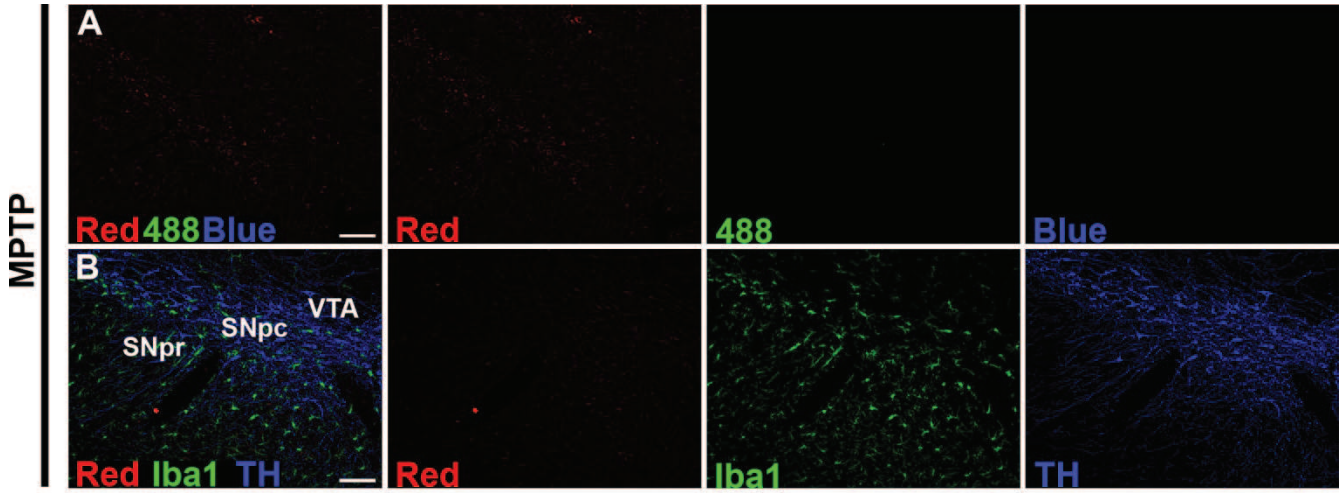


Figure S10: MPTP-induced nigral CCL4 staining is absent in omit and reduced in antigene absorption controls. Slices were incubated with primary antibody raised against CCL4 and secondary antibody directed against the primary anti-Iba1 antibody (A). CCL4 was not detected after MPTP intoxication. Primary antibody directed against CCL4 was pre-incubated with recombinant CCL4 protein before staining (B). MPTP-induced nigral CCL4 staining is markedly reduced. Bars: 100 µm (A and B).

FIGURE S11:

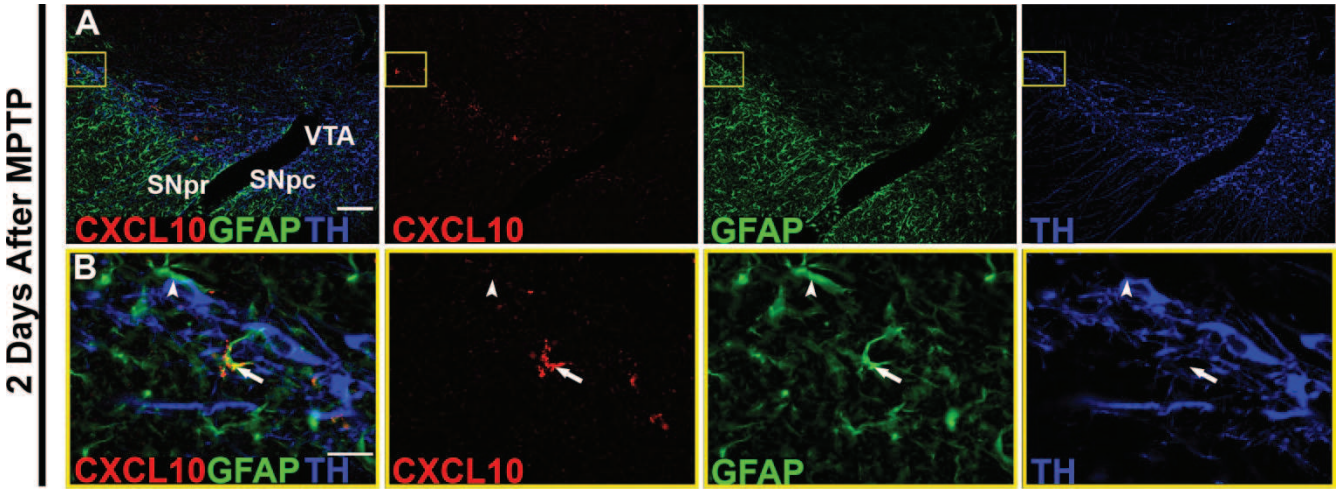


Figure S11: MPTP-induced nigrostriatal pathway injury stimulates astrocytic expression of CXCL10 in the substantia nigra. Immunofluorescent detection of CXCL10 (red), $GFAP^+$ astrocytes (green) and TH^+ dopaminergic neurons (blue) in the ventral mesencephalon of MPTP-intoxicated mice 48 hours after toxin exposure (A). (B) Higher view of yellow boxes in (A). CXCL10 was detected in $GFAP^+$ astrocytes (arrows) after MPTP intoxication. Arrowheads point to $CXCL10^-$ astrocyte. Bars: 100 µm (A); 20 µm (B).

FIGURE S12:

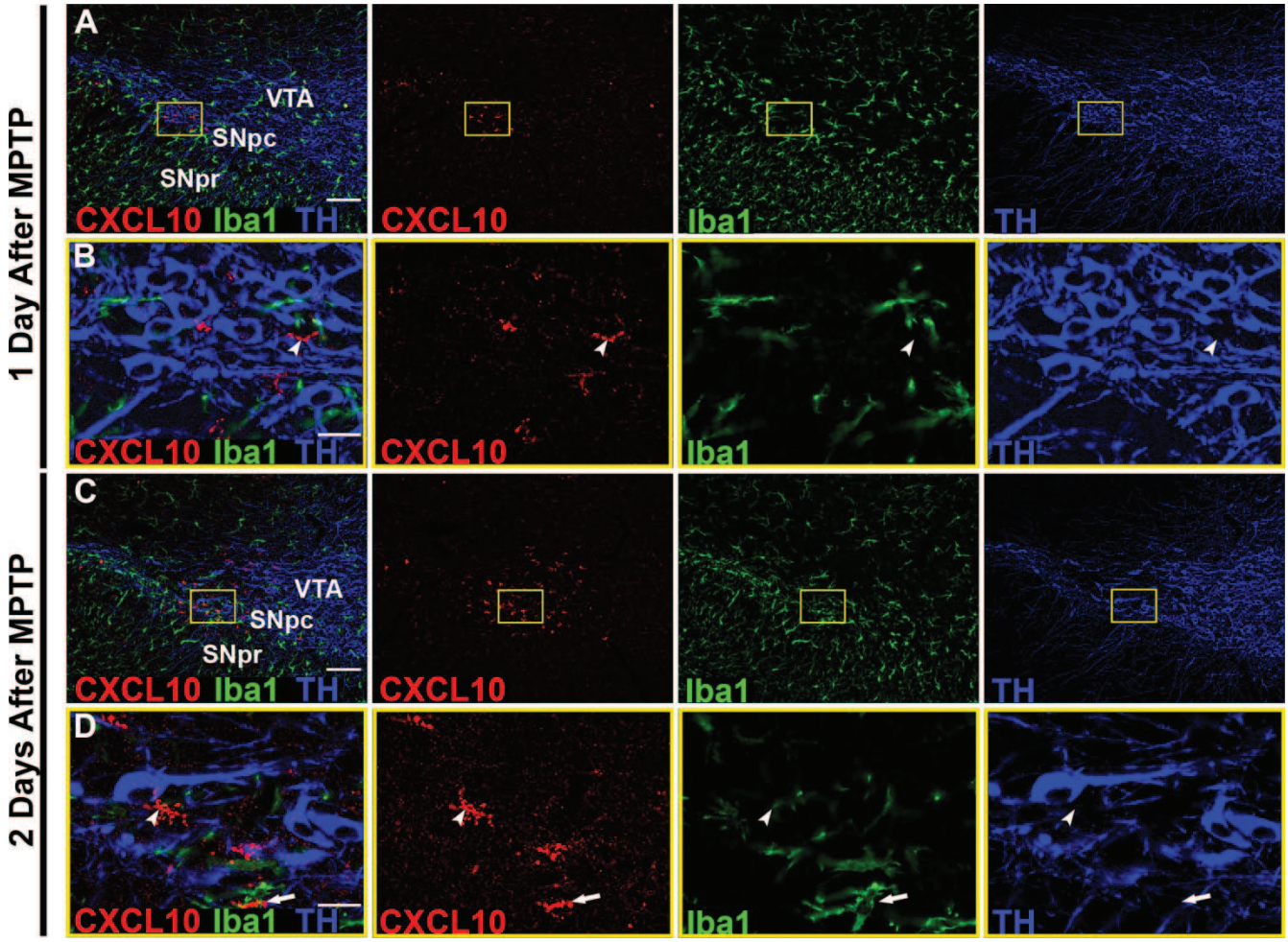


Figure S12: MPTP-induced nigral CXCL10 expression is not localized in Iba1$^+$ cells. Immunofluorescent detection of CXCL10 (red), Iba1$^+$ microglial cells (green) and TH$^+$ dopaminergic neurons (blue) in the ventral mesencephalon of MPTP-intoxicated mice 24 (A and B) or 48 hours after toxin exposure (C and D). (B) Higher view of yellow boxes in (A). (D) Higher view of yellow boxes in (C). CXCL10 was not detected in Iba1$^+$ microglial cells (arrowheads) after MPTP intoxication. Bars: 100 µm (A and C); 20 µm (B and D).

FIGURE S13:

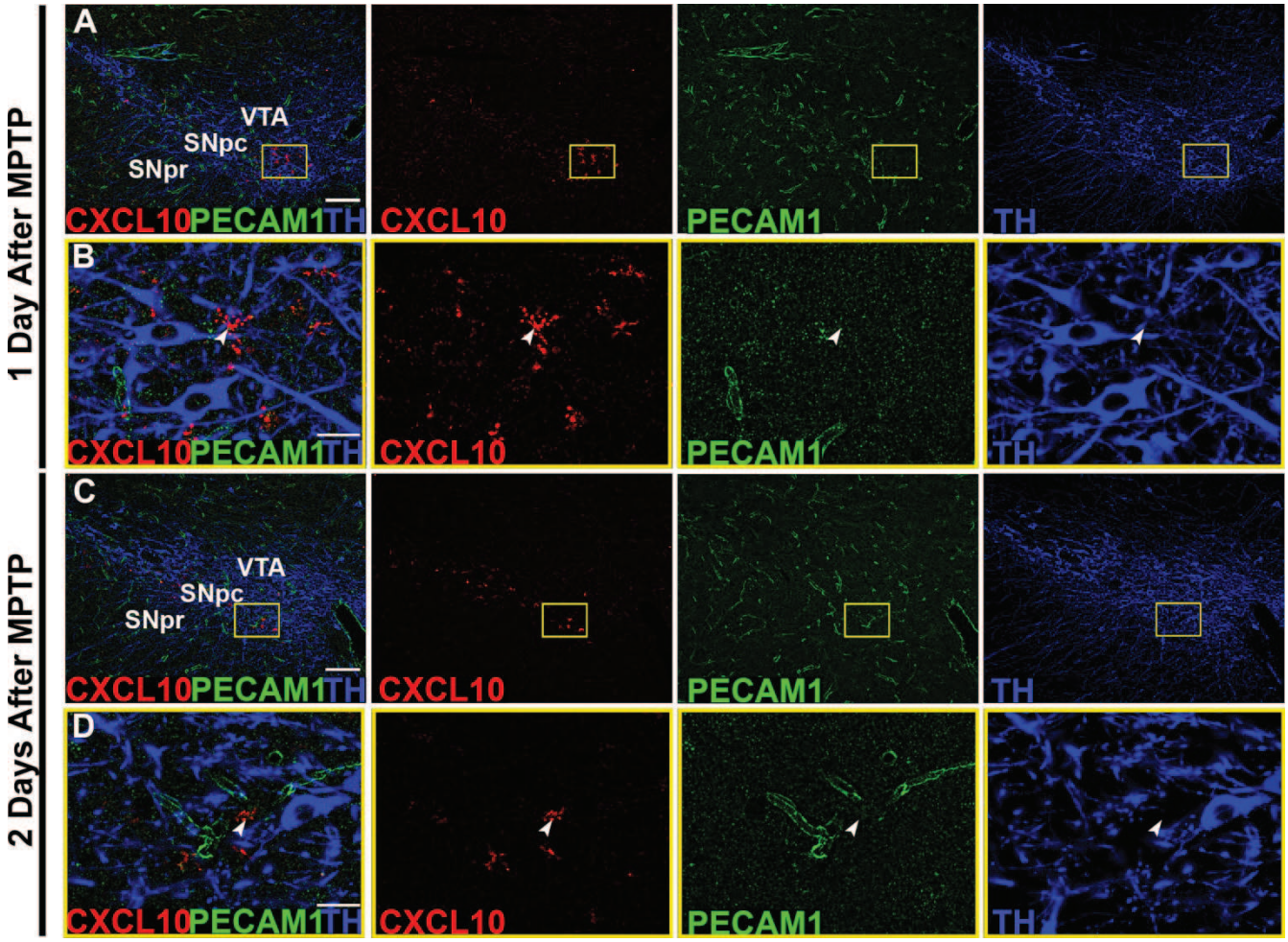


Figure S9: MPTP-induced nigral CXCL10 expression is not localized in PECAM1$^+$ cells.

Immunofluorescent detection of CXCL10 (red), PECAM1$^+$ endothelial cells (green) and TH$^+$ dopaminergic neurons (blue) in the ventral mesencephalon of MPTP-intoxicated mice 24 (A and B) or 48 hours after toxin exposure (C and D). (B) Higher view of yellow boxes in (A). (D) Higher view of yellow boxes in (C). CXCL10 was not detected in PECAM1$^+$ endothelial cells (arrowheads) after MPTP intoxication. Bars: 100 µm (A and C); 20 µm (B and D).

FIGURE S14:

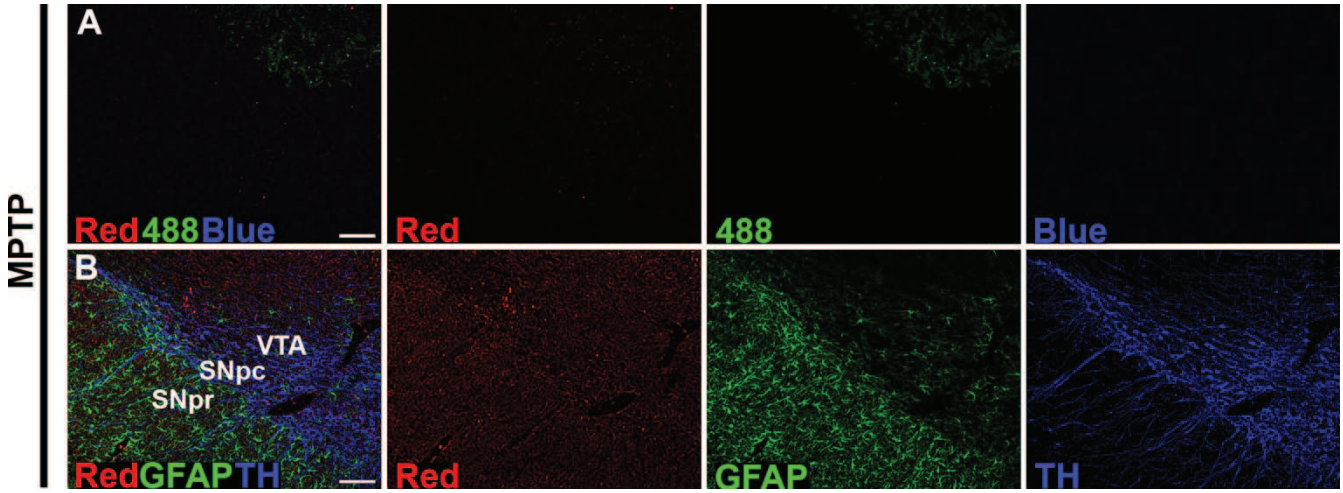


Figure S10: MPTP-induced nigral CXCL10 staining is absent in omit and reduced in antigene absorption controls. Slices were incubated with primary antibody raised against CXCL10 and secondary antibody directed against the primary anti-Iba1 antibody (A). CXCL10 was not detected after MPTP intoxication. Primary antibody directed against CXCL10 was pre-incubated with recombinant CXCL10 protein before staining (B). MPTP-induced nigral CXCL10 staining is markedly reduced. Bars: 100 µm (A and B).

Supplementary Table 1

Patients characteristics

Diagnostic	*Post-mortem* interval (h)	Âge at death (years)	Gender	Immediate cause of death
Control	19	90	W	Gastrointestinal haemorrhage
Control	8.5	82	W	-
Control	25	76	W	Pulmonary embolism
Control	7	85	W	Pleurisy, lung cancer.
Control	7	86	W	Myeloma
Control	6	98	W	Occluded artery
Control	6.5	75	W	Pulmonary infection
Control	27	81	W	Cancer
Control	7.5	66	W	Pulmonary embolism
Control	10	73	M	-
Control	-	86	W	Sepcis
Control	31	70	M	-
Control*	28	60	W	-
Control	-	-	-	-
Control	-	-	-	-
Control	22.5	88	M	-
Control	-	-	-	-
Control	-	-	-	-
Control	-	-	-	-
Control	-	-	-	-

Diagnostic	*Post-mortem* interval (h)	Âge at death (years)	Gender	Immediate cause of death
Parkinsonian	20	71	M	Pneumonia
Parkinsonian	-	68	M	Peritonitis
Parkinsonian	9.5	73	M	-
Parkinsonian	24	71	M	-
Parkinsonian	18	72	W	-
Parkinsonian	19.5	84	W	Pulmonary infection
Parkinsonian	10	65	M	Sepcis
Parkinsonian	34	82	M	Sepcis, pneumonia, gastrointestinal haemorrhage
Parkinsonian	24	74	M	Pulmonary infection, cardio-vascular collapsus
Parkinsonian	48	62	W	Pulmonary infection
Parkinsonian	40	76	M	-
Parkinsonian	54.5	78	W	-
Parkinsonian	22.5	73	M	Pancreas cancer, liver metastasis
Parkinsonian	26	82	M	-
Parkinsonian	28	83	M	-
Parkinsonian	24	79	M	-
Parkinsonian	44	67	M	-
Parkinsonian	40	84	W	-
Parkinsonian	15.5	78	W	-
Parkinsonian	12.8	62	W	-
Parkinsonian	-	76	-	-
Parkinsonian	10.5	-	M	-
Parkinsonian	-	76	M	-
Parkinsonian	-	79	W	-

* Alzheimer Lesions Braak Stage III. Potential Alzheimer disease.

I. Mécanismes non autonomes et maladie de Parkinson

La vision classique de la mort cellulaire dans les maladies neurodégénératives repose sur l'idée qu'une population neuronale spécifique est particulièrement sensible à un stress toxique ou subtoxique mais chronique. Les dommages cellulaires, associés au vieillissement physiologique, perturbent les mécanismes de défense neuronaux, entraînant leur dégénérescence. Pendant longtemps, l'idée prévalait que ces mécanismes cellulaires étaient autonomes, c'est-à-dire indépendants des cellules environnantes interagissant potentiellement avec les neurones souffrant. Cependant, de nombreuses études supportent dorénavant l'idée que les mécanismes non autonomes de la neurodégénérescence jouent probablement un rôle important dans différentes maladies neurodégénératives telles que la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Huntington ou la maladie de Parkinson. Ainsi, les cellules microgliales, les astrocytes et les oligodendrocytes ont été impliqués dans plusieurs pathologies du SNC (Glass et coll., 2010). Par ailleurs, le rôle de la réponse immunitaire adaptative dans les mécanismes de mort neuronale d'abord largement étudié dans la sclérose en plaque, constitue un nouvel axe de recherche notamment dans la maladie de Parkinson et la sclérose latérale amyotrophique (Glass et coll., 2010).

1. Réponses immunitaires innées et adaptatives dans la maladie de Parkinson

Le rôle de l'immunité innée dans la dégénérescence dopaminergique est supporté par de nombreuses études chez l'homme et l'animal. Les études *post-mortem* chez l'homme ont ainsi montré la présence de cellules microgliales activées (McGeer et coll., 1988 ; Banati et coll., 1998 ; Imamura et coll., 2003) et l'expression de facteurs classiquement exprimés par les macrophages tels que le TNF-α, l'IL-6 et l'IL-1β dans la substance noire ou le striatum des sujets parkinsoniens (Boka et coll., 1994 ; Mogi et coll., 1994a ; Hunot et coll., 1999 ; Imamura Imamura et coll., 2003). En outre, cette activation microgliale a été reproduite dans de nombreux modèles de MP que ce soit chez le singe (McGeer et coll., 2003) ou les rongeurs (Kohutnicka et coll., 1998 ; Sherer et coll., 2003 ; Rodriguez-Pallares et coll., 2007). Plusieurs fonctions des cellules microgliales ont été impliquées dans le processus de dégénérescence neuronal. La production d'espèces réactives de l'oxygène et de cytokines en constituent deux exemples importants. Ainsi, des souris déficientes pour la NOSi ou la NADPH oxydase, deux enzymes impliquées dans la production d'ERO et d'ERA par les

microglies en condition pathologique, montrent une certaine résistance aux effets toxiques du MPTP (Liberatore et coll., 1999 ; Wu et coll., 2003).

Ce stress oxydatif produit par les cellules immunitaires du tissu nerveux pourrait conduire à la modification de protéines du soi telles que l'α-synucléine. Ces modifications oxydatives conduisent à la formation de néo-épitopes pathologiques potentiellement reconnus comme un antigène étranger et échappant ainsi aux mécanismes de tolérance immunitaire (Ohmori et Kanayama, 2005). De manière intéressante, l'α-synucléine nitrée, retrouvée en abondance dans les corps de Lewy des neurones dopaminergiques chez les sujets parkinsoniens, a également été détectée dans la substance noire et les ganglions lymphatiques cervicaux des souris intoxiquées par le MPTP (Benner et coll., 2008 ; Giasson et coll., 2000). Ces données suggèrent que des antigènes pathologiques produits au niveau central ont la capacité d'être drainés vers les organes lymphoïdes secondaires en empruntant des voies non encore identifiées. La présence de ces antigènes pathologiques dans les organes où sont initiées les réponses immunitaires adaptatives pourrait expliquer en partie les processus d'infiltration lymphocytaire cérébrale observés chez les patients parkinsoniens.

En effet, McGeer et coll. en 1988 avaient, pour la première fois, mis en évidence un nombre élevé de lymphocytes T $CD8^+$ dans la substance noire d'un seul patient parkinsonien (McGeer et coll., 1988). Brochard et coll. ont confirmé, sur une cohorte importante de patients, la présence d'un infiltrat lymphocytaire $CD8^+$ et ont également rappporté la présence de lymphocytes T $CD4^+$ dans la SN des malades (Brochard et coll., 2009).

Cette réponse immunitaire adaptative pourrait participer au processus pathologique comme l'ont montré les expériences de délétion des populations lymphocytaires T $CD4^+$ dans le modèle d'intoxication par le MPTP (Brochard et coll., 2009), ou encore les expériences de transfert de lymphocytes Th17 issus de souris immunisées contre l'α-synucléine nitrée, chez des souris intoxiquées au MPTP, et qui aggrave le processus de mort neuronale dopaminergique dans ce contexte (Reynolds et coll., 2010).

2. Stratégies thérapeutiques ciblant le système immunitaire

De nombreuses données obtenues chez l'homme ou dans les modèles animaux de maladie de Parkinson suggèrent un rôle délétère du système immunitaire (Hirsch et Hunot,

2009). Par conséquent des stratégies thérapeutiques ciblant cette réponse sont développées depuis plusieurs années.

Plusieurs stratégies sont actuellement testées pour moduler la réponse immunitaire innée à la neurodégénérescence. Parmi ces stratégies, l'utilisation de la pioglitazone, un agoniste de PPARγ (*anti-inflammatory peroxisome proliferator-activated receptor γ*) capable de passer la BHE et utilisé dans le traitement du diabète, semble constituer un candidat prometteur. En effet, la sécurité de ce traitement à long terme a été montrée par son administration chez les personnes diabétiques (Herz et coll., 2003). En outre, il possède des propriétés anti-inflammatoires mais également de régulation de la bioénergétique mitochondriale ou encore du métabolisme du glucose et pourrait ainsi moduler simultanément plusieurs mécanismes pathogéniques cruciaux de la MP (Randy et Guoying, 2007). L'utilisation de cet agoniste dans les modèles de MP a apporté la preuve de concept de son potentiel thérapeutique pour la MP (Breidert et coll., 2002 ; Dehmer et coll., 2004) et est actuellement en essai clinique de phase II.

L'autre versant d'action sur le système immunitaire est la réponse adaptative. L'idée de moduler cette composante immunitaire est en revanche beaucoup plus récente concernant les maladies neurodégénératives et en particulier la MP. On peut distinguer trois voies d'action majeures possibles sur cette composante immunitaire.

Une première voie d'action consiste à moduler la réponse immunitaire adaptative. Cette stratégie consiste à orienter la réponse immunitaire vers une réponse de type anti-inflammatoire ou régulatrice et met en jeu des populations lymphocytaires T spécifiques, en particulier les cellules Th2 et Treg. Dans cette approche, l'utilisation par exemple du copolymère 1 ou copaxone, a montré un bénéfice certain dans le modèle d'intoxication par le MPTP chez la souris (Benner et coll., 2004). Si le transfert de leucocytes issus de souris immunisées avec le copolymère 1 à des souris intoxiquées par le MPTP confère un certain niveau de neuroprotection, l'immunisation directe de souris malades avec ce peptide n'a en revanche jamais été testée. Aussi, bien que cette stratégie soit utilisée dans le traitement de la SEP depuis plus de 15 ans (Racke et Lovett-Racke, 2011), en l'absence de preuve de concept elle n'est, pour l'instant, pas envisagée pour la MP.

Une deuxième voie d'action consiste à diriger la réponse immunitaire contre un antigène dont on suspecte qu'il joue un rôle majeur dans les mécanismes physiopathologiques. Pour la MP, la cible de choix est l'α-synucléine qui s'aggrège dans les

neurones dopaminergiques pour former les corps de Lewy. Ainsi, l'immunisation active ou passive contre l'α-synucléine permettrait de diriger la réponse immunitaire adaptative, aussi bien dans sa composante cellulaire qu'humorale, pour éliminer ces agrégats. Testée avec succès dans des modèles transgéniques de surexpression d'α-synucléine (Masliah et coll., 2005), l'immunisation active contre cette protéine n'est en revanche pas envisagée chez les patients atteints de MP suite aux résultats de l'essai clinique de phase II obtenus chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer immunisés contre le peptide Aβ au cours duquel des cas d'encéphalite méningée se sont déclarés (Lemere et Masliah, 2010). Toutefois, plusieurs groupes industriels travaillent actuellement sur le développement d'anticorps humanisés dirigés contre l'α-synucléine et qui seront probablement testés dans des protocoles d'immunisation passive.

Enfin, une troisième voie d'action consisterait à limiter l'infiltration cérébrale des leucocytes pathogéniques. L'exemple du natalizumab, utilisé pour le traitement de la sclérose en plaque illustre bien cette voie thérapeutique. Cet anticorps bloque une intégrine nécessaire à la migration transendothéliale des leucocytes, les empêchant d'entrer dans le parenchyme cérébral. Cette stratégie produit un bénéfice thérapeutique certain pour les patients en ralentissant l'évolution de certaines formes de SEP (Papeix et Lubetzki, 2009).

Notre projet s'inscrit dans cette troisième voie d'étude. Nous avons pour cela tenté de mettre en évidence les modifications du réseau chimiokine et des molécules d'adhésion dans la SN de souris intoxiquées au MPTP et dans la SNpc de patients parkinsoniens. Nous avons alors bloqué l'interaction des ligands identifiés à leurs récepteurs et étudié l'impact de cette inhibition sur la neurodégénérescence et l'infiltration lymphocytaire après intoxication par le MPTP.

II. Caractérisation de l'expression des chimiokines dans un contexte pathologique du système nigro-strié

1. Signature chimiokinique du système nigro-strié pathologique

L'utilisation d'une première technique d'analyse transcriptomique utilisant des membranes de nylon (Oligoarrays) s'est avérée inadaptée à nos conditions expérimentales. Deux difficultés principales ont été rencontrées : *i)* cette technique était peu reproductible,

probablement en raison d'un très grand nombre d'étapes entre l'hybridation des ARNs et la révélation des membranes, *ii)* elle était par ailleurs peu sensible et ce malgré une amplification préalable permettant de multiplier par 5 la quantité d'ARN de départ. Pour palier à ces deux difficultés nous avons utilisé la technologie de TaqMan Arrays qui permet : *i)* une meilleure reproductibilité entre les échantillons grâce à un nombre d'étapes limité entre le chargement de la plaque et l'amplification, *ii)* une sensibilité plus importante par l'utilisation de la technique de PCR quantitative qui permet une amplification exponentielle des cDNA de départ.

Nos résultats de qPCR, complétés par les analyses ELISA et immunohistologiques, montrent une élévation très importante et précoce, de l'expression des chimiokines CCL3, CCL4 et CXCL10 dans la SNpc de souris intoxiquées par le MPTP. Cette expression diminue toutefois progressivement pour atteindre, 7 jours après intoxication, des taux quasi similaires à ceux des observés chez les souris contrôles.

Nos résultats confortent en partie les données de la littérature. En effet, plusieurs équipes ont mis en évidence l'expression transcriptionnelle rapide de chimiokines dans le mésencéphale ventral et le striatum de souris intoxiquées par le MPTP (Kalkonde et coll., 2007 ; Pattarini et coll., 2007 ; L'Episcopo et coll., 2011). Notamment, L'Episcopo et coll. ont rapporté une augmentation précoce d'expression (de 2 à 4 fois) des taux d'ARNm codant pour CCL3 et CXCL10 dans le mésencéphale ventral et le striatum après lésion par le MPTP selon un régime d'intoxication similaire à celui que nous avons utilisé (L'Episcopo et coll., 2011). Kalkonde et coll., en utilisant une technique de protection contre les RNases, ont observé une augmentation importante d'expression transcriptionnelle de CCL3 et CXCL10 dans le striatum (entre 20 et 40 fois). Cette augmentation était plus modérée dans le mésencéphale ventral (entre 1 et 1,5 fois) de souris 24 heures post-MPTP (Kalkonde et coll., 2007). L'augmentation d'expression plus faible dans le mésencéphale ventral observée par Kalkonde et coll. pourrait être expliquée par un protocole d'injection différent du notre (3 injections de 15 mg/kg de MPTP) et donc l'administration d'une dose cumulative de MPTP moins importante (45 mg/kg contre 94 mg/kg dans nos expériences). Pattarini et coll., en utilisant la technique de PCR quantitative, ont également détecté une augmentation d'expression de CCL3 et CCL4 (entre 5 et 20 fois), essentiellement entre 2 et 24 heures, dans le striatum de souris C57BL/6 intoxiquées avec une dose unique de MPTP (40 mg/kg)

(Pattarini et coll., 2007). Contrairement à ces études, nous avons en revanche montré que l'augmentation d'expression à l'échelle transcriptionnelle de CCL3, CCL4 et CXCL10 se traduisait par une augmentation proportionnelle des ligands au niveau protéique.

Nos études chez l'homme montrent des similitudes d'expression des chimiokines dans la SNpc des patients parkinsoniens et dans notre modèle animal. En effet, nous avons détecté une augmentation significative d'expression de CCL3 et CCL4 (respectivement 1,65 et 1,4 fois) dans la SNpc des sujets parkinsoniens. A notre connaissance, ceci est la première démonstration d'une augmentation d'expression de ligands chimiokiniques dans la SN au cours de la MP. Ces résultats complètent ainsi les données de la littérature rapportant des modulations d'expression de certains facteurs chimiokiniques dans les fluides biologiques de patients parkinsoniens. En effet, Reale et coll. avaient détecté une augmentation d'expression de CCL3 dans les cellules mononuclées circulantes des patients atteints de MP (Reale et coll., 2009). Une autre étude a rapporté une élévation des taux de CCL5 dans le sérum des patients atteints de MP (Rentzos et coll., 2007). Toutefois, cette augmentation pourrait être liée à la dopathérapie dont ont bénéficié les patients inclus dans cette étude (Gangemi et coll., 2003). Aussi, il sera essentiel de déterminer si l'augmentation de CCL3 et CCL4 au niveau central est associée ou non aux traitements dopaminergiques.

Concernant la faible augmentation des taux de chimiokines dans la substance noire de patients parkinsoniens, nous pouvons confronter nos résultats aux données de la littérature sur l'expression des cytokines dans le cerveau des patients. Elles montrent, dans l'ensemble, des augmentations assez faibles d'expression des cytokines lors d'études *post-mortem*. En effet, Mogi et coll. ont par exemple montré, par des expériences quantitatives d'EIA (*Enzyme Immunoassay*), une augmentation de la quantité de TNF-α dans la substance noire de patients parkinsoniens (Mogi et coll., 1994b). Cependant, les taux de protéine détectés étaient faibles et très proches du minimum détectable avec cette technique. Dans une étude plus récente par ELISA, Mogi et coll. ont montré une augmentation d'IFNγ de 1,6 fois dans la SNpc de patients (Mogi et coll., 2007). Ces données concernant deux facteurs majeurs des processus inflammatoires suggèrent donc que l'augmentation d'expression des cytokines est assez faible dans la SN de patients atteints de MP au niveau *post-mortem* malgré la présence de nombreuses cellules microgliales « activées » détectées par immunohistochimie. Ces résultats peuvent s'expliquer par le taux très faible de neurones

dopaminergiques encore présents dans la SN à ces stades tardifs de la pathologie. Par conséquent, les cellules microgliales, bien que mises en évidence avec des marqueurs tels qu'HLA-DR, sont peut être faiblement activées dans ces conditions.

Concernant l'expression de CXCL10 chez les patients parkinsoniens, nous observons une augmentation en moyenne plus importante (2,2 fois) que celle de CCL3 et CCL4 mais non significative et essentiellement due à l'expression très élevée de cette chimiokine dans la SNpc d'un sujet parkinsonien (augmentation de 32 fois ; l'augmentation moyenne du groupe étant de 1,4 fois sans ce patient). L'augmentation d'expression très importante de CXCL10 chez ce patient pourrait être attribuée au développement d'une septicémie. Plusieurs études ont en effet détecté une augmentation d'expression des chimiokines, dont CXCL10 et CCL3, dans les modèles murins de septicémie (Kelly-Scumpia et coll., 2011). Cependant les taux d'expression de CCL3 et CCL4 chez ce sujet parkinsoniens ne dépassaient pas le niveau moyen des sujets contrôles.

Par ailleurs, nous pouvons dire qu'il existe une certaine variabilité interindividuelle quant au niveau d'expression des facteurs inflammatoires chez les sujets parkinsoniens. Cette variabilité, mise en évidence ici pour les chimiokines, existe également pour d'autres cytokines telles que le TNF-α (Boka et coll., 1994 ; Mogi et coll., 1994b). L'origine de cette hétérogénéité, régulièrement observée dans les études chez l'homme, pourrait égalemement être attribuée aux différences de durée dévolution de la maladie, de traitements ou encore d'étiologie.

Les processus neuroinflammatoires ne sont pas spécifiques de la MP. En effet, des réponses immunitaires innées et adaptatives ont également été rapportées dans d'autres pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et la sclérose latérale amyotrophique (Rogers et coll., 1988 ; Appel et coll., 2010). Aussi, l'expression de CCL3, CCL4 et CXCL10 dans le cerveau des patients atteints de MP n'est pas une caractéristique spécifique de cette pathologie. En effet, dans la maladie d'Alzheimer par exemple, plusieurs auteurs, en utilisant la technique d'immunohistochimie, ont mis en évidence une augmentation du nombre de cellules exprimant les chimiokines CCL2, CCL4 et CXCL10 dans le cerveau des patients (Ishizuka et coll., 1997 ; Xia et coll., 1998 ; Xia et coll., 2000). De même, et de façon moins surprenante, dans le contexte de la sclérose en plaque, et son modèle l'EAE, de nombreux auteurs ont montré une expression augmentée de CCL2, CCL3,

CCL4, CCL5 et CXCL10 au niveau des sites lésionnels inflammatoires (Hulkower et coll., 1993 ; Ransohoff et coll., 1993 ; Godiska et coll., 1995 ; Berman 1996 ; Karpus et Kennedy, 1997 ; Jiang et coll., 1998 ; Kennedy et coll., 1998 ; McManus et coll., 1998 ; Simpson et coll., 1998 ; Balashov et coll., 1999 ; Sorensen et coll., 1999 ; Sorensen et coll., 2002). Enfin, dans d'autres formes d'affections neurologiques telles que l'accident vasculaire cérébral ou les traumatismes crâniens, une extravasation leucocytaire cérébrale importante est associée à une augmentation significative d'expression de CCL2, CCL3, CCL4 et CXCL10, mais également de chimiokines qui semblent être plus spécifiques de ce type de traumatismes aigus telles que CXCL1, CXCL8 ou CCL7 (Wang et coll., 1995 ; Matsumoto et coll., 1997 ; Wang et coll., 1998 ; Gourmala et coll., 1999 ; Wang et coll., 1999 ; Wang et coll., 1999 ; Che et coll., 2001). Au total, l'ensemble de ces études suggère à la fois un certain degré de similarité dans les profils d'expression de chimiokines dans les pathologies du SNC avec toutefois certaines spécificités selon le type d'affection.

Ainsi, nos expériences montrent l'augmentation d'expression des ARNm et des protéines CCL3, CCL4 et CXCL10 dans le système nigro-strié des souris intoxiquées par le MPTP suggérant que ces ligands pourraient jouer un rôle dans l'extravasation parenchymateuse des lymphocytes T.

Nos résultats suggèrent également que l'expression des chimiokines CCL3 et CCL4 est augmentée dans la substance noire des patients parkinsoniens. Cependant, au regard de l'hétérogénéité des résultats inhérente aux études réalisées chez l'homme, une classification très précise des patients, par exemple grâce aux stades de Braak, au degré de perte dopaminergique, d'activation microgliale et de gliose réactionnelle par immunohistochimie dans la SNpc et à des données cliniques très complètes, semble nécessaire pour permettre une meilleure analyse lors de futures expériences. De plus, en raison des faibles taux d'expression des cytokines dans la SNpc humaine, la mise en évidence de différences d'expression semble nécessiter des analyses quantitatives par des techniques très sensibles et sur un grand nombre d'échantillons.

2. Expression cellulaire des chimiokines.

La cinétique de mort neuronale, d'activation gliale et d'infiltration de cellules immunitaires adaptatives dans le parenchyme cérébral a été décrite dans la SNpc de souris

intoxiquées par le MPTP (Figure 57). L'activation des cellules microgliales serait la plus précoce, avec une détection de cellules microgliales exprimant le marqueur Mac1 dans la SNpc dès 12 heures post-intoxication. L'infiltration de cellules T débuterait à partir de 48 heures post-MPTP au moment où la gliose réactionnelle se met en place. A ce moment, les neurones sont dans une phase de souffrance cellulaire qui précède la phase de mort cellulaire qui elle-même se poursuit jusqu'au 7^{e} jour post-intoxication.

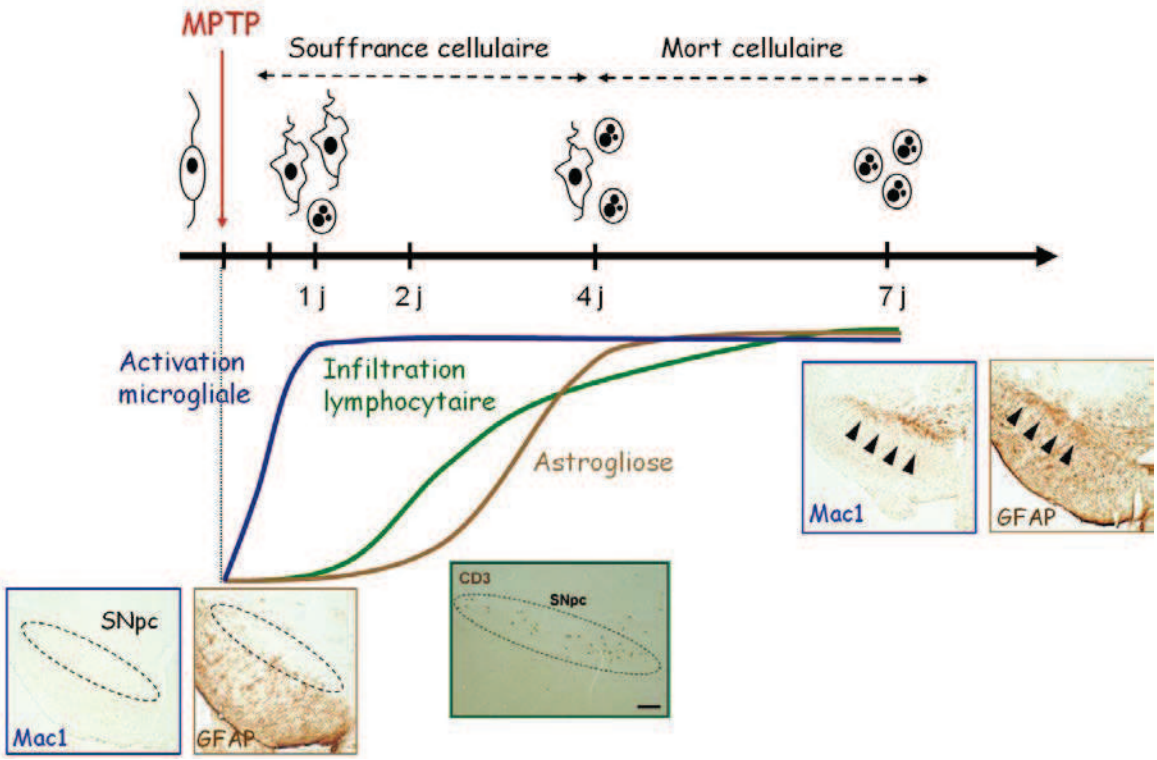


Figure 57 : Cinétique de mort neuronale, d'activation gliale et d'infiltration lymphocytaire dans la SN de souris intoxiquées par le MPTP. Immunohistochimies Mac1 (cellules microgliales), GFAP (astrocytes) et CD3 (lymphocytes T).

A l'aide d'immunomarquages en fluorescence, nous avons localisé les chimiokines CCL3 et CCL4 exclusivement dans les microglies de la SNpc, 24 et 48 heures après intoxication par le MPTP.

L'expression microgliale de CCL3 et CCL4 que nous avons observée corrobore certaines données de la littérature. En effet, en culture l'expression de CCL3 a été détectée dans des microglies par plusieurs auteurs (Bianchi et coll., 2011 ; Mayer et coll., 2011). Peterson et coll. ont précisé que la source préférentielle de CCL3 était la microglie après activation au LPS bien que les astrocytes, notamment activés avec le TNF-α, soient également capables de produire cette chimiokine mais à des taux plus faibles (Peterson et coll., 1997). En outre, dans des conditions d'activation similaires, ces auteurs ont détecté une production de CCL4 équivalente entre les microglies et les astrocytes (Peterson et coll.,

1997). Enfin, dans un modèle animal d'épilepsie, l'expression de CCL3 a également été détectée dans les microglies par immunohistochimie (Johnson et coll., 2011). Les données concernant la source cellulaire des chimiokines dans la maladie de Parkinson sont en revanche pratiquement inexistantes. Nos travaux constituent, à notre connaissance, la première description de la localisation microgliale des chimiokines CCL3 et CCL4 dans un modèle animal de maladie de Parkinson. Toutefois, Zhang et coll. ont rapporté l'augmentation d'expression de l'ARNm codant pour CCL3 dans les cellules microgliales stimulées par de la neuromélanine (Zhang et coll., 2011). Egalement *in vitro*, Roodveldt et coll. ont montré que le LPS et l'α-synucléine mutée stimulaient la production de CCL3 dans les cellules microgliales (Roodveldt et coll., 2010).

L'expression microgliale de CCL3 et CCL4 observée dans des modèles animaux de pathologies du SNC semble relevante pour les patients souffrant d'affections neurologiques. En effet, l'expression de CCL3 et CCL4 a été décrite dans les microglies, les astrocytes ainsi que les macrophages périvasculaires au niveau des lésions inflammatoires de patients souffrant de sclérose en plaque (Simpson et coll., 1998 ; Balashov et coll., 1999).

Au total, nos résultats confortent les données de la littérature décrivant les microglies comme source majeure de CCL3 et CCL4 dans le système nerveux central. Dans la MP, la réponse immunitaire innée supportée par ces cellules microgliales pourrait ainsi contribuer au développent de la réponse immunitaire adaptative en stimulant l'extravasation cérébrale des lymphocytes T circulants à travers la BHE.

Si l'expression de CCL3 et CCL4 était exclusivement microgliale dans notre modèle expérimental, CXCL10, quant à elle, était détectée uniquement dans les astrocytes $GFAP^+$.

Bien qu'*in vitro*, l'expression de CXCL10 peut être détectée aussi bien dans les astrocytes que les cellules microgliales et les neurones, notamment en présence d'IFNγ, *in vivo*, dans des modèles animaux, l'expression de CXCL10 semble principalement concerner les astrocytes ou les neurones (Vanguri, 1995 ; Ren et coll., 1998 ; Bandyopadhyay et coll., 2007). C'est le cas notamment du modèle EAE et de certains modèles d'infection virale ou parasitaire du SNC (Ransohoff et coll., 1993 ; Tani et coll., 1996 ; Lane et coll., 1998 ; Sauder et coll., 2000 ; Asensio et coll., 2001 ; Klein et coll., 2005 ; Muller et coll., 2007 ; Campanella et coll., 2008). Aussi, nos données sont en accord avec l'ensemble des données de la littérature.

Dans le contexte de la MP, seule une étude *in vitro* a rapporté l'expression microgliale de CXCL10 après stimulation au LPS ou avec de l'α-synucléine mutée (Roodveldt et coll., 2010). *In vivo* cependant, nos données suggèrent que les cellules microgliales ne représentent pas la source majeure de CXCL10 dans la substance noire inflammée. Il serait toutefois intéressant de comparer nos résultats obtenus dans le modèle MPTP avec des études réalisées dans des modèles de synucléinopathie.

L'expression astrocytaire de CXCL10 dans les modèles expérimentaux chez l'animal corrobore également les données obtenues chez l'homme. En effet, l'expression de CXCL10 a été détectée dans des cellules ayant une morphologie astrocytaire dans le cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer (Xia et coll., 2000). De même, plusieurs études ont rapporté l'expression de CXCL10 au niveau des plaques de démyélinisation chez les patients atteints de sclérose en plaque (Balashov et coll., 1999 ; Sorensen et coll., 1999 ; Simpson et coll., 2000 ; Sorensen et coll., 2002).

L'ensemble de ces données suggère que les astrocytes réprésentent une des sources majeures de CXCL10 dans les pathologies du SNC, confirmant ainsi nos données obtenues dans le modèle d'intoxication par le MPTP chez la souris. Par ailleurs, nos résultats montrent que les astrocytes pourraient jouer un rôle majeur dans les processus d'extravasation cérébrale des leucocytes à travers la BHE dans la MP. Cette hypothèse avait notamment été proposée par le groupe de Patrick McGeer qui avait montré une expression astrocytaire importante de la molécule d'adhésion ICAM1 aussi bien chez les sujets parkinsoniens que chez les singes intoxiqués par le MPTP.

Au total, l'ensemble de nos résultats suggère que les cellules gliales pourraient jouer un rôle important dans le processus d'infiltration cérébrale des lymphocytes T dans un contexte de lésion du système nigro-strié.

3. Localisation subcellulaire des chimiokines

Nos données, obtenues par microscopie confocale, montrent que CCL3 et CCL4 sont localisées dans le cytoplasme des cellules microgliales sous forme d'un amas dense et de structures de type vésiculaire. CXCL10 est observée sours forme de plusieurs amas dans le cytoplasme des astrocytes.

Si, à notre connaissance, la localisation subcellulaire de ces chimiokines n'avait jusqu'à présent jamais été précisée dans les cellules microgliales et les astrocytes, plusieurs

auteurs ont toutefois étudié ces caractéristiques dans d'autres types cellulaires. Ainsi, CXCL1 et CCL2 ont été observées majoritairement dans l'appareil de Golgi et dans des granules de sécrétion au sein des cellules endothéliales (Oynebraten et coll., 2004 ; Oynebraten et coll., 2005 ; Shulman et coll., 2012). Ces auteurs ont également mis en évidence une localisation de CXCL10 au niveau du Golgi et dans des granules non sécrétoires des cellules endothéliales (Oynebraten et coll., 2004). Catalfamo et coll. ont également montré que CCL5, rapidement sécrété par les lymphocytes $CD8^+$ activés, est principalement détecté dans des vésicules de sécrétion (Catalfamo et coll., 2004). Enfin, CCL2, CCL21 et CXCL10 ont pu être détectées dans des structures vésiculaires au niveau du soma et des prolongements de neurones en culture (de Jong et coll., 2005 ; de Jong et coll., 2008 ; Jung et coll., 2008 ; Vinet et coll., 2010).

Au total, ces données suggèrent une localisation des chimiokines CCL3, CCL4 et CXCL10 au sein du Golgi et dans des granules sécrétoires ou non dans les cellules microgliales et les astrocytes.

III. Implication des chimiokines dans la physiopathologie des lymphocytes T dans les syndromes parkinsoniens

L'observation d'une expression précoce (24 heures post-MPTP) des chimiokines CCL3, CCL4 et CXCL10 dans la SNpc des souris lésées suggère que ces facteurs pourraient contribuer au recrutement des lymphocytes T deux jours après l'initiation de la maladie tel que l'ont rapporté plusieurs auteurs dans ce modèle expérimental (Kurkowska-Jastrzebska et coll., 1999a ; Brochard et coll., 2009). Nos travaux confirment en partie cette cinétique d'infiltration leucocytaire puisque nous observons une augmentation d'expression des marqueurs CD3e et T-bet dans le mésencéphale ventral 2 jours (de manière non significative) et 7 jours (de manière significative) après intoxication par le MPTP. Toutefois, la diminution d'expression de CCL3, CCL4 et CXCL10 à des taux quasi similaires à ceux des souris contrôles suggère que ces trois facteurs chimiokiniques puissent jouer un rôle essentiel dans le recrutement précoce des lymphocytes T mais pas dans celui plus tardif au moment de la résolution de l'inflammation dans la SNpc. Nous pouvons faire l'hypothèse que *i)* d'autres chimiokines pourraient prendre le relai pour permettre l'extravasation des lymphocytes T dans les stades plus tardifs dans notre modèle expérimental. En effet, contrairement à CCL3, CCL4 et CXCL10, nous avons observé que d'autres ligands

présentaient une expression augmentée et stable entre 2 et 7 jours post-MPTP (exemple CCL5, CCL6 et CCL9). *ii)* les populations lymphocytaires infiltrant à 7 jours sont différentes de celles infiltrant à 2 jours et qu'elles puissent mettre en jeu des récepteurs et des ligands de nature différente.

Si le lien entre l'expression de CCL3, CCL4 et CXCL10 et le recrutement lymphocytaire dans la SNpc, comme indiqué ci-dessus, reste corrélatif, nos travaux reposant sur la manipulation des récepteurs à ces ligands nous a permis d'apporter des arguments plus directs sur le rôle du réseau chimiokinique dans les processus d'infiltration lymphocytaire associés aux mécanismes physiopathologiques à l'œuvre dans le modèle d'intoxication par le MPTP chez la souris. En effet, afin d'étudier directement le rôle des chimiokines dans l'infiltration lymphocytaire et la dégénérescence dopaminergique dans le contexte lésionnel de la voie nigro-striée, nous avons réalisé des expériences sur des souris présentant une délétion constitutive pour les récepteurs CCR1, CCR5 ou CXCR3. Bien qu'une faible diminution de la mort neuronale de l'ordre de 26% ait été observée chez les souris déficientes en CCR1, aucune différence n'a été observée chez les souris $Ccr5^{-/-}$ et $Cxcr3^{-/-}$ intoxiquées au MPTP par rapport à leurs congénères sauvages. De plus l'absence de ces récepteurs n'est pas associée à une diminution de nombre de lymphocytes T $CD4^+$ infiltrant le parenchyme cérébral. Alors que les ligands pour ces récepteurs sont fortement exprimés dans la SNpc après MPTP, la délétion de ces récepteurs ne permet donc pas de bloquer l'infiltration lymphocytaire T $CD4^+$ et n'est par conséquent pas associée aux 70% de protection dopaminergique observée chez les souris déficientes en lymphocytes T $CD4^+$ (Brochard, 2008 ; Brochard et coll., 2009). Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ces résultats :

1) D'une part, l'absence d'un récepteur donné pourrait être compensée, d'un point de vue fonctionnel, par l'expression d'autres récepteurs sur le même lymphocyte. Ainsi, Shulman et coll. ont par exemple montré que le blocage d'un seul récepteur aux chimiokines ne suffisait pas à inhiber la migration transendothéliale de lymphocytes effecteurs au travers de cellules endothéliales en culture (Shulman et coll., 2012). Ces mêmes auteurs montrent par ailleurs que le blocage simultané de CCR1, CCR2, CCR5 et CXCR3 était nécessaire pour bloquer complètement ce processus d'extravasation (Shulman et coll., 2012). Nous pouvons donc faire l'hypothèse que le blocage simultané de CCR1, CCR5 et CXCR3 puisse être

nécessaire pour inhiber l'infiltration lymphocytaire dans notre modèle expérimental. Nos expériences montrent que cette hypothèse est en partie vérifiée puisqu'un effet protecteur contre les effets neurotoxiques du MPTP n'a pu être observé que chez les souris Cxcr3$^{-/-}$ traitées par l'antagoniste de CCR1 et CCR5, Met-RANTES. Dans cette expérience l'administration de Met-RANTES chez des souris C57BL/6 sauvages s'est révélée sans effet sur la dégénérescence dopaminergique. Ce dernier résultat contraste avec ceux obtenus précédemment au laboratoire qui montraient un effet neuroprotecteur de l'ordre de 40% après administration d'un régime similaire de Met-RANTES à des souris sauvages. A noter que, parmi les facteurs portentiellement impliqués dans cette différence, le lot de MPTP ainsi que le fournisseur des souris C57BL/6 pouvaient *a priori* être écartés car les niveaux de lésion nigro-striée après intoxication par le MPTP étaient identiques dans ces deux expériences. Bien qu'il soit difficile de déterminer avec exactitude la raison de cette différence, nous avons malgré tout relevé deux facteurs qui auraient pu influencer les résultats : l'expérimentateur et le lot de Met-RANTES. Dans le premier cas, des différences dans la qualité d'administration de l'antagoniste et donc d'accessibilité biologique de ce dernier, auraient pu influencer le niveau de neuroprotection potentiellement conféré par le seul antagonisme de CCR1 et CCR5. Dans le deuxième cas, une différence d'efficacité antagoniste entre les deux lots utilisés aurait pu également générer un effet neuroprotecteur massif lors de la première expérience et un effet suboptimal dans la deuxième expérience, uniquement révélé par l'absence combinée de CXCR3. A ce titre, il est important de rappeler que la dose et la fréquence d'administration des antagonistes pharmacologiques des chimiokines sont probablement des facteurs très importants qui conditionneraient l'effet biologique recherché. En effet, Schall et Proudfoot ont formulé l'hypothèse que pour obtenir un effet biologique optimal, il serait nécessaire qu'au moins 90% des récepteurs ciblés soient antagonisés à chaque instant (Schall et Proudfoot, 2011). En l'absence d'études pharmacocinétiques détaillées sur le Met-RANTES nous ne pouvons déterminer avec exactitude les doses d'antagoniste qui permettraient cette inhibition de 90% des récepteurs CCR1 et CCR5. Toutefois, les données de la littérature semblent suggérer que l'administration journalière d'au moins 50 µg de Met-RANTES chez le rat représentait le protocole le plus efficace pour inhiber le comportement migratoire de différentes populations leucocytaires (Grone et coll., 1999 ; Ajuebor et coll., 2001 ; Stumbles et coll., 2001 ; Stojanovic et coll., 2002 ; Diedrichs-Mohring et coll., 2005 ; Shahrara et coll., 2005).

Quelque soit la raison de cette différence d'efficacité du Met-RANTES, la conclusion majeure que l'on peut tirer de nos expériences est qu'une action simultanée sur plusieurs récepteurs potentialise l'effet sur la capacité migratoire des lymphocytes et donc la mort neuronale dans le modèle d'intoxication par le MPTP chez la souris. Malgré l'effet neuroprotecteur significatif (36%) obtenu après inhibition combinée de CCR1, CCR5 et CXCR3, celui-ci n'égale pas les 70% de neuroprotection obtenus chez les souris $CD4^{-/-}$, suggérant que d'autres récepteurs chimiokiniques sont peut être exprimés par ces lymphocytes ou que l'infiltrat lymphocytaire est constitué de sous-populations distinctes exprimant chacune des récepteurs différents. Si, à l'heure actuelle, il nous est impossible de vérifier ces deux hypothèses, il est toutefois important de rappeler qu'outre CCR1, CCR5 et CXCR3, les lymphocytes T peuvent exprimer d'autres récepteurs, comme par exemple CCR2, CCR3 (Bonecchi et coll., 1998 ; Sallusto et coll., 1998 ; Zhang et coll., 2010a), CCR6 (Reboldi et coll., 2009) et CXCR6 (Kim et coll., 2001), ce dernier faisant l'objet d'une étude au laboratoire.

2) D'autre part, la délétion constitutive d'un récepteur aux chimiokines pourrait être associée à de multiples effets autres que ceux spécifiquement obtenus sur les lymphocytes. En effet, l'expression des récepteurs aux chimiokines n'est pas restreinte aux lymphocytes. C'est le cas notamment des récepteurs CCR1 et CCR5 auxquels nous nous sommes interessés au cours de ce travail. Ainsi, par exemple, dans les lésions cérébrales de sclérose en plaques, des infiltrats de macrophages exprimant CCR1 et CCR5 sont observés (Balashov et coll., 1999 ; Simpson et coll., 2000). L'expression de récepteurs CCR1 et CCR5 fonctionnels est également connue au niveau des cellules microgliales (Skuljec et coll., 2011). Enfin, les astrocytes, microglies et neurones expriment de nombreux récepteurs aux chimiokines selon différentes conditions expérimentales ou physiopathologiques (Bajetto et coll., 2002). Ainsi, chez l'homme plusieurs auteurs ont rapporté l'expression de CXCR3 au niveau des astrocytes, de lignée neuronale, de neurones fœtaux et de neurones adultes aussi bien dans le cerveau de sujets contrôles que de patients atteints de maladie d'Alzheimer (Coughlan et coll., 2000 ; Xia et coll., 2000 ; Goldberg et coll., 2001). Nous pouvons donc faire l'hypothèse que la délétion constitutive de CXCR3, CCR5 ou CCR1 chez la souris puisse perturber de nombreuses réponses cellulaires masquant ainsi l'effet potentiel spécifique sur les lymphocytes T infiltrants. Afin de contourner ce problème, il apparaît donc nécessaire de cibler la délétion des récepteurs en question spécifiquement sur les populations

leucocytaires. A ce titre, nos expériences de transfert passif devraient nous permettre de déterminer si la délétion spécifique à l'échelle leucocytaire du récepteur CXCR3, CCR5 ou CCR1 est suffisante pour diminuer ou stopper l'extravasation cérébrale de ces cellules dans le système nigro-strié lésé et inflammé. Nos premières analyses sur les souris chimères montrent que, bien qu'après reconstitution des souris $rag1^{-/-}$ le taux de lymphocytes T circulants n'est que de 50% par rapport à des souris sauvages, la proportion des différentes populations lymphocytaires circulantes ($CD4^+$, $CD8^+$, $CD45RA^+$, $CD25^+$) chez ces souris chimères est identique quelque soit le génotype des splénocytes utilisés pour la reconstitution des organes lymphoïdes secondaires. Cette observation exclut *a priori* le rôle de modifications majeures du compartiment lymphocytaire que pourrait entraîner la délétion d'un récepteur aux chimiokines sur le bénéfice physiopathologique recherché (diminution du processus d'infiltration lymphocytaire et de dégénérescence dopaminergique) chez ces souris chimères. Cet aspect est en effet important au regard du rôle joué par certaines chimiokines telles que CCL3 et CCL4, deux ligands de CCR5, dans l'entrée des lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques au cours d'une réponse immunitaire (Tedla et coll., 1998).

3) Enfin, la délétion constitutive d'un récepteur donné pourrait être associée à une augmentation importante des taux circulants mais aussi cérébraux de ligands chimiokiniques du fait d'un défaut de régulation de dégradation de ces derniers (Cardona et coll., 2008). En effet, Ajuebor et coll. ont montré, dans un modèle d'hépatite, que la délétion de CCR5 avait pour conséquence d'augmenter l'infiltrat NK dans le foie en raison d'une augmentation des taux de CCL5 tissulaires agissant au travers du récepteur CCR1 exprimé par ces mêmes NK (Ajuebor et coll., 2007). Nous pouvons là aussi faire l'hypothèse que, dans notre modèle expérimental, la délétion de CCR5 pourrait provoquer l'augmentation des taux de CCL5 intracérébraux favorisant ainsi le recrutement lymphocytaire via une action agoniste sur le récepteur CCR1 de ces dits lymphocytes.

Au total, nos résultats suggèrent donc une modulation importante du réseau chimiokinique associée à la réaction gliale dans un contexte de lésion du système nigro-strié. De plus le réseau chimiokinique joue vraisemblablement un rôle important dans le

recrutement cérébral des lymphocytes T et la physiopathologie de la maladie de Parkinson.

De nombreuses données de la littérature suggèrent qu'outre les mécanismes autonomes de la dégénérescence neuronale dopaminergique, des mécanismes non autonomes, mettant en jeu les cellules présentes dans l'environnement neuronal, peuvent moduler le processus neurodégénératif dans la MP. Ces mécanismes non autonomes reposent en partie sur l'existence de réponses immunitaires de type inné mais aussi adaptative. Ainsi, si la composante innée de cette réponse mettant en jeu notamment la mobilisation et la réaction des cellules microgliales a été très largement étudiée depuis de nombreuses années et reste encore l'objet de nombreuses investigations, la mise en évidence de la composante adaptative est beaucoup plus récente (Kurkowska-Jastrzebska et coll., 1999b, Brochard et coll., 2009). Fait important, cette réponse immune adaptative, caractérisée par des infiltrats lymphocytaires de type T dans le système nigro-strié lésé, semble jouer un rôle délétère dans les mécanismes conduisant à la mort des neurones dopaminergiques comme le suggèrent les données *in vivo* chez des souris intoxiquées par le MPTP. Par conséquent, l'objectif principal du travail présenté dans cette thèse était de comprendre les mécanismes permettant aux cellules du système immunitaire adaptatif de pénétrer le parenchyme cérébral lors d'une lésion du système nigro-strié et de tenter de prévenir cette infiltration à des fins thérapeutiques.

L'ensemble de nos données montre que, dans un contexte de lésion du système nigro-strié, une signature chimiokinique particulière peut être observée et associée à la réaction gliale (microgliale et astrocytaire) qui se développe en réponse à la souffrance et la mort neuronale dopaminergique. Par ailleurs, la manipulation génétique et pharmacologique des récepteurs à ces médiateurs inflammatoires suggère un rôle de ce réseau chimiokinique dans les mécanismes physiopathologiques de la MP. Néanmoins nos résultats doivent non seulement être complétés et confirmés par des analyses supplémentaires mais posent également de nombreuses autres questions auxquelles nous pourrions être tentés de répondre à travers différentes stratégies expérimentales.

S'agissant des analyses en cours pour compléter ce travail, nous finalisons actuellement : *i)* l'évaluation et la comparaison des infiltrats lymphocytaires et de la réaction gliale dans la SNpc des souris Cxcr3$^{-/-}$ traitées avec le Met-RANTES et intoxiquées par le MPTP par rapport à leurs congénères sauvages, *ii)* l'évaluation et la comparaison de la perte dopaminergique nigrale, de l'infiltrat lymphocytaire et de la réaction gliale dans les différents groupes de souris rag1$^{-/-}$ reconstituées avec des splénocytes sauvage ou déficients

pour CCR1, CCR5 ou CXCR3 par rapport à leurs congénères sauvages et *iii)* l'identification des cellules positives pour CCL3 et CCL4 dans la SNpc de patients parkinsoniens et de sujets contrôles.

S'agissant des nouvelles interrogations que notre travail soulève, la question relative au type de récepteur chimiokinique exprimé par les lymphocytes infiltrant apparaît comme un problème majeur. En effet, sur la base de la signature chimiokinique que nous avons définie au cours de ce travail, nous avons fait l'hypothèse que ces lymphocytes exprimeraient les récepteurs CCR1, CCR5 et CXCR3, sans en avoir toutefois une preuve formelle. Aussi, toutes nos études fonctionnelles sont basées sur une supposition certes logique mais qui exclut d'autres candidats potentiellement importants. Par conséquent, il serait interessant de pouvoir déterminer les différents récepteurs chimiokiniques exprimés par les lymphocytes T présents dans le parenchyme cérébral chez la souris intoxiquée par le MPTP. Pour cela différentes approches pourraient être envisagées : *i)* l'utilisation de souris reportrices mais qui hélas doivent être développées car non disponibles actuellement à notre connaissance, *ii)* l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre ces récepteurs pour des expériences d'immunomarquages sur coupes de tissus. Il semble toutefois difficile d'obtenir des anticorps validés pour ce type d'expérience (C. Combadière, communication personnelle). Toutefois, l'utilisation de ligands couplés à des fluorochromes permettrait de surmonter cette difficulté. *iii)* l'isolation et la purification de l'infiltrat lymphocytaire afin de réaliser une analyse moléculaire détaillée. Au regard de la faible quantité de cellules infiltrant la SNpc, cette dernière approche est cependant un réel défi que nous n'avons pas encore réussi à surmonter malgré plusieurs tentatives.

Une autre question qui nous apparaît essentielle est celle relative à la relevance du modèle d'intoxication par le MPTP chez la souris pour la MP. En effet, si ce modèle à l'avantage de récapituler un certain nombre de critères neuropathologiques caractéristiques de la maladie humaine en particulier la mort neuronale, les processus neuroinflammatoires et la réaction gliale associée, il ne reproduit pas en revanche la synucléinopathie. Par ailleurs, le modèle de souris MPTP n'est pas un modèle de dégénérescence chronique. Ainsi, il serait interessant de comparer les résultats obtenus dans le modèle souris MPTP avec un autre modèle expérimental ne reposant pas sur l'administration d'une neurotoxine mais sur l'expression d'un gène muté à l'origine de formes familiales de MP. En effet, il est généralement admis que les processus neuroinflammatoires sont une conséquence de la

souffrance et de la mort neuronale dopaminergique et qu'ils peuvent par conséquent être similaires quelque soit l'origine de la dégénérescence. Nous pensons que le modèle de choix pour ce type de comparaison serait l'injection intracérébrale de vecteurs viraux permettant l'expression d'α-synucléine sauvage ou mutée. En effet, des processus d'infiltration de cellules $CD4^+$ et $CD8^+$ ont été rapportés dans ce modèle et ce en association avec l'expression d'autres médiateurs proinflammatoires notamment retrouvés dans le modèle de souris intoxiquées par le MPTP (Theodore et coll., 2008 ; Sanchez-Guajardo et coll., 2010).

D'un point de vue thérapeutique nos résultats mettent en évidence plusieurs difficultés propres à la stratégie de blocage des récepteurs chimiokiniques. D'une part, l'inhibition d'un seul récepteur n'est *a priori* pas suffisamment efficace pour bloquer le processus d'infiltration. Il semble donc nécessaire de bloquer simultanément plusieurs récepteurs pour espérer diminuer le recrutement cérébral de cellules du système immunitaire adaptatif au niveau du système nigro-strié lésé. Toutefois, même dans ces conditions, nous avons pu observer que le blocage de trois récepteurs n'était toujours pas suffisant pour obtenir une neuroprotection au moins égale à celle observée chez les souris déficientes en lymphocytes T $CD4^+$. Ainsi, un effet important sur l'infiltration lymphocytaire et la dégénérescence dopaminergique pourrait requérir une inhibition efficace de plusieurs récepteurs. Etant donné les rôles de ces récepteurs dans d'autres processus physiologiques et pathologiques, l'intérêt thérapeutique d'une stratégie de blocage multiple des récepteurs aux chimiokines dans une maladie chronique d'évolution longue, telle que la MP, doit prendre en compte les effets secondaires potentiellement majeurs, notamment sur le système immunitaire. En effet, comme cela est le cas avec le Tysabri, un anticorps humanisé neutralisant dirigé contre l'intégrine α_4 et utilisé en clinique chez les patients atteints de sclérose en plaques pour combattre l'infiltration des cellules T pathogéniques, il est concevable de penser qu'un traitement chronique dirigé contre de multiples récepteurs chimiokiniques puisse entraîner une sensibilisation à certaines infections potentiellement graves. Néanmoins, plus de quarante médicaments dirigés contre des récepteurs aux chimiokines sont actuellement en études cliniques pour le traitement de diverses pathologies inflammatoires telles que la sclérose en plaques, l'arthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn (Proudfoot et coll., 2010). Ces données nous permettront probablement

d'obtenir des informations importantes concernant la sécurité de ces traitements et les modes d'administration les plus adaptés.

Enfin, et pour élargir les perspectives thérapeutiques visant à prévenir l'extravasation des lymphocytes dans le parenchyme cérébral au cours de la MP, une autre stratégie pourrait cibler l'interaction entre les intégrines leucocytaires et les CAMs endothéliales. Cependant, au cours de notre étude nous n'avons mis en évidence que de faibles modifications d'expression des molécules d'adhésion au niveau transcriptionnel. Ces résultats contrastent par ailleurs avec les données disponibles chez l'homme et la souris ou le singe intoxiqué par le MPTP qui montrent toutes une forte expression d'ICAM1 dans la SN lésée (Kurkowska-Jastrzebska et coll., 1999a ; Imamura et coll., 2003 ; Miklossy et coll., 2006 ; Brochard et coll., 2009). Nous pouvons faire l'hypothèse que la dissection de l'ensemble du mésencéphale ventral comme effectué au cours de nos analyses, au sein duquel la SNpc ne représente qu'une partie du tissu, a pu masquer des différences d'expression faible. L'utilisation de la technique de microdissection laser de la SNpc pourrait ainsi permettre d'effectuer une analyse ciblée sur cette région et augmenter ainsi la sensibilité de détection d'éventuelles modifications d'expression des molécules d'adhésion.

En conclusion, si le blocage de plusieurs récepteurs aux chimiokines à des fins thérapeutiques pourrait être difficile à mettre en œuvre dans le contexte d'une maladie chronique telle que la MP, l'action combinée sur le réseau chimiokinique et les molécules d'adhésion pourrait en revanche limiter le nombre de candidats ciblés dans chacune de ces familles de molécules et se révéler au final plus efficace, sous réserve bien entendu que ces traitements ne soient pas associés à des effets secondaires majeurs pour le patient.

Abe, T., Isobe, C., Murata, T., Sato, C., and Tohgi, H. (2003). Alteration of 8-hydroxyguanosine concentrations in the cerebrospinal fluid and serum from patients with Parkinson's disease. *Neuroscience letters 336*, 105-108.

Acosta-Rodriguez, E.V., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., and Napolitani, G. (2007). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nature immunology 8*, 639-646.

Ahn, T.B., Kim, S.Y., Kim, J.Y., Park, S.S., Lee, D.S., Min, H.J., Kim, Y.K., Kim, S.E., Kim, J.M., Kim, H.J*., et al.* (2008). alpha-Synuclein gene duplication is present in sporadic Parkinson disease. *Neurology 70*, 43-49.

Ajami, B., Bennett, J.L., Krieger, C., Tetzlaff, W., and Rossi, F.M. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nature neuroscience 10*, 1538-1543.

Ajuebor, M.N., Hogaboam, C.M., Kunkel, S.L., Proudfoot, A.E., and Wallace, J.L. (2001). The chemokine RANTES is a crucial mediator of the progression from acute to chronic colitis in the rat. *Journal of immunology 166*, 552-558.

Ajuebor, M.N., Wondimu, Z., Hogaboam, C.M., Le, T., Proudfoot, A.E., and Swain, M.G. (2007). CCR5 deficiency drives enhanced natural killer cell trafficking to and activation within the liver in murine T cell-mediated hepatitis. *The American journal of pathology 170*, 1975-1988.

Akundi, R.S., Huang, Z., Eason, J., Pandya, J.D., Zhi, L., Cass, W.A., Sullivan, P.G., and Bueler, H. (2011). Increased mitochondrial calcium sensitivity and abnormal expression of innate immunity genes precede dopaminergic defects in Pink1-deficient mice. *PloS one 6*, e16038.

Alam, Z.I., Daniel, S.E., Lees, A.J., Marsden, D.C., Jenner, P., and Halliwell, B. (1997a). A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease. *Journal of neurochemistry 69*, 1326-1329.

Alam, Z.I., Jenner, A., Daniel, S.E., Lees, A.J., Cairns, N., Marsden, C.D., Jenner, P., and Halliwell, B. (1997b). Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *Journal of neurochemistry 69*, 1196-1203.

Alvarez-Erviti, L., Rodriguez-Oroz, M.C., Cooper, J.M., Caballero, C., Ferrer, I., Obeso, J.A., and Schapira, A.H. (2010). Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. *Archives of neurology 67*, 1464-1472.

Alvarez-Fischer, D., Guerreiro, S., Hunot, S., Saurini, F., Marien, M., Sokoloff, P., Hirsch, E.C., Hartmann, A., and Michel, P.P. (2008). Modelling Parkinson-like neurodegeneration via osmotic minipump delivery of MPTP and probenecid. *Journal of neurochemistry 107*, 701-711.

Ambani, L.M., Van Woert, M.H., and Murphy, S. (1975). Brain peroxidase and catalase in Parkinson disease. *Archives of neurology 32*, 114-118.

Andres-Mateos, E., Perier, C., Zhang, L., Blanchard-Fillion, B., Greco, T.M., Thomas, B., Ko, H.S., Sasaki, M., Ischiropoulos, H., Przedborski, S*., et al.* (2007). DJ-1 gene deletion reveals that DJ-1 is an atypical peroxiredoxin-like peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104*, 14807-14812.

Anglade, P., Vyas, S., Hirsch, E.C., and Agid, Y. (1997a). Apoptosis in dopaminergic neurons of the human substantia nigra during normal aging. *Histology and histopathology 12*, 603-610.

Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M.T., Michel, P.P., Marquez, J., Mouatt-Prigent, A., Ruberg, M., Hirsch, E.C., and Agid, Y. (1997b). Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histology and histopathology 12*, 25-31.

Appel, S.H., Beers, D.R., and Henkel, J.S. (2010). T cell-microglial dialogue in Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis: are we listening? *Trends in immunology 31*, 7-17.

Argaw, A.T., Gurfein, B.T., Zhang, Y., Zameer, A., and John, G.R. (2009). VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106*, 1977-1982.

Artis, D., Humphreys, N.E., Potten, C.S., Wagner, N., Muller, W., McDermott, J.R., Grencis, R.K., and Else, K.J. (2000). Beta7 integrin-deficient mice: delayed leukocyte recruitment and attenuated protective immunity in the small intestine during enteric helminth infection. *European journal of immunology 30*, 1656-1664.

Ascherio, A., and Chen, H. (2003). Caffeinated clues from epidemiology of Parkinson's disease. *Neurology 61*, S51-54.

Asensio, V.C., Maier, J., Milner, R., Boztug, K., Kincaid, C., Moulard, M., Phillipson, C., Lindsley, K., Krucker, T., Fox, H.S., and Campbell, I.L. (2001). Interferon-independent, human immunodeficiency virus type 1 gp120-mediated induction of CXCL10/IP-10 gene expression by astrocytes in vivo and in vitro. *Journal of virology 75*, 7067-7077.

Asseman, C., Mauze, S., Leach, M.W., Coffman, R.L., and Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine 190*, 995-1004.

Asseman, C., Read, S., and Powrie, F. (2003). Colitogenic Th1 cells are present in the antigen-experienced T cell pool in normal mice: control by CD4+ regulatory T cells and IL-10. *Journal of immunology 171*, 971-978.

Baba, Y., Kuroiwa, A., Uitti, R.J., Wszolek, Z.K., and Yamada, T. (2005). Alterations of T-lymphocyte populations in Parkinson disease. *Parkinsonism & related disorders 11*, 493-498.

Babior, B.M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood 93*, 1464-1476.

Baggiolini, M. (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature 392*, 565-568.

Bajetto, A., Bonavia, R., Barbero, S., and Schettini, G. (2002). Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications. *Journal of neurochemistry 82*, 1311-1329.

Balashov, K.E., Rottman, J.B., Weiner, H.L., and Hancock, W.W. (1999). CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96*, 6873-6878.

Banati, R.B., Daniel, S.E., and Blunt, S.B. (1998). Glial pathology but absence of apoptotic nigral neurons in long-standing Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 13*, 221-227.

Bandyopadhyay, S., Jeong, K.H., Hansen, J.T., Vassilev, P.M., Brown, E.M., and Chattopadhyay, N. (2007). Calcium-sensing receptor stimulates secretion of an interferon-gamma-induced monokine (CXCL10) and monocyte chemoattractant protein-3 in immortalized GnRH neurons. *Journal of neuroscience research 85*, 882-895.

Barcia, C., Sanchez Bahillo, A., Fernandez-Villalba, E., Bautista, V., Poza, Y.P.M., Fernandez-Barreiro, A., Hirsch, E.C., and Herrero, M.T. (2004). Evidence of active microglia in substantia nigra pars compacta of parkinsonian monkeys 1 year after MPTP exposure. *Glia 46*, 402-409.

Barres, B.A. (2008). The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron 60*, 430-440.

Barrientos, A., and Moraes, C.T. (1999). Titrating the effects of mitochondrial complex

I impairment in the cell physiology. *The Journal of biological chemistry 274*, 16188-16197.

Bas, J., Calopa, M., Mestre, M., Mollevi, D.G., Cutillas, B., Ambrosio, S., and Buendia, E. (2001). Lymphocyte populations in Parkinson's disease and in rat models of parkinsonism. *Journal of neuroimmunology 113*, 146-152.

Bazzoni, G., and Hemler, M.E. (1998). Are changes in integrin affinity and conformation overemphasized? *Trends in biochemical sciences 23*, 30-34.

Bechmann, I., Galea, I., and Perry, V.H. (2007). What is the blood-brain barrier (not)? *Trends in immunology 28*, 5-11.

Bender, A., Krishnan, K.J., Morris, C.M., Taylor, G.A., Reeve, A.K., Perry, R.H., Jaros, E., Hersheson, J.S., Betts, J., Klopstock, T.*, et al.* (2006). High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nature genetics 38*, 515-517.

Benelli, R., Lorusso, G., Albini, A., and Noonan, D.M. (2006). Cytokines and chemokines as regulators of angiogenesis in health and disease. *Current pharmaceutical design 12*, 3101-3115.

Benner, E.J., Banerjee, R., Reynolds, A.D., Sherman, S., Pisarev, V.M., Tsiperson, V., Nemachek, C., Ciborowski, P., Przedborski, S., Mosley, R.L., and Gendelman, H.E. (2008). Nitrated alpha-synuclein immunity accelerates degeneration of nigral dopaminergic neurons. *PloS one 3*, e1376.

Benner, E.J., Mosley, R.L., Destache, C.J., Lewis, T.B., Jackson-Lewis, V., Gorantla, S., Nemachek, C., Green, S.R., Przedborski, S., and Gendelman, H.E. (2004). Therapeutic immunization protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101*, 9435-9440.

Berg, D., Godau, J., and Walter, U. (2008). Transcranial sonography in movement disorders. *Lancet neurology 7*, 1044-1055.

Berg, D., Schweitzer, K.J., Leitner, P., Zimprich, A., Lichtner, P., Belcredi, P., Brussel, T., Schulte, C., Maass, S., Nagele, T.*, et al.* (2005). Type and frequency of mutations in the LRRK2 gene in familial and sporadic Parkinson's disease*. *Brain : a journal of neurology 128*, 3000-3011.

Bergman, H., Wichmann, T., and DeLong, M.R. (1990). Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science 249*, 1436-1438.

Berry, C., La Vecchia, C., and Nicotera, P. (2010). Paraquat and Parkinson's disease. *Cell death and differentiation 17*, 1115-1125.

Bertollini, C., Ragozzino, D., Gross, C., Limatola, C., and Eusebi, F. (2006). Fractalkine/CX3CL1 depresses central synaptic transmission in mouse hippocampal slices. *Neuropharmacology 51*, 816-821.

Bertrand, E., Lechowicz, W., Szpak, G.M., and Dymecki, J. (1997). Qualitative and quantitative analysis of locus coeruleus neurons in Parkinson's disease. *Folia neuropathologica / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences 35*, 80-86.

Betarbet, R., Sherer, T.B., and Greenamyre, J.T. (2002). Animal models of Parkinson's disease. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology 24*, 308-318.

Betarbet, R., Sherer, T.B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V., and Greenamyre, J.T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature neuroscience 3*, 1301-1306.

Bezard, E., Imbert, C., Deloire, X., Bioulac, B., and Gross, C.E. (1997). A chronic MPTP model reproducing the slow evolution of Parkinson's

disease: evolution of motor symptoms in the monkey. *Brain research 766*, 107-112.

Bianchi, R., Kastrisianaki, E., Giambanco, I., and Donato, R. (2011). S100B protein stimulates microglia migration via RAGE-dependent up-regulation of chemokine expression and release. *The Journal of biological chemistry 286*, 7214-7226.

Blanchet, P.J., Konitsiotis, S., Hyland, K., Arnold, L.A., Pettigrew, K.D., and Chase, T.N. (1998). Chronic exposure to MPTP as a primate model of progressive parkinsonism: a pilot study with a free radical scavenger. *Experimental neurology 153*, 214-222.

Block, M.L., Zecca, L., and Hong, J.S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature reviews. Neuroscience 8*, 57-69.

Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M., Benabid, A.L., Sadoul, R., and Verna, J.M. (2001). Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology 65*, 135-172.

Boka, G., Anglade, P., Wallach, D., Javoy-Agid, F., Agid, Y., and Hirsch, E.C. (1994). Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neuroscience letters 172*, 151-154.

Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P.P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P.A., Mantovani, A., and Sinigaglia, F. (1998). Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *The Journal of experimental medicine 187*, 129-134.

Bonilla, F.A., and Oettgen, H.C. (2010). Adaptive immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology 125*, S33-40.

Bove, J., Zhou, C., Jackson-Lewis, V., Taylor, J., Chu, Y., Rideout, H.J., Wu, D.C., Kordower, J.H., Petrucelli, L., and Przedborski, S. (2006). Proteasome inhibition and Parkinson's disease modeling. *Annals of neurology 60*, 260-264.

Bower, J.H., Maraganore, D.M., Peterson, B.J., Ahlskog, J.E., and Rocca, W.A. (2006). Immunologic diseases, anti-inflammatory drugs, and Parkinson disease: a case-control study. *Neurology 67*, 494-496.

Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R.A., Jansen Steur, E.N., and Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of aging 24*, 197-211.

Brambilla, R., Bracchi-Ricard, V., Hu, W.H., Frydel, B., Bramwell, A., Karmally, S., Green, E.J., and Bethea, J.R. (2005). Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *The Journal of experimental medicine 202*, 145-156.

Brambilla, R., Persaud, T., Hu, X., Karmally, S., Shestopalov, V.I., Dvoriantchikova, G., Ivanov, D., Nathanson, L., Barnum, S.R., and Bethea, J.R. (2009). Transgenic inhibition of astroglial NF-kappa B improves functional outcome in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing chronic central nervous system inflammation. *Journal of immunology 182*, 2628-2640.

Braungart, E., Gerlach, M., Riederer, P., Baumeister, R., and Hoener, M.C. (2004). Caenorhabditis elegans MPP+ model of Parkinson's disease for high-throughput drug screenings. *Neuro-degenerative diseases 1*, 175-183.

Breidert, T., Callebert, J., Heneka, M.T., Landreth, G., Launay, J.M., and Hirsch, E.C. (2002). Protective action of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone in a mouse model of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry 82*, 615-624.

Brochard, V. (2008). Etude de l'infiltration lymphocytaire dans les syndromes parkinsoniens (Université Paris Diderot).

Brochard, V., Combadiere, B., Prigent, A., Laouar, Y., Perrin, A., Beray-Berthat, V., Bonduelle, O., Alvarez-Fischer, D., Callebert, J., Launay, J.M*., et al.* (2009). Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *The Journal of clinical investigation 119*, 182-192.

Brooks, A.I., Chadwick, C.A., Gelbard, H.A., Cory-Slechta, D.A., and Federoff, H.J. (1999). Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain research 823*, 1-10.

Buchman, A.S., Shulman, J.M., Nag, S., Leurgans, S.E., Arnold, S.E., Morris, M.C., Schneider, J.A., and Bennett, D.A. (2012). Nigral pathology and parkinsonian signs in elders without Parkinson disease. *Annals of neurology 71*, 258-266.

Buhmann, C., Arlt, S., Kontush, A., Moller-Bertram, T., Sperber, S., Oechsner, M., Stuerenburg, H.J., and Beisiegel, U. (2004). Plasma and CSF markers of oxidative stress are increased in Parkinson's disease and influenced by antiparkinsonian medication. *Neurobiology of disease 15*, 160-170.

Burke, R.E. (2008). Programmed cell death and new discoveries in the genetics of parkinsonism. *Journal of neurochemistry 104*, 875-890.

Bush, T.G., Puvanachandra, N., Horner, C.H., Polito, A., Ostenfeld, T., Svendsen, C.N., Mucke, L., Johnson, M.H., and Sofroniew, M.V. (1999). Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron 23*, 297-308.

Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z., and Ellisman, M.H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 22*, 183-192.

Campanella, G.S., Tager, A.M., El Khoury, J.K., Thomas, S.Y., Abrazinski, T.A., Manice, L.A., Colvin, R.A., and Luster, A.D. (2008). Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105*, 4814-4819.

Campbell, J.J., Pan, J., and Butcher, E.C. (1999). Cutting edge: developmental switches in chemokine responses during T cell maturation. *Journal of immunology 163*, 2353-2357.

Cannon, J.R., Tapias, V., Na, H.M., Honick, A.S., Drolet, R.E., and Greenamyre, J.T. (2009). A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease 34*, 279-290.

Cardona, A.E., Pioro, E.P., Sasse, M.E., Kostenko, V., Cardona, S.M., Dijkstra, I.M., Huang, D., Kidd, G., Dombrowski, S., Dutta, R*., et al.* (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature neuroscience 9*, 917-924.

Cardona, A.E., Sasse, M.E., Liu, L., Cardona, S.M., Mizutani, M., Savarin, C., Hu, T., and Ransohoff, R.M. (2008). Scavenging roles of chemokine receptors: chemokine receptor deficiency is associated with increased levels of ligand in circulation and tissues. *Blood 112*, 256-263.

Carlson, T., Kroenke, M., Rao, P., Lane, T.E., and Segal, B. (2008). The Th17-ELR+ CXC chemokine pathway is essential for the development of central nervous system autoimmune disease. *The Journal of experimental medicine 205*, 811-823.

Carman, C.V., and Springer, T.A. (2003). Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Current opinion in cell biology 15*, 547-556.

Carrithers, M.D., Visintin, I., Viret, C., and Janeway, C.S., Jr. (2002). Role of genetic background in P selectin-dependent immune surveillance of the central nervous system. *Journal of neuroimmunology 129*, 51-57.

Carvey, P.M., McRae, A., Lint, T.F., Ptak, L.R., Lo, E.S., Goetz, C.G., and Klawans, H.L. (1991). The potential use of a dopamine neuron antibody and a striatal-derived neurotrophic factor as diagnostic markers in Parkinson's disease. *Neurology 41*, 53-58; discussion 59-60.

Casals, J., Elizan, T.S., and Yahr, M.D. (1998). Postencephalitic parkinsonism--a review. *Journal of neural transmission 105*, 645-676.

Casrouge, A., Decalf, J., Ahloulay, M., Lababidi, C., Mansour, H., Vallet-Pichard, A., Mallet, V., Mottez, E., Mapes, J., Fontanet, A.*, et al.* (2011). Evidence for an antagonist form of the chemokine CXCL10 in patients chronically infected with HCV. *The Journal of clinical investigation 121*, 308-317.

Catalfamo, M., Karpova, T., McNally, J., Costes, S.V., Lockett, S.J., Bos, E., Peters, P.J., and Henkart, P.A. (2004). Human CD8+ T cells store RANTES in a unique secretory compartment and release it rapidly after TcR stimulation. *Immunity 20*, 219-230.

Chartier-Harlin, M.C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., Levecque, C., Larvor, L., Andrieux, J., Hulihan, M.*, et al.* (2004). Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet 364*, 1167-1169.

Che, X., Ye, W., Panga, L., Wu, D.C., and Yang, G.Y. (2001). Monocyte chemoattractant protein-1 expressed in neurons and astrocytes during focal ischemia in mice. *Brain research 902*, 171-177.

Chen, H., Jacobs, E., Schwarzschild, M.A., McCullough, M.L., Calle, E.E., Thun, M.J., and Ascherio, A. (2005). Nonsteroidal antiinflammatory drug use and the risk for Parkinson's disease. *Annals of neurology 58*, 963-967.

Chen, H., O'Reilly, E.J., Schwarzschild, M.A., and Ascherio, A. (2008). Peripheral inflammatory biomarkers and risk of Parkinson's disease. *American journal of epidemiology 167*, 90-95.

Chen, H., Zhang, S.M., Hernan, M.A., Schwarzschild, M.A., Willett, W.C., Colditz, G.A., Speizer, F.E., and Ascherio, A. (2003). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Archives of neurology 60*, 1059-1064.

Chen, S., Le, W.D., Xie, W.J., Alexianu, M.E., Engelhardt, J.I., Siklos, L., and Appel, S.H. (1998). Experimental destruction of substantia nigra initiated by Parkinson disease immunoglobulins. *Archives of neurology 55*, 1075-1080.

Chen, Y., Vartiainen, N.E., Ying, W., Chan, P.H., Koistinaho, J., and Swanson, R.A. (2001). Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by a glutathione-dependent mechanism. *Journal of neurochemistry 77*, 1601-1610.

Chesselet, M.F., and Richter, F. (2011). Modelling of Parkinson's disease in mice. *Lancet neurology 10*, 1108-1118.

Chiba, S., Matsumoto, H., Saitoh, M., Kasahara, M., Matsuya, M., and Kashiwagi, M. (1995). A correlation study between serum adenosine deaminase activities and peripheral lymphocyte subsets in Parkinson's disease. *Journal of the neurological sciences 132*, 170-173.

Chiueh, C.C., Markey, S.P., Burns, R.S., Johannessen, J.N., Pert, A., and Kopin, I.J. (1984). Neurochemical and behavioral effects of systemic and intranigral administration of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the rat. *European journal of pharmacology 100*, 189-194.

Cicchetti, F., Drouin-Ouellet, J., and Gross, R.E. (2009). Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? *Trends in pharmacological sciences 30*, 475-483.

Cipolla, M.J. (2009). In The Cerebral Circulation (San Rafael (CA)).

Claveria, L.E., Duarte, J., Sevillano, M.D., Perez-Sempere, A., Cabezas, C., Rodriguez, F.,

and de Pedro-Cuesta, J. (2002). Prevalence of Parkinson's disease in Cantalejo, Spain: a door-to-door survey. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 17*, 242-249.

Cocchi, F., DeVico, A.L., Garzino-Demo, A., Arya, S.K., Gallo, R.C., and Lusso, P. (1995). Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science 270*, 1811-1815.

Constantin, G. (2008). Chemokine signaling and integrin activation in lymphocyte migration into the inflamed brain. *Journal of neuroimmunology 198*, 20-26.

Constantin, G., Majeed, M., Giagulli, C., Piccio, L., Kim, J.Y., Butcher, E.C., and Laudanna, C. (2000). Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity 13*, 759-769.

Corti, O., Lesage, S., and Brice, A. (2011). What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiological reviews 91*, 1161-1218.

Coughlan, C.M., McManus, C.M., Sharron, M., Gao, Z., Murphy, D., Jaffer, S., Choe, W., Chen, W., Hesselgesser, J., Gaylord, H.*, et al.* (2000). Expression of multiple functional chemokine receptors and monocyte chemoattractant protein-1 in human neurons. *Neuroscience 97*, 591-600.

Croisier, E., Moran, L.B., Dexter, D.T., Pearce, R.K., and Graeber, M.B. (2005). Microglial inflammation in the parkinsonian substantia nigra: relationship to alpha-synuclein deposition. *Journal of neuroinflammation 2*, 14.

Cui, M., Aras, R., Christian, W.V., Rappold, P.M., Hatwar, M., Panza, J., Jackson-Lewis, V., Javitch, J.A., Ballatori, N., Przedborski, S., and Tieu, K. (2009). The organic cation transporter-3 is a pivotal modulator of neurodegeneration in the nigrostriatal dopaminergic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106*, 8043-8048.

Damier, P., Hirsch, E.C., Agid, Y., and Graybiel, A.M. (1999). The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology 122 (Pt 8)*, 1437-1448.

Damier, P., Hirsch, E.C., Zhang, P., Agid, Y., and Javoy-Agid, F. (1993). Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience 52*, 1-6.

Danzer, K.M., Haasen, D., Karow, A.R., Moussaud, S., Habeck, M., Giese, A., Kretzschmar, H., Hengerer, B., and Kostka, M. (2007). Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 27*, 9220-9232.

Danzer, K.M., Krebs, S.K., Wolff, M., Birk, G., and Hengerer, B. (2009). Seeding induced by alpha-synuclein oligomers provides evidence for spreading of alpha-synuclein pathology. *Journal of neurochemistry 111*, 192-203.

Dauer, W., Kholodilov, N., Vila, M., Trillat, A.C., Goodchild, R., Larsen, K.E., Staal, R., Tieu, K., Schmitz, Y., Yuan, C.A.*, et al.* (2002). Resistance of alpha -synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99*, 14524-14529.

Dauer, W., and Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron 39*, 889-909.

Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., and Gan, W.B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature neuroscience 8*, 752-758.

de Jong, E.K., Dijkstra, I.M., Hensens, M., Brouwer, N., van Amerongen, M., Liem, R.S., Boddeke, H.W., and Biber, K. (2005). Vesicle-mediated transport and release of CCL21 in

endangered neurons: a possible explanation for microglia activation remote from a primary lesion. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 25*, 7548-7557.

de Jong, E.K., Vinet, J., Stanulovic, V.S., Meijer, M., Wesseling, E., Sjollema, K., Boddeke, H.W., and Biber, K. (2008). Expression, transport, and axonal sorting of neuronal CCL21 in large dense-core vesicles. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 22*, 4136-4145.

de Lau, L.M., and Breteler, M.M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet neurology 5*, 525-535.

de Rijk, M.C., Breteler, M.M., Graveland, G.A., Ott, A., Grobbee, D.E., van der Meche, F.G., and Hofman, A. (1995). Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: the Rotterdam Study. *Neurology 45*, 2143-2146.

Deas, E., Plun-Favreau, H., and Wood, N.W. (2009). PINK1 function in health and disease. *EMBO molecular medicine 1*, 152-165.

Dehay, B., Bove, J., Rodriguez-Muela, N., Perier, C., Recasens, A., Boya, P., and Vila, M. (2010). Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 30*, 12535-12544.

Dehmer, T., Heneka, M.T., Sastre, M., Dichgans, J., and Schulz, J.B. (2004). Protection by pioglitazone in the MPTP model of Parkinson's disease correlates with I kappa B alpha induction and block of NF kappa B and iNOS activation. *Journal of neurochemistry 88*, 494-501.

Dexter, D.T., Carter, C.J., Wells, F.R., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Lees, A., Jenner, P., and Marsden, C.D. (1989). Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry 52*, 381-389.

Di Fonzo, A., Tassorelli, C., De Mari, M., Chien, H.F., Ferreira, J., Rohe, C.F., Riboldazzi, G., Antonini, A., Albani, G., Mauro, A.*, et al.* (2006). Comprehensive analysis of the LRRK2 gene in sixty families with Parkinson's disease. *European journal of human genetics : EJHG 14*, 322-331.

Dickson, D.W., Braak, H., Duda, J.E., Duyckaerts, C., Gasser, T., Halliday, G.M., Hardy, J., Leverenz, J.B., Del Tredici, K., Wszolek, Z.K., and Litvan, I. (2009). Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet neurology 8*, 1150-1157.

Diedrichs-Mohring, M., Nelson, P.J., Proudfoot, A.E., Thurau, S.R., and Wildner, G. (2005). The effect of the CC chemokine receptor antagonist Met-RANTES on experimental autoimmune uveitis and oral tolerance. *Journal of neuroimmunology 164*, 22-30.

Dong, Z., Ferger, B., Feldon, J., and Bueler, H. (2002). Overexpression of Parkinson's disease-associated alpha-synucleinA53T by recombinant adeno-associated virus in mice does not increase the vulnerability of dopaminergic neurons to MPTP. *Journal of neurobiology 53*, 1-10.

dos Santos, A.C., Barsante, M.M., Arantes, R.M., Bernard, C.C., Teixeira, M.M., and Carvalho-Tavares, J. (2005). CCL2 and CCL5 mediate leukocyte adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis--an intravital microscopy study. *Journal of neuroimmunology 162*, 122-129.

Douhou, A., Troadec, J.D., Ruberg, M., Raisman-Vozari, R., and Michel, P.P. (2001). Survival promotion of mesencephalic dopaminergic neurons by depolarizing concentrations of K+ requires concurrent inactivation of NMDA or AMPA/kainate receptors. *Journal of neurochemistry 78*, 163-174.

Drolet, R.E., Behrouz, B., Lookingland, K.J., and Goudreau, J.L. (2004). Mice lacking alpha-synuclein have an attenuated loss of striatal

dopamine following prolonged chronic MPTP administration. *Neurotoxicology 25*, 761-769.

Du, Y., Ma, Z., Lin, S., Dodel, R.C., Gao, F., Bales, K.R., Triarhou, L.C., Chernet, E., Perry, K.W., Nelson, D.L.*, et al.* (2001). Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98*, 14669-14674.

Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., Van De Putte, L.B., and Lipsky, P.E. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 12*, 1063-1073.

Dustin, M.L., and Springer, T.A. (1989). T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature 341*, 619-624.

Ehringer, H., and Hornykiewicz, O. (1960). [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klinische Wochenschrift 38*, 1236-1239.

Ekstrand, M.I., Terzioglu, M., Galter, D., Zhu, S., Hofstetter, C., Lindqvist, E., Thams, S., Bergstrand, A., Hansson, F.S., Trifunovic, A.*, et al.* (2007). Progressive parkinsonism in mice with respiratory-chain-deficient dopamine neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104*, 1325-1330.

Engelhardt, B., and Kappos, L. (2008). Natalizumab: targeting alpha4-integrins in multiple sclerosis. *Neuro-degenerative diseases 5*, 16-22.

Engelhardt, B., and Ransohoff, R.M. (2005). The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends in immunology 26*, 485-495.

Errea, J.M., Ara, J.R., Aibar, C., and de Pedro-Cuesta, J. (1999). Prevalence of Parkinson's disease in lower Aragon, Spain. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 14*, 596-604.

Fabre, E., Monserrat, J., Herrero, A., Barja, G., and Leret, M.L. (1999). Effect of MPTP on brain mitochondrial H2O2 and ATP production and on dopamine and DOPAC in the striatum. *Journal of physiology and biochemistry 55*, 325-331.

Fearnley, J.M., and Lees, A.J. (1991). Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain : a journal of neurology 114 (Pt 5)*, 2283-2301.

Fernagut, P.O., Hutson, C.B., Fleming, S.M., Tetreaut, N.A., Salcedo, J., Masliah, E., and Chesselet, M.F. (2007). Behavioral and histopathological consequences of paraquat intoxication in mice: effects of alpha-synuclein over-expression. *Synapse 61*, 991-1001.

Fernandez, E.J., and Lolis, E. (2002). Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annual review of pharmacology and toxicology 42*, 469-499.

Ferrer, I., Blanco, R., Cutillas, B., and Ambrosio, S. (2000). Fas and Fas-L expression in Huntington's disease and Parkinson's disease. *Neuropathology and applied neurobiology 26*, 424-433.

Fife, B.T., Kennedy, K.J., Paniagua, M.C., Lukacs, N.W., Kunkel, S.L., Luster, A.D., and Karpus, W.J. (2001). CXCL10 (IFN-gamma-inducible protein-10) control of encephalitogenic CD4+ T cell accumulation in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology 166*, 7617-7624.

Fink, A.L. (2006). The aggregation and fibrillation of alpha-synuclein. *Accounts of chemical research 39*, 628-634.

Fleige, S., Walf, V., Huch, S., Prgomet, C., Sehm, J., and Pfaffl, M.W. (2006). Comparison of relative mRNA quantification models and

the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnology letters 28*, 1601-1613.

Floor, E., and Wetzel, M.G. (1998). Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. *Journal of neurochemistry 70*, 268-275.

Fornai, F., Schluter, O.M., Lenzi, P., Gesi, M., Ruffoli, R., Ferrucci, M., Lazzeri, G., Busceti, C.L., Pontarelli, F., Battaglia, G.*, et al.* (2005). Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102*, 3413-3418.

Forno, L.S., Langston, J.W., DeLanney, L.E., Irwin, I., and Ricaurte, G.A. (1986). Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. *Annals of neurology 20*, 449-455.

Forster, R., Mattis, A.E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G., and Lipp, M. (1996). A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell 87*, 1037-1047.

Furukawa, Y., Vigouroux, S., Wong, H., Guttman, M., Rajput, A.H., Ang, L., Briand, M., Kish, S.J., and Briand, Y. (2002). Brain proteasomal function in sporadic Parkinson's disease and related disorders. *Annals of neurology 51*, 779-782.

Gaig, C., and Tolosa, E. (2009). When does Parkinson's disease begin? *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 24 Suppl 2*, S656-664.

Gainetdinov, R.R., Fumagalli, F., Jones, S.R., and Caron, M.G. (1997). Dopamine transporter is required for in vivo MPTP neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter. *Journal of neurochemistry 69*, 1322-1325.

Gandhi, S., Wood-Kaczmar, A., Yao, Z., Plun-Favreau, H., Deas, E., Klupsch, K., Downward, J., Latchman, D.S., Tabrizi, S.J., Wood, N.W.*, et al.* (2009). PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death. *Molecular cell 33*, 627-638.

Gangemi, S., Basile, G., Merendino, R.A., Epifanio, A., Di Pasquale, G., Ferlazzo, B., Nicita-Mauro, V., and Morgante, L. (2003). Effect of levodopa on interleukin-15 and RANTES circulating levels in patients affected by Parkinson's disease. *Mediators of inflammation 12*, 251-253.

Gao, H.M., Liu, B., Zhang, W., and Hong, J.S. (2003). Critical role of microglial NADPH oxidase-derived free radicals in the in vitro MPTP model of Parkinson's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 17*, 1954-1956.

Gao, X., Chen, H., Schwarzschild, M.A., and Ascherio, A. (2011). Use of ibuprofen and risk of Parkinson disease. *Neurology 76*, 863-869.

Gaupp, S., Pitt, D., Kuziel, W.A., Cannella, B., and Raine, C.S. (2003). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in CCR2(-/-) mice: susceptibility in multiple strains. *The American journal of pathology 162*, 139-150.

Gaut, J.P., Byun, J., Tran, H.D., Lauber, W.M., Carroll, J.A., Hotchkiss, R.S., Belaaouaj, A., and Heinecke, J.W. (2002). Myeloperoxidase produces nitrating oxidants in vivo. *The Journal of clinical investigation 109*, 1311-1319.

Gautier, C.A., Kitada, T., and Shen, J. (2008). Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105*, 11364-11369.

Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two

principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity 19*, 71-82.

Gerfen, C.R., Herkenham, M., and Thibault, J. (1987). The neostriatal mosaic: II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 7*, 3915-3934.

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

German, D.C., Manaye, K., Smith, W.K., Woodward, D.J., and Saper, C.B. (1989). Midbrain dopaminergic cell loss in Parkinson's disease: computer visualization. *Annals of neurology 26*, 507-514.

German, D.C., Nelson, E.L., Liang, C.L., Speciale, S.G., Sinton, C.M., and Sonsalla, P.K. (1996). The neurotoxin MPTP causes degeneration of specific nucleus A8, A9 and A10 dopaminergic neurons in the mouse. *Neurodegeneration : a journal for neurodegenerative disorders, neuroprotection, and neuroregeneration 5*, 299-312.

Ghosh, S., Goldin, E., Gordon, F.H., Malchow, H.A., Rask-Madsen, J., Rutgeerts, P., Vyhnalek, P., Zadorova, Z., Palmer, T., Donoghue, S., and Natalizumab Pan-European Study, G. (2003). Natalizumab for active Crohn's disease. *The New England journal of medicine 348*, 24-32.

Giasson, B.I., Duda, J.E., Murray, I.V., Chen, Q., Souza, J.M., Hurtig, H.I., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2000). Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science 290*, 985-989.

Glass, C.K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M.C., and Gage, F.H. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell 140*, 918-934.

Godiska, R., Chantry, D., Dietsch, G.N., and Gray, P.W. (1995). Chemokine expression in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology 58*, 167-176.

Golbe, L.I., Di Iorio, G., Bonavita, V., Miller, D.C., and Duvoisin, R.C. (1990). A large kindred with autosomal dominant Parkinson's disease. *Annals of neurology 27*, 276-282.

Goldberg, M.S., Fleming, S.M., Palacino, J.J., Cepeda, C., Lam, H.A., Bhatnagar, A., Meloni, E.G., Wu, N., Ackerson, L.C., Klapstein, G.J*., et al.* (2003). Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *The Journal of biological chemistry 278*, 43628-43635.

Goldberg, M.S., Pisani, A., Haburcak, M., Vortherms, T.A., Kitada, T., Costa, C., Tong, Y., Martella, G., Tscherter, A., Martins, A*., et al.* (2005). Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ-1. *Neuron 45*, 489-496.

Goldberg, S.H., van der Meer, P., Hesselgesser, J., Jaffer, S., Kolson, D.L., Albright, A.V., Gonzalez-Scarano, F., and Lavi, E. (2001). CXCR3 expression in human central nervous system diseases. *Neuropathology and applied neurobiology 27*, 127-138.

Gonon, F.G., and Buda, M.J. (1985). Regulation of dopamine release by impulse flow and by autoreceptors as studied by in vivo voltammetry in the rat striatum. *Neuroscience 14*, 765-774.

Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews. Immunology 5*, 953-964.

Gourmala, N.G., Limonta, S., Bochelen, D., Sauter, A., and Boddeke, H.W. (1999). Localization of macrophage inflammatory protein: macrophage inflammatory protein-1 expression in rat brain after peripheral administration of lipopolysaccharide and focal cerebral ischemia. *Neuroscience 88*, 1255-1266.

Greenamyre, J.T., Cannon, J.R., Drolet, R., and Mastroberardino, P.G. (2010). Lessons from the rotenone model of Parkinson's disease. *Trends in pharmacological sciences 31*, 141-142; author reply 142-143.

Greene, J.G., Noorian, A.R., and Srinivasan, S. (2009). Delayed gastric emptying and enteric nervous system dysfunction in the rotenone model of Parkinson's disease. *Experimental neurology 218*, 154-161.

Gris, D., Ye, Z., Iocca, H.A., Wen, H., Craven, R.R., Gris, P., Huang, M., Schneider, M., Miller, S.D., and Ting, J.P. (2010). NLRP3 plays a critical role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by mediating Th1 and Th17 responses. *Journal of immunology 185*, 974-981.

Grone, H.J., Weber, C., Weber, K.S., Grone, E.F., Rabelink, T., Klier, C.M., Wells, T.N., Proudfood, A.E., Schlondorff, D., and Nelson, P.J. (1999). Met-RANTES reduces vascular and tubular damage during acute renal transplant rejection: blocking monocyte arrest and recruitment. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 13*, 1371-1383.

Gupta, M., Gupta, B.K., Thomas, R., Bruemmer, V., Sladek, J.R., Jr., and Felten, D.L. (1986). Aged mice are more sensitive to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine treatment than young adults. *Neuroscience letters 70*, 326-331.

Guttman, M., Fibiger, H.C., Jakubovic, A., and Calne, D.B. (1990). Intracarotid 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration: biochemical and behavioral observations in a primate model of hemiparkinsonism. *Journal of neurochemistry 54*, 1329-1334.

Haas, R.H., Nasirian, F., Nakano, K., Ward, D., Pay, M., Hill, R., and Shults, C.W. (1995). Low platelet mitochondrial complex I and complex II/III activity in early untreated Parkinson's disease. *Annals of neurology 37*, 714-722.

Hafezi-Moghadam, A., Thomas, K.L., Prorock, A.J., Huo, Y., and Ley, K. (2001). L-selectin shedding regulates leukocyte recruitment. *The Journal of experimental medicine 193*, 863-872.

Hahn, S., and Erb, P. (1999). The immunomodulatory role of CD4-positive cytotoxic T-lymphocytes in health and disease. *International reviews of immunology 18*, 449-464.

Halliday, G., Herrero, M.T., Murphy, K., McCann, H., Ros-Bernal, F., Barcia, C., Mori, H., Blesa, F.J., and Obeso, J.A. (2009). No Lewy pathology in monkeys with over 10 years of severe MPTP Parkinsonism. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 24*, 1519-1523.

Hamby, M.E., Hewett, J.A., and Hewett, S.J. (2006). TGF-beta1 potentiates astrocytic nitric oxide production by expanding the population of astrocytes that express NOS-2. *Glia 54*, 566-577.

Hamby, M.E., and Sofroniew, M.V. (2010). Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics 7*, 494-506.

Hampton, M.B., Kettle, A.J., and Winterbourn, C.C. (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood 92*, 3007-3017.

Hamza, T.H., Zabetian, C.P., Tenesa, A., Laederach, A., Montimurro, J., Yearout, D., Kay, D.M., Doheny, K.F., Paschall, J., Pugh, E*., et al.* (2010). Common genetic variation in the HLA region is associated with late-onset sporadic Parkinson's disease. *Nature genetics 42*, 781-785.

Hancock, D.B., Martin, E.R., Stajich, J.M., Jewett, R., Stacy, M.A., Scott, B.L., Vance, J.M., and Scott, W.K. (2007). Smoking, caffeine, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in families with Parkinson disease. *Archives of neurology 64*, 576-580.

Hanisch, U.K. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia 40*, 140-155.

Hanisch, U.K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature neuroscience 10*, 1387-1394.

Hansen, C., Angot, E., Bergstrom, A.L., Steiner, J.A., Pieri, L., Paul, G., Outeiro, T.F., Melki, R., Kallunki, P., Fog, K*., et al.* (2011). alpha-Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. *The Journal of clinical investigation 121*, 715-725.

Hantraye, P., Varastet, M., Peschanski, M., Riche, D., Cesaro, P., Willer, J.C., and Maziere, M. (1993). Stable parkinsonian syndrome and uneven loss of striatal dopamine fibres following chronic MPTP administration in baboons. *Neuroscience 53*, 169-178.

Haque, M.E., Thomas, K.J., D'Souza, C., Callaghan, S., Kitada, T., Slack, R.S., Fraser, P., Cookson, M.R., Tandon, A., and Park, D.S. (2008). Cytoplasmic Pink1 activity protects neurons from dopaminergic neurotoxin MPTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105*, 1716-1721.

Hartmann, A., Hunot, S., Michel, P.P., Muriel, M.P., Vyas, S., Faucheux, B.A., Mouatt-Prigent, A., Turmel, H., Srinivasan, A., Ruberg, M*., et al.* (2000). Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97*, 2875-2880.

Hartmann, A., Mouatt-Prigent, A., Faucheux, B.A., Agid, Y., and Hirsch, E.C. (2002). FADD: A link between TNF family receptors and caspases in Parkinson's disease. *Neurology 58*, 308-310.

Hartmann, A., Troadec, J.D., Hunot, S., Kikly, K., Faucheux, B.A., Mouatt-Prigent, A., Ruberg, M., Agid, Y., and Hirsch, E.C. (2001). Caspase-8 is an effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease, but pathway inhibition results in neuronal necrosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 21*, 2247-2255.

Hasegawa, E., Kang, D., Sakamoto, K., Mitsumoto, A., Nagano, T., Minakami, S., and Takeshige, K. (1997). A dual effect of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)-analogs on the respiratory chain of bovine heart mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics 337*, 69-74.

Hasegawa, E., Takeshige, K., Oishi, T., Murai, Y., and Minakami, S. (1990). 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. *Biochemical and biophysical research communications 170*, 1049-1055.

Hassler, R. (1938). Zur Pathologie der Paralysis agitans und des postenzephalitischen Parkinsonismus. *J. Psychol. Neurol. 48*, 387–476.

Hastings, T.G. (1995). Enzymatic oxidation of dopamine: the role of prostaglandin H synthase. *Journal of neurochemistry 64*, 919-924.

He, Y., Appel, S., and Le, W. (2001). Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain research 909*, 187-193.

Hedrick, S.M. (2008). Thymus lineage commitment: a single switch. *Immunity 28*, 297-299.

Hefti, F., Melamed, E., Sahakian, B.J., and Wurtman, R.J. (1980). Circling behavior in rats with partial, unilateral nigro-striatal lesions: effect of amphetamine, apomorphine, and DOPA. *Pharmacology, biochemistry, and behavior 12*, 185-188.

Herkenham, M., Edley, S.M., and Stuart, J. (1984). Cell clusters in the nucleus accumbens

of the rat, and the mosaic relationship of opiate receptors, acetylcholinesterase and subcortical afferent terminations. *Neuroscience 11*, 561-593.

Hernan, M.A., Logroscino, G., and Garcia Rodriguez, L.A. (2006). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the incidence of Parkinson disease. *Neurology 66*, 1097-1099.

Herz, M., Johns, D., Reviriego, J., Grossman, L.D., Godin, C., Duran, S., Hawkins, F., Lochnan, H., Escobar-Jimenez, F., Hardin, P.A., *et al.* (2003). A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial of the effects of pioglitazone on glycemic control and dyslipidemia in oral antihyperglycemic medication-naive patients with type 2 diabetes mellitus. *Clinical therapeutics 25*, 1074-1095.

Hill-Burns, E.M., Factor, S.A., Zabetian, C.P., Thomson, G., and Payami, H. (2011). Evidence for more than one Parkinson's disease-associated variant within the HLA region. *PloS one 6*, e27109.

Hirai, S. (1968). Histochemical study on the regressive degeneration of the senile brain, with special reference
to the aging of the substantia nigra. *Advances in Neurological Science, Tokyo 12*, 848-849.

Hirsch, E., Graybiel, A.M., and Agid, Y.A. (1988). Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature 334*, 345-348.

Hirsch, E.C., and Hunot, S. (2009). Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet neurology 8*, 382-397.

Hirsch, E.C., Hunot, S., Faucheux, B., Agid, Y., Mizuno, Y., Mochizuki, H., Tatton, W.G., Tatton, N., and Olanow, W.C. (1999). Dopaminergic neurons degenerate by apoptosis in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 14*, 383-385.

Hisanaga, K., Asagi, M., Itoyama, Y., and Iwasaki, Y. (2001). Increase in peripheral CD4 bright+ CD8 dull+ T cells in Parkinson disease. *Archives of neurology 58*, 1580-1583.

Hodara, R., Norris, E.H., Giasson, B.I., Mishizen-Eberz, A.J., Lynch, D.R., Lee, V.M., and Ischiropoulos, H. (2004). Functional consequences of alpha-synuclein tyrosine nitration: diminished binding to lipid vesicles and increased fibril formation. *The Journal of biological chemistry 279*, 47746-47753.

Hoglinger, G.U., Feger, J., Prigent, A., Michel, P.P., Parain, K., Champy, P., Ruberg, M., Oertel, W.H., and Hirsch, E.C. (2003). Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. *Journal of neurochemistry 84*, 491-502.

Hoozemans, J.J., van Haastert, E.S., Eikelenboom, P., de Vos, R.A., Rozemuller, J.M., and Scheper, W. (2007). Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease. *Biochemical and biophysical research communications 354*, 707-711.

Hopkins, S.J., and Rothwell, N.J. (1995). Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends in neurosciences 18*, 83-88.

Hoskins, J.A., and Davis, L.J. (1989). The acute effect on levels of catecholamines and metabolites in brain, of a single dose of MPTP in 8 strains of mice. *Neuropharmacology 28*, 1389-1397.

Huang, D.R., Wang, J., Kivisakk, P., Rollins, B.J., and Ransohoff, R.M. (2001). Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine 193*, 713-726.

Huber, A.R., Kunkel, S.L., Todd, R.F., 3rd, and Weiss, S.J. (1991). Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science 254*, 99-102.

Hulkower, K., Brosnan, C.F., Aquino, D.A., Cammer, W., Kulshrestha, S., Guida, M.P., Rapoport, D.A., and Berman, J.W. (1993). Expression of CSF-1, c-fms, and MCP-1 in the central nervous system of rats with experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of immunology 150*, 2525-2533.

Hunot, S., Dugas, N., Faucheux, B., Hartmann, A., Tardieu, M., Debre, P., Agid, Y., Dugas, B., and Hirsch, E.C. (1999). FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 19*, 3440-3447.

Hynes, R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell 69*, 11-25.

Ibanez, P., Lesage, S., Lohmann, E., Thobois, S., De Michele, G., Borg, M., Agid, Y., Durr, A., Brice, A., and French Parkinson's Disease Genetics Study, G. (2006). Mutational analysis of the PINK1 gene in early-onset parkinsonism in Europe and North Africa. *Brain : a journal of neurology 129*, 686-694.

Imai, Y., Soda, M., and Takahashi, R. (2000). Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *The Journal of biological chemistry 275*, 35661-35664.

Imamura, K., Hishikawa, N., Sawada, M., Nagatsu, T., Yoshida, M., and Hashizume, Y. (2003). Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta neuropathologica 106*, 518-526.

International Parkinson Disease Genomics, C., Nalls, M.A., Plagnol, V., Hernandez, D.G., Sharma, M., Sheerin, U.M., Saad, M., Simon-Sanchez, J., Schulte, C., Lesage, S*., et al.* (2011). Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet 377*, 641-649.

Ischiropoulos, H., and Beckman, J.S. (2003). Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *The Journal of clinical investigation 111*, 163-169.

Ishikawa, A., and Tsuji, S. (1996). Clinical analysis of 17 patients in 12 Japanese families with autosomal-recessive type juvenile parkinsonism. *Neurology 47*, 160-166.

Ishizuka, K., Kimura, T., Igata-yi, R., Katsuragi, S., Takamatsu, J., and Miyakawa, T. (1997). Identification of monocyte chemoattractant protein-1 in senile plaques and reactive microglia of Alzheimer's disease. *Psychiatry and clinical neurosciences 51*, 135-138.

Izikson, L., Klein, R.S., Charo, I.F., Weiner, H.L., and Luster, A.D. (2000). Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2. *The Journal of experimental medicine 192*, 1075-1080.

Jack, C.S., Arbour, N., Manusow, J., Montgrain, V., Blain, M., McCrea, E., Shapiro, A., and Antel, J.P. (2005). TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *Journal of immunology 175*, 4320-4330.

Jackson-Lewis, V., Blesa, J., and Przedborski, S. (2012). Animal models of Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders 18 Suppl 1*, S183-185.

Jackson-Lewis, V., Jakowec, M., Burke, R.E., and Przedborski, S. (1995). Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegeneration : a journal for neurodegenerative disorders, neuroprotection, and neuroregeneration 4*, 257-269.

Jang, H., Boltz, D., McClaren, J., Pani, A.K., Smeyne, M., Korff, A., Webster, R., and Smeyne, R.J. (2012). Inflammatory effects of highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in the CNS of mice. *The Journal of*

neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 32, 1545-1559.

Jang, H., Boltz, D., Sturm-Ramirez, K., Shepherd, K.R., Jiao, Y., Webster, R., and Smeyne, R.J. (2009). Highly pathogenic H5N1 influenza virus can enter the central nervous system and induce neuroinflammation and neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106*, 14063-14068.

Javitch, J.A., D'Amato, R.J., Strittmatter, S.M., and Snyder, S.H. (1985). Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 82*, 2173-2177.

Javoy, F., Sotelo, C., Herbet, A., and Agid, Y. (1976). Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intracerebral injection of 6-hydroxydopamine in the nigrostriatal dopamine system. *Brain research 102*, 201-215.

Jenkinson, E.J., Jenkinson, W.E., Rossi, S.W., and Anderson, G. (2006). The thymus and T-cell commitment: the right niche for Notch? *Nature reviews. Immunology 6*, 551-555.

Jenner, P. (2009). From the MPTP-treated primate to the treatment of motor complications in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders 15 Suppl 4*, S18-23.

Jiang, H., Jackson-Lewis, V., Muthane, U., Dollison, A., Ferreira, M., Espinosa, A., Parsons, B., and Przedborski, S. (1993). Adenosine receptor antagonists potentiate dopamine receptor agonist-induced rotational behavior in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Brain research 613*, 347-351.

Jiang, Y., Salafranca, M.N., Adhikari, S., Xia, Y., Feng, L., Sonntag, M.K., deFiebre, C.M., Pennell, N.A., Streit, W.J., and Harrison, J.K. (1998). Chemokine receptor expression in cultured glia and rat experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology 86*, 1-12.

Johnson, E.A., Dao, T.L., Guignet, M.A., Geddes, C.E., Koemeter-Cox, A.I., and Kan, R.K. (2011). Increased expression of the chemokines CXCL1 and MIP-1alpha by resident brain cells precedes neutrophil infiltration in the brain following prolonged soman-induced status epilepticus in rats. *Journal of neuroinflammation 8*, 41.

Johnson, J., Paisan-Ruiz, C., Lopez, G., Crews, C., Britton, A., Malkani, R., Evans, E.W., McInerney-Leo, A., Jain, S., Nussbaum, R.L.*, et al.* (2007). Comprehensive screening of a North American Parkinson's disease cohort for LRRK2 mutation. *Neuro-degenerative diseases 4*, 386-391.

Johnston, B., Issekutz, T.B., and Kubes, P. (1996). The alpha 4-integrin supports leukocyte rolling and adhesion in chronically inflamed postcapillary venules in vivo. *The Journal of experimental medicine 183*, 1995-2006.

Jonsson, G. (1983). Chemical lesioning techniques: monoamine neurotoxins.

Jung, H., Toth, P.T., White, F.A., and Miller, R.J. (2008). Monocyte chemoattractant protein-1 functions as a neuromodulator in dorsal root ganglia neurons. *Journal of neurochemistry 104*, 254-263.

Kagi, D., Vignaux, F., Ledermann, B., Burki, K., Depraetere, V., Nagata, S., Hengartner, H., and Golstein, P. (1994). Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science 265*, 528-530.

Kalkonde, Y.V., Morgan, W.W., Sigala, J., Maffi, S.K., Condello, C., Kuziel, W., Ahuja, S.S., and Ahuja, S.K. (2007). Chemokines in the MPTP model of Parkinson's disease: absence of CCL2 and its receptor CCR2 does not protect against striatal neurodegeneration. *Brain research 1128*, 1-11.

Kanaan, N.M., Kordower, J.H., and Collier, T.J. (2008). Age and region-specific responses of microglia, but not astrocytes, suggest a role in selective vulnerability of dopamine neurons after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure in monkeys. *Glia 56*, 1199-1214.

Kang, S.G., Piniecki, R.J., Hogenesch, H., Lim, H.W., Wiebke, E., Braun, S.E., Matsumoto, S., and Kim, C.H. (2007). Identification of a chemokine network that recruits FoxP3(+) regulatory T cells into chronically inflamed intestine. *Gastroenterology 132*, 966-981.

Karachi, C., Grabli, D., Bernard, F.A., Tande, D., Wattiez, N., Belaid, H., Bardinet, E., Prigent, A., Nothacker, H.P., Hunot, S*., et al.* (2010). Cholinergic mesencephalic neurons are involved in gait and postural disorders in Parkinson disease. *The Journal of clinical investigation 120*, 2745-2754.

Karpinar, D.P., Balija, M.B., Kugler, S., Opazo, F., Rezaei-Ghaleh, N., Wender, N., Kim, H.Y., Taschenberger, G., Falkenburger, B.H., Heise, H*., et al.* (2009). Pre-fibrillar alpha-synuclein variants with impaired beta-structure increase neurotoxicity in Parkinson's disease models. *The EMBO journal 28*, 3256-3268.

Karpus, W.J., and Kennedy, K.J. (1997). MIP-1alpha and MCP-1 differentially regulate acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis as well as Th1/Th2 lymphocyte differentiation. *Journal of leukocyte biology 62*, 681-687.

Kelly-Scumpia, K.M., Scumpia, P.O., Weinstein, J.S., Delano, M.J., Cuenca, A.G., Nacionales, D.C., Wynn, J.L., Lee, P.Y., Kumagai, Y., Efron, P.A*., et al.* (2011). B cells enhance early innate immune responses during bacterial sepsis. *The Journal of experimental medicine 208*, 1673-1682.

Kennedy, K.J., Strieter, R.M., Kunkel, S.L., Lukacs, N.W., and Karpus, W.J. (1998). Acute and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis are regulated by differential expression of the CC chemokines macrophage inflammatory protein-1alpha and monocyte chemotactic protein-1. *Journal of neuroimmunology 92*, 98-108.

Kikuchi, A., Takeda, A., Onodera, H., Kimpara, T., Hisanaga, K., Sato, N., Nunomura, A., Castellani, R.J., Perry, G., Smith, M.A., and Itoyama, Y. (2002). Systemic increase of oxidative nucleic acid damage in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Neurobiology of disease 9*, 244-248.

Kim, C.H., Kunkel, E.J., Boisvert, J., Johnston, B., Campbell, J.J., Genovese, M.C., Greenberg, H.B., and Butcher, E.C. (2001). Bonzo/CXCR6 expression defines type 1-polarized T-cell subsets with extralymphoid tissue homing potential. *The Journal of clinical investigation 107*, 595-601.

Kim, R.H., Smith, P.D., Aleyasin, H., Hayley, S., Mount, M.P., Pownall, S., Wakeham, A., You-Ten, A.J., Kalia, S.K., Horne, P*., et al.* (2005a). Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyrindine (MPTP) and oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102*, 5215-5220.

Kim, S.U., and de Vellis, J. (2005). Microglia in health and disease. *Journal of neuroscience research 81*, 302-313.

Kim, Y.S., Choi, D.H., Block, M.L., Lorenzl, S., Yang, L., Kim, Y.J., Sugama, S., Cho, B.P., Hwang, O., Browne, S.E*., et al.* (2007). A pivotal role of matrix metalloproteinase-3 activity in dopaminergic neuronal degeneration via microglial activation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 21*, 179-187.

Kim, Y.S., Kim, S.S., Cho, J.J., Choi, D.H., Hwang, O., Shin, D.H., Chun, H.S., Beal, M.F., and Joh, T.H. (2005b). Matrix metalloproteinase-3: a novel signaling proteinase from apoptotic neuronal cells that activates microglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 25*, 3701-3711.

Kirik, D., Rosenblad, C., Burger, C., Lundberg, C., Johansen, T.E., Muzyczka, N., Mandel, R.J., and Bjorklund, A. (2002). Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 22*, 2780-2791.

Kish, S.J., Morito, C., and Hornykiewicz, O. (1985). Glutathione peroxidase activity in Parkinson's disease brain. *Neuroscience letters 58*, 343-346.

Kita, T., Kita, H., and Kitai, S.T. (1986). Electrical membrane properties of rat substantia nigra compacta neurons in an in vitro slice preparation. *Brain research 372*, 21-30.

Kivisakk, P., Mahad, D.J., Callahan, M.K., Sikora, K., Trebst, C., Tucky, B., Wujek, J., Ravid, R., Staugaitis, S.M., Lassmann, H., and Ransohoff, R.M. (2004). Expression of CCR7 in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. *Annals of neurology 55*, 627-638.

Klaidman, L.K., Adams, J.D., Jr., Leung, A.C., Kim, S.S., and Cadenas, E. (1993). Redox cycling of MPP+: evidence for a new mechanism involving hydride transfer with xanthine oxidase, aldehyde dehydrogenase, and lipoamide dehydrogenase. *Free radical biology & medicine 15*, 169-179.

Klein, R.S., Izikson, L., Means, T., Gibson, H.D., Lin, E., Sobel, R.A., Weiner, H.L., and Luster, A.D. (2004). IFN-inducible protein 10/CXC chemokine ligand 10-independent induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology 172*, 550-559.

Klein, R.S., Lin, E., Zhang, B., Luster, A.D., Tollett, J., Samuel, M.A., Engle, M., and Diamond, M.S. (2005). Neuronal CXCL10 directs CD8+ T-cell recruitment and control of West Nile virus encephalitis. *Journal of virology 79*, 11457-11466.

Klopfleisch, R., Werner, O., Mundt, E., Harder, T., and Teifke, J.P. (2006). Neurotropism of highly pathogenic avian influenza virus A/chicken/Indonesia/2003 (H5N1) in experimentally infected pigeons (Columbia livia f. domestica). *Veterinary pathology 43*, 463-470.

Kohutnicka, M., Lewandowska, E., Kurkowska-Jastrzebska, I., Czlonkowski, A., and Czlonkowska, A. (1998). Microglial and astrocytic involvement in a murine model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Immunopharmacology 39*, 167-180.

Komendantov, A.O., Komendantova, O.G., Johnson, S.W., and Canavier, C.C. (2004). A modeling study suggests complementary roles for GABAA and NMDA receptors and the SK channel in regulating the firing pattern in midbrain dopamine neurons. *Journal of neurophysiology 91*, 346-357.

Kordower, J.H., Chu, Y., Hauser, R.A., Freeman, T.B., and Olanow, C.W. (2008a). Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nature medicine 14*, 504-506.

Kordower, J.H., Chu, Y., Hauser, R.A., Olanow, C.W., and Freeman, T.B. (2008b). Transplanted dopaminergic neurons develop PD pathologic changes: a second case report. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 23*, 2303-2306.

Kordower, J.H., Kanaan, N.M., Chu, Y., Suresh Babu, R., Stansell, J., 3rd, Terpstra, B.T., Sortwell, C.E., Steece-Collier, K., and Collier, T.J. (2006). Failure of proteasome inhibitor administration to provide a model of Parkinson's disease in rats and monkeys. *Annals of neurology 60*, 264-268.

Kraytsberg, Y., Kudryavtseva, E., McKee, A.C., Geula, C., Kowall, N.W., and Khrapko, K. (2006). Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nature genetics 38*, 518-520.

Kreutzberg, G.W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences 19*, 312-318.

Krige, D., Carroll, M.T., Cooper, J.M., Marsden, C.D., and Schapira, A.H. (1992). Platelet mitochondrial function in Parkinson's disease. The Royal Kings and Queens Parkinson Disease Research Group. *Annals of neurology 32*, 782-788.

Kruger, R., Hardt, C., Tschentscher, F., Jackel, S., Kuhn, W., Muller, T., Werner, J., Woitalla, D., Berg, D., Kuhnl, N.*, et al.* (2000). Genetic analysis of immunomodulating factors in sporadic Parkinson's disease. *Journal of neural transmission 107*, 553-562.

Krumbholz, M., Theil, D., Steinmeyer, F., Cepok, S., Hemmer, B., Hofbauer, M., Farina, C., Derfuss, T., Junker, A., Arzberger, T.*, et al.* (2007). CCL19 is constitutively expressed in the CNS, up-regulated in neuroinflammation, active and also inactive multiple sclerosis lesions. *Journal of neuroimmunology 190*, 72-79.

Kubo, S.I., Kitami, T., Noda, S., Shimura, H., Uchiyama, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Mizuno, Y., and Hattori, N. (2001). Parkin is associated with cellular vesicles. *Journal of neurochemistry 78*, 42-54.

Kurkowska-Jastrzebska, I., Wronska, A., Kohutnicka, M., Czlonkowski, A., and Czlonkowska, A. (1999a). The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. *Experimental neurology 156*, 50-61.

Kurkowska-Jastrzebska, I., Wronska, A., Kohutnicka, M., Czlonkowski, A., and Czlonkowska, A. (1999b). MHC class II positive microglia and lymphocytic infiltration are present in the substantia nigra and striatum in mouse model of Parkinson's disease. *Acta neurobiologiae experimentalis 59*, 1-8.

Kuzuhara, S., Mori, H., Izumiyama, N., Yoshimura, M., and Ihara, Y. (1988). Lewy bodies are ubiquitinated. A light and electron microscopic immunocytochemical study. *Acta neuropathologica 75*, 345-353.

L'Episcopo, F., Tirolo, C., Testa, N., Caniglia, S., Morale, M.C., Cossetti, C., D'Adamo, P., Zardini, E., Andreoni, L., Ihekwaba, A.E.*, et al.* (2011). Reactive astrocytes and Wnt/beta-catenin signaling link nigrostriatal injury to repair in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease 41*, 508-527.

Ladeby, R., Wirenfeldt, M., Garcia-Ovejero, D., Fenger, C., Dissing-Olesen, L., Dalmau, I., and Finsen, B. (2005). Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain research. Brain research reviews 48*, 196-206.

Lai, B.C., Marion, S.A., Teschke, K., and Tsui, J.K. (2002). Occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders 8*, 297-309.

Laing, K.J., and Secombes, C.J. (2004). Chemokines. *Developmental and comparative immunology 28*, 443-460.

Landau, A.M., Kouassi, E., Siegrist-Johnstone, R., and Desbarats, J. (2007). Proteasome inhibitor model of Parkinson's disease in mice is confounded by neurotoxicity of the ethanol vehicle. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 22*, 403-407.

Lane, T.E., Asensio, V.C., Yu, N., Paoletti, A.D., Campbell, I.L., and Buchmeier, M.J. (1998). Dynamic regulation of alpha- and beta-chemokine expression in the central nervous system during mouse hepatitis virus-induced demyelinating disease. *Journal of immunology 160*, 970-978.

Lang, A.E. (2011). A critical appraisal of the premotor symptoms of Parkinson's disease: potential usefulness in early diagnosis and design of neuroprotective trials. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 26*, 775-783.

Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W., and Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science 219*, 979-980.

Laudanna, C., Kim, J.Y., Constantin, G., and Butcher, E. (2002). Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunological reviews 186*, 37-46.

Laurie, C., Reynolds, A., Coskun, O., Bowman, E., Gendelman, H.E., and Mosley, R.L. (2007). CD4+ T cells from Copolymer-1 immunized mice protect dopaminergic neurons in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Journal of neuroimmunology 183*, 60-68.

Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P., and Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience 39*, 151-170.

Le, W.D., Rowe, D.B., Jankovic, J., Xie, W., and Appel, S.H. (1999). Effects of cerebrospinal fluid from patients with Parkinson disease on dopaminergic cells. *Archives of neurology 56*, 194-200.

Lebouvier, T., Neunlist, M., Bruley des Varannes, S., Coron, E., Drouard, A., N'Guyen, J.M., Chaumette, T., Tasselli, M., Paillusson, S., Flamand, M.*, et al.* (2010). Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PloS one 5*, e12728.

Lemere, C.A., and Masliah, E. (2010). Can Alzheimer disease be prevented by amyloid-beta immunotherapy? *Nature reviews. Neurology 6*, 108-119.

Levy, G. (2007). The relationship of Parkinson disease with aging. *Archives of neurology 64*, 1242-1246.

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews. Immunology 7*, 678-689.

Li, J., Uversky, V.N., and Fink, A.L. (2001). Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. *Biochemistry 40*, 11604-11613.

Li, J.Y., Englund, E., Holton, J.L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A.J., Lashley, T., Quinn, N.P., Rehncrona, S., Bjorklund, A.*, et al.* (2008). Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nature medicine 14*, 501-503.

Li, J.Y., Englund, E., Widner, H., Rehncrona, S., Bjorklund, A., Lindvall, O., and Brundin, P. (2010). Characterization of Lewy body pathology in 12- and 16-year-old intrastriatal mesencephalic grafts surviving in a patient with Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 25*, 1091-1096.

Li, M.O., Sanjabi, S., and Flavell, R.A. (2006). Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity 25*, 455-471.

Li, M.O., Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. (2007). T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity 26*, 579-591.

Li, S.C., Schoenberg, B.S., Wang, C.C., Cheng, X.M., Rui, D.Y., Bolis, C.L., and Schoenberg, D.G. (1985). A prevalence survey of Parkinson's disease and other movement disorders in the People's Republic of China. *Archives of neurology 42*, 655-657.

Liberatore, G.T., Jackson-Lewis, V., Vukosavic, S., Mandir, A.S., Vila, M., McAuliffe, W.G., Dawson, V.L., Dawson, T.M., and Przedborski, S. (1999). Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nature medicine 5*, 1403-1409.

Lima, M.M., Reksidler, A.B., and Vital, M.A. (2009). The neurobiology of the substantia nigra pars compacta: from motor to sleep regulation. *Journal of neural transmission. Supplementum*, 135-145.

Limousin, P., Krack, P., Pollak, P., Benazzouz, A., Ardouin, C., Hoffmann, D., and Benabid, A.L. (1998). Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *The New England journal of medicine 339*, 1105-1111.

Lin, J.J., Chen, C.H., Yueh, K.C., Chang, C.Y., and Lin, S.Z. (2006). A CD14 monocyte receptor polymorphism and genetic susceptibility to Parkinson's disease for females. *Parkinsonism & related disorders 12*, 9-13.

Liss, B., Haeckel, O., Wildmann, J., Miki, T., Seino, S., and Roeper, J. (2005). K-ATP channels promote the differential degeneration of dopaminergic midbrain neurons. *Nature neuroscience 8*, 1742-1751.

Litvan, I., Bhatia, K.P., Burn, D.J., Goetz, C.G., Lang, A.E., McKeith, I., Quinn, N., Sethi, K.D., Shults, C., Wenning, G.K., and Movement Disorders Society Scientific Issues, C. (2003). Movement Disorders Society Scientific Issues Committee report: SIC Task Force appraisal of clinical diagnostic criteria for Parkinsonian disorders. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 18*, 467-486.

Liu, L., Callahan, M.K., Huang, D., and Ransohoff, R.M. (2005). Chemokine receptor CXCR3: an unexpected enigma. *Current topics in developmental biology 68*, 149-181.

Liu, L., Huang, D., Matsui, M., He, T.T., Hu, T., Demartino, J., Lu, B., Gerard, C., and Ransohoff, R.M. (2006). Severe disease, unaltered leukocyte migration, and reduced IFN-gamma production in CXCR3-/- mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology 176*, 4399-4409.

Lohmann, E., Periquet, M., Bonifati, V., Wood, N.W., De Michele, G., Bonnet, A.M., Fraix, V., Broussolle, E., Horstink, M.W., Vidailhet, M.*, et al.* (2003). How much phenotypic variation can be attributed to parkin genotype? *Annals of neurology 54*, 176-185.

Lohmann, E., Thobois, S., Lesage, S., Broussolle, E., du Montcel, S.T., Ribeiro, M.J., Remy, P., Pelissolo, A., Dubois, B., Mallet, L.*, et al.* (2009). A multidisciplinary study of patients with early-onset PD with and without parkin mutations. *Neurology 72*, 110-116.

Lotharius, J., and O'Malley, K.L. (2000). The parkinsonism-inducing drug 1-methyl-4-phenylpyridinium triggers intracellular dopamine oxidation. A novel mechanism of toxicity. *The Journal of biological chemistry 275*, 38581-38588.

Lowin, B., Hahne, M., Mattmann, C., and Tschopp, J. (1994). Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature 370*, 650-652.

Lucking, C.B., Durr, A., Bonifati, V., Vaughan, J., De Michele, G., Gasser, T., Harhangi, B.S., Meco, G., Denefle, P., Wood, N.W.*, et al.* (2000). Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *The New England journal of medicine 342*, 1560-1567.

Luk, K.C., Song, C., O'Brien, P., Stieber, A., Branch, J.R., Brunden, K.R., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2009). Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106*, 20051-20056.

Luster, A.D., Alon, R., and von Andrian, U.H. (2005). Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nature immunology 6*, 1182-1190.

Luzio, J.P., Pryor, P.R., and Bright, N.A. (2007). Lysosomes: fusion and function. *Nature reviews. Molecular cell biology 8*, 622-632.

Mahad, D.J., and Ransohoff, R.M. (2003). The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple

sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Seminars in immunology 15*, 23-32.

Mahlknecht, P., Hotter, A., Hussl, A., Esterhammer, R., Schocke, M., and Seppi, K. (2010). Significance of MRI in diagnosis and differential diagnosis of Parkinson's disease. *Neuro-degenerative diseases 7*, 300-318.

Mann, V.M., Cooper, J.M., Daniel, S.E., Srai, K., Jenner, P., Marsden, C.D., and Schapira, A.H. (1994). Complex I, iron, and ferritin in Parkinson's disease substantia nigra. *Annals of neurology 36*, 876-881.

Markey, S.P., Johannessen, J.N., Chiueh, C.C., Burns, R.S., and Herkenham, M.A. (1984). Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature 311*, 464-467.

Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., and Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library 13*, 453-461.

Masliah, E., Rockenstein, E., Adame, A., Alford, M., Crews, L., Hashimoto, M., Seubert, P., Lee, M., Goldstein, J., Chilcote, T.*, et al.* (2005). Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuron 46*, 857-868.

Mathur, B.N., Neely, M.D., Dyllick-Brenzinger, M., Tandon, A., and Deutch, A.Y. (2007). Systemic administration of a proteasome inhibitor does not cause nigrostriatal dopamine degeneration. *Brain research 1168*, 83-89.

Matsumoto, T., Ikeda, K., Mukaida, N., Harada, A., Matsumoto, Y., Yamashita, J., and Matsushima, K. (1997). Prevention of cerebral edema and infarct in cerebral reperfusion injury by an antibody to interleukin-8. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 77*, 119-125.

Mattila, K.M., Rinne, J.O., Lehtimaki, T., Roytta, M., Ahonen, J.P., and Hurme, M. (2002). Association of an interleukin 1B gene polymorphism (-511) with Parkinson's disease in Finnish patients. *Journal of medical genetics 39*, 400-402.

Mayer, A.M., Clifford, J.A., Aldulescu, M., Frenkel, J.A., Holland, M.A., Hall, M.L., Glaser, K.B., and Berry, J. (2011). Cyanobacterial Microcystis aeruginosa lipopolysaccharide elicits release of superoxide anion, thromboxane B(2), cytokines, chemokines, and matrix metalloproteinase-9 by rat microglia. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 121*, 63-72.

Mayeux, R., Marder, K., Cote, L.J., Denaro, J., Hemenegildo, N., Mejia, H., Tang, M.X., Lantigua, R., Wilder, D., Gurland, B., and et al. (1995). The frequency of idiopathic Parkinson's disease by age, ethnic group, and sex in northern Manhattan, 1988-1993. *American journal of epidemiology 142*, 820-827.

McCandless, E.E., Wang, Q., Woerner, B.M., Harper, J.M., and Klein, R.S. (2006). CXCL12 limits inflammation by localizing mononuclear infiltrates to the perivascular space during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology 177*, 8053-8064.

McColl, S.R., Staykova, M.A., Wozniak, A., Fordham, S., Bruce, J., and Willenborg, D.O. (1998). Treatment with anti-granulocyte antibodies inhibits the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology 161*, 6421-6426.

McEver, R.P. (2002). Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Current opinion in cell biology 14*, 581-586.

McGeer, P.L., Itagaki, S., Boyes, B.E., and McGeer, E.G. (1988). Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology 38*, 1285-1291.

McGeer, P.L., McGeer, E.G., and Suzuki, J.S. (1977). Aging and extrapyramidal function. *Archives of neurology 34*, 33-35.

McGeer, P.L., Schwab, C., Parent, A., and Doudet, D. (2003). Presence of reactive microglia in monkey substantia nigra years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration. *Annals of neurology 54*, 599-604.

McManus, C., Berman, J.W., Brett, F.M., Staunton, H., Farrell, M., and Brosnan, C.F. (1998). MCP-1, MCP-2 and MCP-3 expression in multiple sclerosis lesions: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Journal of neuroimmunology 86*, 20-29.

McMenamin, P.G. (1999). Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemount preparations. *The Journal of comparative neurology 405*, 553-562.

McNaught, K.S., Belizaire, R., Isacson, O., Jenner, P., and Olanow, C.W. (2003). Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Experimental neurology 179*, 38-46.

McNaught, K.S., Belizaire, R., Jenner, P., Olanow, C.W., and Isacson, O. (2002). Selective loss of 20S proteasome alpha-subunits in the substantia nigra pars compacta in Parkinson's disease. *Neuroscience letters 326*, 155-158.

McNaught, K.S., and Jenner, P. (2001). Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neuroscience letters 297*, 191-194.

McNaught, K.S., Perl, D.P., Brownell, A.L., and Olanow, C.W. (2004). Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Annals of neurology 56*, 149-162.

McRae-Degueurce, A., Rosengren, L., Haglid, K., Booj, S., Gottfries, C.G., Granerus, A.C., and Dahlstrom, A. (1988). Immunocytochemical investigations on the presence of neuron-specific antibodies in the CSF of Parkinson's disease cases. *Neurochemical research 13*, 679-684.

Meredith, G.E., Totterdell, S., Petroske, E., Santa Cruz, K., Callison, R.C., Jr., and Lau, Y.S. (2002). Lysosomal malfunction accompanies alpha-synuclein aggregation in a progressive mouse model of Parkinson's disease. *Brain research 956*, 156-165.

Merrill, J.E., and Benveniste, E.N. (1996). Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends in neurosciences 19*, 331-338.

Michael, G.J., Esmailzadeh, S., Moran, L.B., Christian, L., Pearce, R.K., and Graeber, M.B. (2011). Up-regulation of metallothionein gene expression in Parkinsonian astrocytes. *Neurogenetics 12*, 295-305.

Michel, P.P., Alvarez-Fischer, D., Guerreiro, S., Hild, A., Hartmann, A., and Hirsch, E.C. (2007). Role of activity-dependent mechanisms in the control of dopaminergic neuron survival. *Journal of neurochemistry 101*, 289-297.

Miklossy, J., Doudet, D.D., Schwab, C., Yu, S., McGeer, E.G., and McGeer, P.L. (2006). Role of ICAM-1 in persisting inflammation in Parkinson disease and MPTP monkeys. *Experimental neurology 197*, 275-283.

Mildner, A., Schmidt, H., Nitsche, M., Merkler, D., Hanisch, U.K., Mack, M., Heikenwalder, M., Bruck, W., Priller, J., and Prinz, M. (2007). Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nature neuroscience 10*, 1544-1553.

Miller, D.H., Khan, O.A., Sheremata, W.A., Blumhardt, L.D., Rice, G.P., Libonati, M.A., Willmer-Hulme, A.J., Dalton, C.M., Miszkiel, K.A., O'Connor, P.W., and International Natalizumab Multiple Sclerosis Trial, G. (2003). A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine 348*, 15-23.

Mirza, B., Hadberg, H., Thomsen, P., and Moos, T. (2000). The absence of reactive

astrocytosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. *Neuroscience 95*, 425-432.

Miyoshi, R., Kito, S., Ishida, H., and Katayama, S. (1988). Alterations of the central noradrenergic system in MPTP-induced monkey parkinsonism. *Research communications in chemical pathology and pharmacology 62*, 93-102.

Mizuta, I., Nishimura, M., Mizuta, E., Yamasaki, S., Ohta, M., Kuno, S., Nishimura, M., and Ota, M. (2001). Relation between the high production related allele of the interferon-gamma (IFN-gamma) gene and age at onset of idiopathic Parkinson's disease in Japan. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry 71*, 818-819.

Mochizuki, H., Goto, K., Mori, H., and Mizuno, Y. (1996). Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease. *Journal of the neurological sciences 137*, 120-123.

Mogi, M., Harada, M., Kondo, T., Mizuno, Y., Narabayashi, H., Riederer, P., and Nagatsu, T. (1996). The soluble form of Fas molecule is elevated in parkinsonian brain tissues. *Neuroscience letters 220*, 195-198.

Mogi, M., Harada, M., Kondo, T., Riederer, P., Inagaki, H., Minami, M., and Nagatsu, T. (1994a). Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neuroscience letters 180*, 147-150.

Mogi, M., Harada, M., Riederer, P., Narabayashi, H., Fujita, K., and Nagatsu, T. (1994b). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neuroscience letters 165*, 208-210.

Mogi, M., Kondo, T., Mizuno, Y., and Nagatsu, T. (2007). p53 protein, interferon-gamma, and NF-kappaB levels are elevated in the parkinsonian brain. *Neuroscience letters 414*, 94-97.

Mogi, M., Togari, A., Kondo, T., Mizuno, Y., Komure, O., Kuno, S., Ichinose, H., and Nagatsu, T. (2000). Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain. *Journal of neural transmission 107*, 335-341.

Moller, J.C., Depboylu, C., Kolsch, H., Lohmuller, F., Bandmann, O., Gocke, P., Du, Y., Paus, S., Wullner, U., Gasser, T.*, et al.* (2004). Lack of association between the interleukin-1 alpha (-889) polymorphism and early-onset Parkinson's disease. *Neuroscience letters 359*, 195-197.

Morgante, L., Rocca, W.A., Di Rosa, A.E., De Domenico, P., Grigoletto, F., Meneghini, F., Reggio, A., Savettieri, G., Castiglione, M.G., Patti, F., and et al. (1992). Prevalence of Parkinson's disease and other types of parkinsonism: a door-to-door survey in three Sicilian municipalities. The Sicilian Neuro-Epidemiologic Study (SNES) Group. *Neurology 42*, 1901-1907.

Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual review of immunology 7*, 145-173.

Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews. Immunology 8*, 958-969.

Muftuoglu, M., Elibol, B., Dalmizrak, O., Ercan, A., Kulaksiz, G., Ogus, H., Dalkara, T., and Ozer, N. (2004). Mitochondrial complex I and IV activities in leukocytes from patients with parkin mutations. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 19*, 544-548.

Muller, M., Carter, S., Hofer, M.J., and Campbell, I.L. (2010). Review: The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in neuroimmunity--a tale of conflict and conundrum. *Neuropathology and applied neurobiology 36*, 368-387.

Muller, M., Carter, S.L., Hofer, M.J., Manders, P., Getts, D.R., Getts, M.T., Dreykluft, A., Lu, B., Gerard, C., King, N.J., and Campbell, I.L. (2007). CXCR3 signaling reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling the parenchymal distribution of effector and regulatory T cells in the central nervous system. *Journal of immunology 179*, 2774-2786.

Murer, M.G., Raisman-Vozari, R., Yan, Q., Ruberg, M., Agid, Y., and Michel, P.P. (1999). Survival factors promote BDNF protein expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Neuroreport 10*, 801-805.

Murphy, P.M. (1996). Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis. *Cytokine & growth factor reviews 7*, 47-64.

Murphy, P.M. (2002). International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacological reviews 54*, 227-229.

Mythri, R.B., Venkateshappa, C., Harish, G., Mahadevan, A., Muthane, U.B., Yasha, T.C., Srinivas Bharath, M.M., and Shankar, S.K. (2011). Evaluation of markers of oxidative stress, antioxidant function and astrocytic proliferation in the striatum and frontal cortex of Parkinson's disease brains. *Neurochemical research 36*, 1452-1463.

Nagata, K., Tanaka, K., Ogawa, K., Kemmotsu, K., Imai, T., Yoshie, O., Abe, H., Tada, K., Nakamura, M., Sugamura, K., and Takano, S. (1999). Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells in vivo. *Journal of immunology 162*, 1278-1286.

Nair, V.D., McNaught, K.S., Gonzalez-Maeso, J., Sealfon, S.C., and Olanow, C.W. (2006). p53 mediates nontranscriptional cell death in dopaminergic cells in response to proteasome inhibition. *The Journal of biological chemistry 281*, 39550-39560.

Nakabeppu, Y., Tsuchimoto, D., Yamaguchi, H., and Sakumi, K. (2007). Oxidative damage in nucleic acids and Parkinson's disease. *Journal of neuroscience research 85*, 919-934.

Narumi, S., Kaburaki, T., Yoneyama, H., Iwamura, H., Kobayashi, Y., and Matsushima, K. (2002). Neutralization of IFN-inducible protein 10/CXCL10 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *European journal of immunology 32*, 1784-1791.

Nedergaard, M., Ransom, B., and Goldman, S.A. (2003). New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends in neurosciences 26*, 523-530.

Neumann, H., Kotter, M.R., and Franklin, R.J. (2009). Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain : a journal of neurology 132*, 288-295.

Neves, S.R., Ram, P.T., and Iyengar, R. (2002). G protein pathways. *Science 296*, 1636-1639.

Nicklas, W.J., Vyas, I., and Heikkila, R.E. (1985). Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life sciences 36*, 2503-2508.

Nieto, M., Gil-Bea, F.J., Dalfo, E., Cuadrado, M., Cabodevilla, F., Sanchez, B., Catena, S., Sesma, T., Ribe, E., Ferrer, I.*, et al.* (2006). Increased sensitivity to MPTP in human alpha-synuclein A30P transgenic mice. *Neurobiology of aging 27*, 848-856.

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science 308*, 1314-1318.

Nomiyama, H., Osada, N., and Yoshie, O. (2010). The evolution of mammalian chemokine genes. *Cytokine & growth factor reviews 21*, 253-262.

Nonaka, T., Watanabe, S.T., Iwatsubo, T., and Hasegawa, M. (2010). Seeded aggregation and toxicity of {alpha}-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *The*

Journal of biological chemistry 285, 34885-34898.

Nuytemans, K., Theuns, J., Cruts, M., and Van Broeckhoven, C. (2010). Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. *Human mutation 31*, 763-780.

O'Callaghan, J.P., Sriram, K., and Miller, D.B. (2008). Defining "neuroinflammation". *Annals of the New York Academy of Sciences 1139*, 318-330.

Obeso, J.A., Rodriguez-Oroz, M.C., Goetz, C.G., Marin, C., Kordower, J.H., Rodriguez, M., Hirsch, E.C., Farrer, M., Schapira, A.H., and Halliday, G. (2010). Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nature medicine 16*, 653-661.

Ohmori, H., and Kanayama, N. (2005). Immunogenicity of an inflammation-associated product, tyrosine nitrated self-proteins. *Autoimmunity reviews 4*, 224-229.

Olanow, C.W. (2007). The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease--2007. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 22 Suppl 17*, S335-342.

Olanow, C.W., and McNaught, K. (2011). Parkinson's disease, proteins, and prions: milestones. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 26*, 1056-1071.

Orr, C.F., Rowe, D.B., Mizuno, Y., Mori, H., and Halliday, G.M. (2005). A possible role for humoral immunity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology 128*, 2665-2674.

Outeiro, T.F., Putcha, P., Tetzlaff, J.E., Spoelgen, R., Koker, M., Carvalho, F., Hyman, B.T., and McLean, P.J. (2008). Formation of toxic oligomeric alpha-synuclein species in living cells. *PloS one 3*, e1867.

Owens, T., Bechmann, I., and Engelhardt, B. (2008). Perivascular spaces and the two steps to neuroinflammation. *Journal of neuropathology and experimental neurology 67*, 1113-1121.

Oynebraten, I., Bakke, O., Brandtzaeg, P., Johansen, F.E., and Haraldsen, G. (2004). Rapid chemokine secretion from endothelial cells originates from 2 distinct compartments. *Blood 104*, 314-320.

Oynebraten, I., Barois, N., Hagelsteen, K., Johansen, F.E., Bakke, O., and Haraldsen, G. (2005). Characterization of a novel chemokine-containing storage granule in endothelial cells: evidence for preferential exocytosis mediated by protein kinase A and diacylglycerol. *Journal of immunology 175*, 5358-5369.

Pabon, M.M., Bachstetter, A.D., Hudson, C.E., Gemma, C., and Bickford, P.C. (2011). CX3CL1 reduces neurotoxicity and microglial activation in a rat model of Parkinson's disease. *Journal of neuroinflammation 8*, 9.

Paisan-Ruiz, C., Jain, S., Evans, E.W., Gilks, W.P., Simon, J., van der Brug, M., Lopez de Munain, A., Aparicio, S., Gil, A.M., Khan, N.*, et al.* (2004). Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron 44*, 595-600.

Palacino, J.J., Sagi, D., Goldberg, M.S., Krauss, S., Motz, C., Wacker, M., Klose, J., and Shen, J. (2004). Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *The Journal of biological chemistry 279*, 18614-18622.

Papachroni, K.K., Ninkina, N., Papapanagiotou, A., Hadjigeorgiou, G.M., Xiromerisiou, G., Papadimitriou, A., Kalofoutis, A., and Buchman, V.L. (2007). Autoantibodies to alpha-synuclein in inherited Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry 101*, 749-756.

Papadimitriou, A., Veletza, V., Hadjigeorgiou, G.M., Patrikiou, A., Hirano, M., and Anastasopoulos, I. (1999). Mutated alpha-synuclein gene in two Greek kindreds with familial PD: incomplete penetrance? *Neurology 52*, 651-654.

Papeix, C., and Lubetzki, C. (2009). [Monoclonal antibodies in multiple sclerosis]. *Medecine sciences : M/S 25*, 1113-1115.

Parker, W.D., Jr., Boyson, S.J., and Parks, J.K. (1989). Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Annals of neurology 26*, 719-723.

Pattarini, R., Smeyne, R.J., and Morgan, J.I. (2007). Temporal mRNA profiles of inflammatory mediators in the murine 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyrimidine model of Parkinson's disease. *Neuroscience 145*, 654-668.

Paul, W.E., and Seder, R.A. (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell 76*, 241-251.

Paxinos, G., Franklin, K.B.J. (2001). The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.

Pekny, M., and Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia 50*, 427-434.

Pellerin, L., Bouzier-Sore, A.K., Aubert, A., Serres, S., Merle, M., Costalat, R., and Magistretti, P.J. (2007). Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia 55*, 1251-1262.

Penn, A.M., Roberts, T., Hodder, J., Allen, P.S., Zhu, G., and Martin, W.R. (1995). Generalized mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease detected by magnetic resonance spectroscopy of muscle. *Neurology 45*, 2097-2099.

Perier, C., Tieu, K., Guegan, C., Caspersen, C., Jackson-Lewis, V., Carelli, V., Martinuzzi, A., Hirano, M., Przedborski, S., and Vila, M. (2005). Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102*, 19126-19131.

Perry, V.H., Nicoll, J.A., and Holmes, C. (2010). Microglia in neurodegenerative disease. *Nature reviews. Neurology 6*, 193-201.

Peterson, P.K., Hu, S., Salak-Johnson, J., Molitor, T.W., and Chao, C.C. (1997). Differential production of and migratory response to beta chemokines by human microglia and astrocytes. *The Journal of infectious diseases 175*, 478-481.

Poirier, J., Dea, D., Baccichet, A., and Thiffault, C. (1994). Superoxide dismutase expression in Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences 738*, 116-120.

Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R.*, et al.* (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science 276*, 2045-2047.

Prigione, A., Begni, B., Galbussera, A., Beretta, S., Brighina, L., Garofalo, R., Andreoni, S., Piolti, R., and Ferrarese, C. (2006). Oxidative stress in peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease: negative correlation with levodopa dosage. *Neurobiology of disease 23*, 36-43.

Proudfoot, A.E. (2002). Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nature reviews. Immunology 2*, 106-115.

Proudfoot, A.E., Power, C.A., Hoogewerf, A.J., Montjovent, M.O., Borlat, F., Offord, R.E., and Wells, T.N. (1996). Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist. *The Journal of biological chemistry 271*, 2599-2603.

Proudfoot, A.E., Power, C.A., and Schwarz, M.K. (2010). Anti-chemokine small molecule drugs: a promising future? *Expert opinion on investigational drugs 19*, 345-355.

Przedborski, S., Levivier, M., Jiang, H., Ferreira, M., Jackson-Lewis, V., Donaldson, D., and Togasaki, D.M. (1995). Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience 67*, 631-647.

Qin, S., Rottman, J.B., Myers, P., Kassam, N., Weinblatt, M., Loetscher, M., Koch, A.E., Moser, B., and Mackay, C.R. (1998). The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *The Journal of clinical investigation 101*, 746-754.

Racke, M.K., and Lovett-Racke, A.E. (2011). Glatiramer acetate treatment of multiple sclerosis: an immunological perspective. *Journal of immunology 186*, 1887-1890.

Ramsay, R.R., and Singer, T.P. (1986). Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *The Journal of biological chemistry 261*, 7585-7587.

Ramsay, R.R., and Singer, T.P. (1992). Relation of superoxide generation and lipid peroxidation to the inhibition of NADH-Q oxidoreductase by rotenone, piericidin A, and MPP+. *Biochemical and biophysical research communications 189*, 47-52.

Randy, L.H., and Guoying, B. (2007). Agonism of Peroxisome Proliferator Receptor-Gamma may have Therapeutic Potential for Neuroinflammation and Parkinson's Disease. *Current neuropharmacology 5*, 35-46.

Ransohoff, R.M. (2007). Microgliosis: the questions shape the answers. *Nature neuroscience 10*, 1507-1509.

Ransohoff, R.M., Hamilton, T.A., Tani, M., Stoler, M.H., Shick, H.E., Major, J.A., Estes, M.L., Thomas, D.M., and Tuohy, V.K. (1993). Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 7*, 592-600.

Ransohoff, R.M., Kivisakk, P., and Kidd, G. (2003). Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nature reviews. Immunology 3*, 569-581.

Ransohoff, R.M., and Perry, V.H. (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annual review of immunology 27*, 119-145.

Rathke-Hartlieb, S., Kahle, P.J., Neumann, M., Ozmen, L., Haid, S., Okochi, M., Haass, C., and Schulz, J.B. (2001). Sensitivity to MPTP is not increased in Parkinson's disease-associated mutant alpha-synuclein transgenic mice. *Journal of neurochemistry 77*, 1181-1184.

Ravanel, P., Tissut, M., and Douce, R. (1984). Effects of rotenoids on isolated plant mitochondria. *Plant physiology 75*, 414-420.

Reale, M., Iarlori, C., Thomas, A., Gambi, D., Perfetti, B., Di Nicola, M., and Onofrj, M. (2009). Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. *Brain, behavior, and immunity 23*, 55-63.

Reboldi, A., Coisne, C., Baumjohann, D., Benvenuto, F., Bottinelli, D., Lira, S., Uccelli, A., Lanzavecchia, A., Engelhardt, B., and Sallusto, F. (2009). C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nature immunology 10*, 514-523.

Ren, L.Q., Gourmala, N., Boddeke, H.W., and Gebicke-Haerter, P.J. (1998). Lipopolysaccharide-induced expression of IP-10 mRNA in rat brain and in cultured rat astrocytes and microglia. *Brain research. Molecular brain research 59*, 256-263.

Rentzos, M., Nikolaou, C., Andreadou, E., Paraskevas, G.P., Rombos, A., Zoga, M., Tsoutsou, A., Boufidou, F., Kapaki, E., and Vassilopoulos, D. (2007). Circulating interleukin-15 and RANTES chemokine in Parkinson's disease. *Acta neurologica Scandinavica 116*, 374-379.

Reynolds, A.D., Banerjee, R., Liu, J., Gendelman, H.E., and Mosley, R.L. (2007). Neuroprotective activities of CD4+CD25+ regulatory T cells in an animal model of Parkinson's disease. *Journal of leukocyte biology 82*, 1083-1094.

Reynolds, A.D., Stone, D.K., Hutter, J.A., Benner, E.J., Mosley, R.L., and Gendelman, H.E. (2010). Regulatory T cells attenuate Th17 cell-mediated nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in a model of Parkinson's disease. *Journal of immunology 184*, 2261-2271.

Rigoni, M., Shinya, K., Toffan, A., Milani, A., Bettini, F., Kawaoka, Y., Cattoli, G., and Capua, I. (2007). Pneumo- and neurotropism of avian origin Italian highly pathogenic avian influenza H7N1 isolates in experimentally infected mice. *Virology 364*, 28-35.

Rivera-Nieves, J., Olson, T., Bamias, G., Bruce, A., Solga, M., Knight, R.F., Hoang, S., Cominelli, F., and Ley, K. (2005). L-selectin, alpha 4 beta 1, and alpha 4 beta 7 integrins participate in CD4+ T cell recruitment to chronically inflamed small intestine. *Journal of immunology 174*, 2343-2352.

Robertson, D.C., Schmidt, O., Ninkina, N., Jones, P.A., Sharkey, J., and Buchman, V.L. (2004). Developmental loss and resistance to MPTP toxicity of dopaminergic neurones in substantia nigra pars compacta of gamma-synuclein, alpha-synuclein and double alpha/gamma-synuclein null mutant mice. *Journal of neurochemistry 89*, 1126-1136.

Rodriguez-Oroz, M.C., Jahanshahi, M., Krack, P., Litvan, I., Macias, R., Bezard, E., and Obeso, J.A. (2009). Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. *Lancet neurology 8*, 1128-1139.

Rodriguez-Pallares, J., Parga, J.A., Munoz, A., Rey, P., Guerra, M.J., and Labandeira-Garcia, J.L. (2007). Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: the role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. *Journal of neurochemistry 103*, 145-156.

Rogers, J., Luber-Narod, J., Styren, S.D., and Civin, W.H. (1988). Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: relationship to the pathology of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging 9*, 339-349.

Rohn, T.T., and Catlin, L.W. (2011). Immunolocalization of influenza A virus and markers of inflammation in the human Parkinson's disease brain. *PloS one 6*, e20495.

Roodveldt, C., Labrador-Garrido, A., Gonzalez-Rey, E., Fernandez-Montesinos, R., Caro, M., Lachaud, C.C., Waudby, C.A., Delgado, M., Dobson, C.M., and Pozo, D. (2010). Glial innate immunity generated by non-aggregated alpha-synuclein in mouse: differences between wild-type and Parkinson's disease-linked mutants. *PloS one 5*, e13481.

Rosen, S.D. (2004). Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annual review of immunology 22*, 129-156.

Rosenkranz, D., Weyer, S., Tolosa, E., Gaenslen, A., Berg, D., Leyhe, T., Gasser, T., and Stoltze, L. (2007). Higher frequency of regulatory T cells in the elderly and increased suppressive activity in neurodegeneration. *Journal of neuroimmunology 188*, 117-127.

Rossi, D., and Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annual review of immunology 18*, 217-242.

Rot, A., and von Andrian, U.H. (2004). Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. *Annual review of immunology 22*, 891-928.

Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P., and Welty, D.F. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron 16*, 675-686.

Rowe, D.B., Le, W., Smith, R.G., and Appel, S.H. (1998). Antibodies from patients with Parkinson's disease react with protein modified by dopamine oxidation. *Journal of neuroscience research 53*, 551-558.

Sachs, C., and Jonsson, G. (1975). Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. *Biochemical pharmacology 24*, 1-8.

Saggu, H., Cooksey, J., Dexter, D., Wells, F.R., Lees, A., Jenner, P., and Marsden, C.D. (1989). A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in parkinsonian substantia nigra. *Journal of neurochemistry 53*, 692-697.

Saijo, K., and Glass, C.K. (2011). Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nature reviews. Immunology 11*, 775-787.

Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual review of immunology 22*, 531-562.

Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C.R., and Lanzavecchia, A. (1998). Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *The Journal of experimental medicine 187*, 875-883.

Samii, A., Etminan, M., Wiens, M.O., and Jafari, S. (2009). NSAID use and the risk of Parkinson's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Drugs & aging 26*, 769-779.

Sanchez-Guajardo, V., Febbraro, F., Kirik, D., and Romero-Ramos, M. (2010). Microglia acquire distinct activation profiles depending on the degree of alpha-synuclein neuropathology in a rAAV based model of Parkinson's disease. *PloS one 5*, e8784.

Sanghera, M.K., Trulson, M.E., and German, D.C. (1984). Electrophysiological properties of mouse dopamine neurons: in vivo and in vitro studies. *Neuroscience 12*, 793-801.

Sato, W., Aranami, T., and Yamamura, T. (2007). Cutting edge: Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5- phenotype. *Journal of immunology 178*, 7525-7529.

Sauder, C., Hallensleben, W., Pagenstecher, A., Schneckenburger, S., Biro, L., Pertlik, D., Hausmann, J., Suter, M., and Staeheli, P. (2000). Chemokine gene expression in astrocytes of Borna disease virus-infected rats and mice in the absence of inflammation. *Journal of virology 74*, 9267-9280.

Sauer, H., and Oertel, W.H. (1994). Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience 59*, 401-415.

Schall, T.J., and Proudfoot, A.E. (2011). Overcoming hurdles in developing successful drugs targeting chemokine receptors. *Nature reviews. Immunology 11*, 355-363.

Schapira, A.H. (2007). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Cell death and differentiation 14*, 1261-1266.

Schapira, A.H. (2011). Mitochondrial pathology in Parkinson's disease. *The Mount Sinai journal of medicine, New York 78*, 872-881.

Schapira, A.H., Cleeter, M.W., Muddle, J.R., Workman, J.M., Cooper, J.M., and King, R.H. (2006). Proteasomal inhibition causes loss of nigral tyrosine hydroxylase neurons. *Annals of neurology 60*, 253-255.

Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Clark, J.B., Jenner, P., and Marsden, C.D. (1990). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry 54*, 823-827.

Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Jenner, P., Clark, J.B., and Marsden, C.D. (1989). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet 1*, 1269.

Schmidt, S., Linnartz, B., Mendritzki, S., Sczepan, T., Lubbert, M., Stichel, C.C., and Lubbert, H. (2011). Genetic mouse models for Parkinson's disease display severe pathology in glial cell mitochondria. *Human molecular genetics 20*, 1197-1211.

Schneider, M.A., Meingassner, J.G., Lipp, M., Moore, H.D., and Rot, A. (2007). CCR7 is required for the in vivo function of CD4+

CD25+ regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine 204*, 735-745.

Schober, A. (2004). Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell and tissue research 318*, 215-224.

Schulte, T., Schols, L., Muller, T., Woitalla, D., Berger, K., and Kruger, R. (2002). Polymorphisms in the interleukin-1 alpha and beta genes and the risk for Parkinson's disease. *Neuroscience letters 326*, 70-72.

Schwab, J.M., and Schluesener, H.J. (2003). Cyclooxygenases and central nervous system inflammation: conceptual neglect of cyclooxygenase 1. *Archives of neurology 60*, 630-632.

Seifert, G., Schilling, K., and Steinhauser, C. (2006). Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nature reviews. Neuroscience 7*, 194-206.

Selikhova, M., Williams, D.R., Kempster, P.A., Holton, J.L., Revesz, T., and Lees, A.J. (2009). A clinico-pathological study of subtypes in Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology 132*, 2947-2957.

Selley, M.L. (1998). (E)-4-hydroxy-2-nonenal may be involved in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Free radical biology & medicine 25*, 169-174.

Seniuk, N.A., Tatton, W.G., and Greenwood, C.E. (1990). Dose-dependent destruction of the coeruleus-cortical and nigral-striatal projections by MPTP. *Brain research 527*, 7-20.

Shahrara, S., Proudfoot, A.E., Woods, J.M., Ruth, J.H., Amin, M.A., Park, C.C., Haas, C.S., Pope, R.M., Haines, G.K., Zha, Y.Y., and Koch, A.E. (2005). Amelioration of rat adjuvant-induced arthritis by Met-RANTES. *Arthritis and rheumatism 52*, 1907-1919.

Shan, S., Hong-Min, T., Yi, F., Jun-Peng, G., Yue, F., Yan-Hong, T., Yun-Ke, Y., Wen-Wei, L., Xiang-Yu, W., Jun, M.*, et al.* (2011). New evidences for fractalkine/CX3CL1 involved in substantia nigral microglial activation and behavioral changes in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of aging 32*, 443-458.

Shattil, S.J., and Ginsberg, M.H. (1997). Integrin signaling in vascular biology. *The Journal of clinical investigation 100*, S91-95.

Sherer, T.B., Betarbet, R., Kim, J.H., and Greenamyre, J.T. (2003). Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease. *Neuroscience letters 341*, 87-90.

Shi, M., Bradner, J., Hancock, A.M., Chung, K.A., Quinn, J.F., Peskind, E.R., Galasko, D., Jankovic, J., Zabetian, C.P., Kim, H.M.*, et al.* (2011). Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson disease diagnosis and progression. *Annals of neurology 69*, 570-580.

Shigenaga, M.K., and Ames, B.N. (1991). Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free radical biology & medicine 10*, 211-216.

Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., and Suzuki, T. (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nature genetics 25*, 302-305.

Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Yoshikawa, M., Kitada, T., Matsumine, H., Asakawa, S., Minoshima, S., Yamamura, Y., Shimizu, N., and Mizuno, Y. (1999). Immunohistochemical and subcellular localization of Parkin protein: absence of protein in autosomal recessive juvenile parkinsonism patients. *Annals of neurology 45*, 668-672.

Shulman, Z., Cohen, S.J., Roediger, B., Kalchenko, V., Jain, R., Grabovsky, V., Klein, E., Shinder, V., Stoler-Barak, L., Feigelson, S.W.*, et al.* (2012). Transendothelial migration of lymphocytes mediated by intraendothelial vesicle stores rather than by extracellular chemokine depots. *Nature immunology 13*, 67-76.

Simmons, M.L., and Murphy, S. (1992). Induction of nitric oxide synthase in glial cells. *Journal of neurochemistry 59*, 897-905.

Simpson, J.E., Newcombe, J., Cuzner, M.L., and Woodroofe, M.N. (1998). Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta-chemokines by resident glia and inflammatory cells in multiple sclerosis lesions. *Journal of neuroimmunology 84*, 238-249.

Simpson, J.E., Newcombe, J., Cuzner, M.L., and Woodroofe, M.N. (2000). Expression of the interferon-gamma-inducible chemokines IP-10 and Mig and their receptor, CXCR3, in multiple sclerosis lesions. *Neuropathology and applied neurobiology 26*, 133-142.

Simunovic, F., Yi, M., Wang, Y., Macey, L., Brown, L.T., Krichevsky, A.M., Andersen, S.L., Stephens, R.M., Benes, F.M., and Sonntag, K.C. (2009). Gene expression profiling of substantia nigra dopamine neurons: further insights into Parkinson's disease pathology. *Brain : a journal of neurology 132*, 1795-1809.

Singh, S.P., Zhang, H.H., Foley, J.F., Hedrick, M.N., and Farber, J.M. (2008). Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *Journal of immunology 180*, 214-221.

Sirinathsinghji, D.J., Kupsch, A., Mayer, E., Zivin, M., Pufal, D., and Oertel, W.H. (1992). Cellular localization of tyrosine hydroxylase mRNA and cholecystokinin mRNA-containing cells in the ventral mesencephalon of the common marmoset: effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Brain research. Molecular brain research 12*, 267-274.

Skuljec, J., Sun, H., Pul, R., Benardais, K., Ragancokova, D., Moharregh-Khiabani, D., Kotsiari, A., Trebst, C., and Stangel, M. (2011). CCL5 induces a pro-inflammatory profile in microglia in vitro. *Cellular immunology 270*, 164-171.

Sofroniew, M.V. (2005). Reactive astrocytes in neural repair and protection. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry 11*, 400-407.

Sofroniew, M.V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in neurosciences 32*, 638-647.

Sofroniew, M.V., and Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica 119*, 7-35.

Sohmiya, M., Tanaka, M., Tak, N.W., Yanagisawa, M., Tanino, Y., Suzuki, Y., Okamoto, K., and Yamamoto, Y. (2004). Redox status of plasma coenzyme Q10 indicates elevated systemic oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of the neurological sciences 223*, 161-166.

Song, D.D., Shults, C.W., Sisk, A., Rockenstein, E., and Masliah, E. (2004). Enhanced substantia nigra mitochondrial pathology in human alpha-synuclein transgenic mice after treatment with MPTP. *Experimental neurology 186*, 158-172.

Sonsalla, P.K., and Heikkila, R.E. (1986). The influence of dose and dosing interval on MPTP-induced dopaminergic neurotoxicity in mice. *European journal of pharmacology 129*, 339-345.

Sorensen, T.L., Ransohoff, R.M., Strieter, R.M., and Sellebjerg, F. (2004). Chemokine CCL2 and chemokine receptor CCR2 in early active multiple sclerosis. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies 11*, 445-449.

Sorensen, T.L., Tani, M., Jensen, J., Pierce, V., Lucchinetti, C., Folcik, V.A., Qin, S., Rottman, J., Sellebjerg, F., Strieter, R.M., *et al.* (1999). Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *The Journal of clinical investigation 103*, 807-815.

Sorensen, T.L., Trebst, C., Kivisakk, P., Klaege, K.L., Majmudar, A., Ravid, R., Lassmann, H., Olsen, D.B., Strieter, R.M., Ransohoff, R.M.,

and Sellebjerg, F. (2002). Multiple sclerosis: a study of CXCL10 and CXCR3 co-localization in the inflamed central nervous system. *Journal of neuroimmunology 127*, 59-68.

Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature 388*, 839-840.

Spira, P.J., Sharpe, D.M., Halliday, G., Cavanagh, J., and Nicholson, G.A. (2001). Clinical and pathological features of a Parkinsonian syndrome in a family with an Ala53Thr alpha-synuclein mutation. *Annals of neurology 49*, 313-319.

Springer, T.A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature 346*, 425-434.

Springer, T.A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell 76*, 301-314.

Sriram, K., Miller, D.B., and O'Callaghan, J.P. (2006). Minocycline attenuates microglial activation but fails to mitigate striatal dopaminergic neurotoxicity: role of tumor necrosis factor-alpha. *Journal of neurochemistry 96*, 706-718.

Stichel, C.C., Augustin, M., Kuhn, K., Zhu, X.R., Engels, P., Ullmer, C., and Lubbert, H. (2000). Parkin expression in the adult mouse brain. *The European journal of neuroscience 12*, 4181-4194.

Stoessl, A.J., Martin, W.W., McKeown, M.J., and Sossi, V. (2011). Advances in imaging in Parkinson's disease. *Lancet neurology 10*, 987-1001.

Stojanovic, T., Bedke, J., Grone, H.J., Proudfoot, A.E., Becker, H., Markus, P., and Hecker, M. (2002). Met-RANTES inhibition of mucosal perfusion failure in acute intestinal transplant rejection - role of endothelial cell-leukocyte interaction. *Journal of vascular research 39*, 51-58.

Stone, D.K., Reynolds, A.D., Mosley, R.L., and Gendelman, H.E. (2009). Innate and adaptive immunity for the pathobiology of Parkinson's disease. *Antioxidants & redox signaling 11*, 2151-2166.

Stumbles, P.A., Strickland, D.H., Pimm, C.L., Proksch, S.F., Marsh, A.M., McWilliam, A.S., Bosco, A., Tobagus, I., Thomas, J.A., Napoli, S., *et al.* (2001). Regulation of dendritic cell recruitment into resting and inflamed airway epithelium: use of alternative chemokine receptors as a function of inducing stimulus. *Journal of immunology 167*, 228-234.

Su, X., Federoff, H.J., and Maguire-Zeiss, K.A. (2009). Mutant alpha-synuclein overexpression mediates early proinflammatory activity. *Neurotoxicity research 16*, 238-254.

Svenningsson, A., Andersen, O., Edsbagge, M., and Stemme, S. (1995). Lymphocyte phenotype and subset distribution in normal cerebrospinal fluid. *Journal of neuroimmunology 63*, 39-46.

Swanson, C.R., Joers, V., Bondarenko, V., Brunner, K., Simmons, H.A., Ziegler, T.E., Kemnitz, J.W., Johnson, J.A., and Emborg, M.E. (2011). The PPAR-gamma agonist pioglitazone modulates inflammation and induces neuroprotection in parkinsonian monkeys. *Journal of neuroinflammation 8*, 91.

Takahama, Y. (2006). Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nature reviews. Immunology 6*, 127-135.

Takahashi, M., Yamada, T., Nakajima, S., Nakajima, K., Yamamoto, T., and Okada, H. (1995). The substantia nigra is a major target for neurovirulent influenza A virus. *The Journal of experimental medicine 181*, 2161-2169.

Takahashi, N., Miner, L.L., Sora, I., Ujike, H., Revay, R.S., Kostic, V., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S., and Uhl, G.R. (1997). VMAT2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion, and enhanced MPTP toxicity. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America 94, 9938-9943.

Takeichi, M. (1993). Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Current opinion in cell biology 5*, 806-811.

Takeichi, M. (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Current opinion in cell biology 7*, 619-627.

Talpade, D.J., Greene, J.G., Higgins, D.S., Jr., and Greenamyre, J.T. (2000). In vivo labeling of mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) in rat brain using [(3)H]dihydrorotenone. *Journal of neurochemistry 75*, 2611-2621.

Tanaka, H., Park, C.H., Ninomiya, A., Ozaki, H., Takada, A., Umemura, T., and Kida, H. (2003). Neurotropism of the 1997 Hong Kong H5N1 influenza virus in mice. *Veterinary microbiology 95*, 1-13.

Taneja, V., and David, C.S. (1998). HLA transgenic mice as humanized mouse models of disease and immunity. *The Journal of clinical investigation 101*, 921-926.

Tani, M., Glabinski, A.R., Tuohy, V.K., Stoler, M.H., Estes, M.L., and Ransohoff, R.M. (1996). In situ hybridization analysis of glial fibrillary acidic protein mRNA reveals evidence of biphasic astrocyte activation during acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *The American journal of pathology 148*, 889-896.

Tatton, N.A., and Kish, S.J. (1997). In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining. *Neuroscience 77*, 1037-1048.

Tatton, N.A., Maclean-Fraser, A., Tatton, W.G., Perl, D.P., and Olanow, C.W. (1998). A fluorescent double-labeling method to detect and confirm apoptotic nuclei in Parkinson's disease. *Annals of neurology 44*, S142-148.

Taylor, D.J., Kemp, G.J., and Radda, G.K. (1994). Bioenergetics of skeletal muscle in mitochondrial myopathy. *Journal of the neurological sciences 127*, 198-206.

Tedla, N., Wang, H.W., McNeil, H.P., Di Girolamo, N., Hampartzoumian, T., Wakefield, D., and Lloyd, A. (1998). Regulation of T lymphocyte trafficking into lymph nodes during an immune response by the chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-1 alpha and MIP-1 beta. *Journal of immunology 161*, 5663-5672.

Teismann, P., Tieu, K., Choi, D.K., Wu, D.C., Naini, A., Hunot, S., Vila, M., Jackson-Lewis, V., and Przedborski, S. (2003). Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100*, 5473-5478.

Tessier-Lavigne, M., and Goodman, C.S. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science 274*, 1123-1133.

Thacker, E.L., O'Reilly, E.J., Weisskopf, M.G., Chen, H., Schwarzschild, M.A., McCullough, M.L., Calle, E.E., Thun, M.J., and Ascherio, A. (2007). Temporal relationship between cigarette smoking and risk of Parkinson disease. *Neurology 68*, 764-768.

Theodore, S., Cao, S., McLean, P.J., and Standaert, D.G. (2008). Targeted overexpression of human alpha-synuclein triggers microglial activation and an adaptive immune response in a mouse model of Parkinson disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology 67*, 1149-1158.

Thomas, B., von Coelln, R., Mandir, A.S., Trinkaus, D.B., Farah, M.H., Leong Lim, K., Calingasan, N.Y., Flint Beal, M., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2007). MPTP and DSP-4 susceptibility of substantia nigra and locus coeruleus catecholaminergic neurons in mice is independent of parkin activity. *Neurobiology of disease 26*, 312-322.

Ton, T.G., Heckbert, S.R., Longstreth, W.T., Jr., Rossing, M.A., Kukull, W.A., Franklin, G.M.,

Swanson, P.D., Smith-Weller, T., and Checkoway, H. (2006). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 21*, 964-969.

Turley, S.J., Fletcher, A.L., and Elpek, K.G. (2010). The stromal and haematopoietic antigen-presenting cells that reside in secondary lymphoid organs. *Nature reviews. Immunology 10*, 813-825.

Ubogu, E.E., Cossoy, M.B., and Ransohoff, R.M. (2006). The expression and function of chemokines involved in CNS inflammation. *Trends in pharmacological sciences 27*, 48-55.

Ulbrich, H., Eriksson, E.E., and Lindbom, L. (2003). Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. *Trends in pharmacological sciences 24*, 640-647.

Ungerstedt, U. (1968). 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *European journal of pharmacology 5*, 107-110.

Uversky, V.N., Li, J., and Fink, A.L. (2001). Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation. *The Journal of biological chemistry 276*, 10737-10744.

Uversky, V.N., Yamin, G., Munishkina, L.A., Karymov, M.A., Millett, I.S., Doniach, S., Lyubchenko, Y.L., and Fink, A.L. (2005). Effects of nitration on the structure and aggregation of alpha-synuclein. *Brain research. Molecular brain research 134*, 84-102.

van der Vliet, A., Eiserich, J.P., Halliwell, B., and Cross, C.E. (1997). Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *The Journal of biological chemistry 272*, 7617-7625.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology 3*, RESEARCH0034.

Vanguri, P. (1995). Interferon-gamma-inducible genes in primary glial cells of the central nervous system: comparisons of astrocytes with microglia and Lewis with brown Norway rats. *Journal of neuroimmunology 56*, 35-43.

Varastet, M., Riche, D., Maziere, M., and Hantraye, P. (1994). Chronic MPTP treatment reproduces in baboons the differential vulnerability of mesencephalic dopaminergic neurons observed in Parkinson's disease. *Neuroscience 63*, 47-56.

Vargas, M.R., Johnson, D.A., Sirkis, D.W., Messing, A., and Johnson, J.A. (2008). Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 28*, 13574-13581.

Vazquez-Claverie, M., Garrido-Gil, P., San Sebastian, W., Izal-Azcarate, A., Belzunegui, S., Marcilla, I., Lopez, B., and Luquin, M.R. (2009). Acute and chronic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administrations elicit similar microglial activation in the substantia nigra of monkeys. *Journal of neuropathology and experimental neurology 68*, 977-984.

Vila, M., Jackson-Lewis, V., Vukosavic, S., Djaldetti, R., Liberatore, G., Offen, D., Korsmeyer, S.J., and Przedborski, S. (2001). Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl- 4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98*, 2837-2842.

Vinet, J., de Jong, E.K., Boddeke, H.W., Stanulovic, V., Brouwer, N., Granic, I., Eisel, U.L., Liem, R.S., and Biber, K. (2010). Expression of CXCL10 in cultured cortical neurons. *Journal of neurochemistry 112*, 703-714.

Viola, A., and Luster, A.D. (2008). Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annual review of pharmacology and toxicology 48*, 171-197.

Viswanath, V., Wu, Y., Boonplueang, R., Chen, S., Stevenson, F.F., Yantiri, F., Yang, L., Beal, M.F., and Andersen, J.K. (2001). Caspase-9 activation results in downstream caspase-8 activation and bid cleavage in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 21*, 9519-9528.

Volles, M.J., and Lansbury, P.T., Jr. (2002). Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism. *Biochemistry 41*, 4595-4602.

Volles, M.J., and Lansbury, P.T., Jr. (2003). Zeroing in on the pathogenic form of alpha-synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease. *Biochemistry 42*, 7871-7878.

Volles, M.J., Lee, S.J., Rochet, J.C., Shtilerman, M.D., Ding, T.T., Kessler, J.C., and Lansbury, P.T., Jr. (2001). Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry 40*, 7812-7819.

Wahner, A.D., Sinsheimer, J.S., Bronstein, J.M., and Ritz, B. (2007). Inflammatory cytokine gene polymorphisms and increased risk of Parkinson disease. *Archives of neurology 64*, 836-840.

Wang, X., Ellison, J.A., Siren, A.L., Lysko, P.G., Yue, T.L., Barone, F.C., Shatzman, A., and Feuerstein, G.Z. (1998). Prolonged expression of interferon-inducible protein-10 in ischemic cortex after permanent occlusion of the middle cerebral artery in rat. *Journal of neurochemistry 71*, 1194-1204.

Wang, X., Li, X., Yaish-Ohad, S., Sarau, H.M., Barone, F.C., and Feuerstein, G.Z. (1999). Molecular cloning and expression of the rat monocyte chemotactic protein-3 gene: a possible role in stroke. *Brain research. Molecular brain research 71*, 304-312.

Wang, X., Yue, T.L., Barone, F.C., and Feuerstein, G.Z. (1995). Monocyte chemoattractant protein-1 messenger RNA expression in rat ischemic cortex. *Stroke; a journal of cerebral circulation 26*, 661-665; discussion 665-666.

Ward, S.G., and Marelli-Berg, F.M. (2009). Mechanisms of chemokine and antigen-dependent T-lymphocyte navigation. *The Biochemical journal 418*, 13-27.

Waxman, E.A., and Giasson, B.I. (2010). A novel, high-efficiency cellular model of fibrillar alpha-synuclein inclusions and the examination of mutations that inhibit amyloid formation. *Journal of neurochemistry 113*, 374-388.

Weaver, C.T., Harrington, L.E., Mangan, P.R., Gavrieli, M., and Murphy, K.M. (2006). Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity 24*, 677-688.

Webb, A., Johnson, A., Fortunato, M., Platt, A., Crabbe, T., Christie, M.I., Watt, G.F., Ward, S.G., and Jopling, L.A. (2008). Evidence for PI-3K-dependent migration of Th17-polarized cells in response to CCR2 and CCR6 agonists. *Journal of leukocyte biology 84*, 1202-1212.

Wild, D.G. (2005). The immunoassay Handbook.

Wilms, H., Rosenstiel, P., Sievers, J., Deuschl, G., Zecca, L., and Lucius, R. (2003). Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 17*, 500-502.

Wilson, E.H., Weninger, W., and Hunter, C.A. (2010). Trafficking of immune cells in the central nervous system. *The Journal of clinical investigation 120*, 1368-1379.

Wolfart, J., and Roeper, J. (2002). Selective coupling of T-type calcium channels to SK potassium channels prevents intrinsic bursting in dopaminergic midbrain neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 22*, 3404-3413.

Wright, J.A., Wang, X., and Brown, D.R. (2009). Unique copper-induced oligomers mediate alpha-synuclein toxicity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 23*, 2384-2393.

Wu, D.C., Jackson-Lewis, V., Vila, M., Tieu, K., Teismann, P., Vadseth, C., Choi, D.K., Ischiropoulos, H., and Przedborski, S. (2002). Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 22*, 1763-1771.

Wu, D.C., Teismann, P., Tieu, K., Vila, M., Jackson-Lewis, V., Ischiropoulos, H., and Przedborski, S. (2003). NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100*, 6145-6150.

Wu, X.F., Block, M.L., Zhang, W., Qin, L., Wilson, B., Zhang, W.Q., Veronesi, B., and Hong, J.S. (2005). The role of microglia in paraquat-induced dopaminergic neurotoxicity. *Antioxidants & redox signaling 7*, 654-661.

Wu, Y.R., Feng, I.H., Lyu, R.K., Chang, K.H., Lin, Y.Y., Chan, H., Hu, F.J., Lee-Chen, G.J., and Chen, C.M. (2007). Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism is associated with the risk of Parkinson's disease. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics 144B*, 300-304.

Xia, M.Q., Bacskai, B.J., Knowles, R.B., Qin, S.X., and Hyman, B.T. (2000). Expression of the chemokine receptor CXCR3 on neurons and the elevated expression of its ligand IP-10 in reactive astrocytes: in vitro ERK1/2 activation and role in Alzheimer's disease. *Journal of neuroimmunology 108*, 227-235.

Xia, M.Q., Qin, S.X., Wu, L.J., Mackay, C.R., and Hyman, B.T. (1998). Immunohistochemical study of the beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 and their ligands in normal and Alzheimer's disease brains. *The American journal of pathology 153*, 31-37.

Yamagata, K., Andreasson, K.I., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A., and Worley, P.F. (1993). Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron 11*, 371-386.

Yap, A.S., Brieher, W.M., and Gumbiner, B.M. (1997). Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annual review of cell and developmental biology 13*, 119-146.

Yoritaka, A., Hattori, N., Uchida, K., Tanaka, M., Stadtman, E.R., and Mizuno, Y. (1996). Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93*, 2696-2701.

Yousry, T.A., Major, E.O., Ryschkewitsch, C., Fahle, G., Fischer, S., Hou, J., Curfman, B., Miszkiel, K., Mueller-Lenke, N., Sanchez, E.*, et al.* (2006). Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy. *The New England journal of medicine 354*, 924-933.

Yuan, Q., Bromley, S.K., Means, T.K., Jones, K.J., Hayashi, F., Bhan, A.K., and Luster, A.D. (2007). CCR4-dependent regulatory T cell function in inflammatory bowel disease. *The Journal of experimental medicine 204*, 1327-1334.

Yurchenko, E., Tritt, M., Hay, V., Shevach, E.M., Belkaid, Y., and Piccirillo, C.A. (2006). CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4+ regulatory T cells to sites of

Leishmania major infection favors pathogen persistence. *The Journal of experimental medicine 203*, 2451-2460.

Zalcman, S., Green-Johnson, J.M., Murray, L., Nance, D.M., Dyck, D., Anisman, H., and Greenberg, A.H. (1994). Cytokine-specific central monoamine alterations induced by interleukin-1, -2 and -6. *Brain research 643*, 40-49.

Zeng, B.Y., Bukhatwa, S., Hikima, A., Rose, S., and Jenner, P. (2006). Reproducible nigral cell loss after systemic proteasomal inhibitor administration to rats. *Annals of neurology 60*, 248-252.

Zhang, H.H., Song, K., Rabin, R.L., Hill, B.J., Perfetto, S.P., Roederer, M., Douek, D.C., Siegel, R.M., and Farber, J.M. (2010a). CCR2 identifies a stable population of human effector memory CD4+ T cells equipped for rapid recall response. *Journal of immunology 185*, 6646-6663.

Zhang, L., Shimoji, M., Thomas, B., Moore, D.J., Yu, S.W., Marupudi, N.I., Torp, R., Torgner, I.A., Ottersen, O.P., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2005a). Mitochondrial localization of the Parkinson's disease related protein DJ-1: implications for pathogenesis. *Human molecular genetics 14*, 2063-2073.

Zhang, Q., Raoof, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., and Hauser, C.J. (2010b). Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature 464*, 104-107.

Zhang, S.X. (1999). An Atlas of Histology.

Zhang, W., Phillips, K., Wielgus, A.R., Liu, J., Albertini, A., Zucca, F.A., Faust, R., Qian, S.Y., Miller, D.S., Chignell, C.F.*, et al.* (2011). Neuromelanin activates microglia and induces degeneration of dopaminergic neurons: implications for progression of Parkinson's disease. *Neurotoxicity research 19*, 63-72.

Zhang, W., Wang, T., Pei, Z., Miller, D.S., Wu, X., Block, M.L., Wilson, B., Zhang, W., Zhou, Y., Hong, J.S., and Zhang, J. (2005b). Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 19*, 533-542.

Zhang, Y., Gao, J., Chung, K.K., Huang, H., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2000). Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97*, 13354-13359.

Zheng, B., Liao, Z., Locascio, J.J., Lesniak, K.A., Roderick, S.S., Watt, M.L., Eklund, A.C., Zhang-James, Y., Kim, P.D., Hauser, M.A.*, et al.* (2010). PGC-1alpha, a potential therapeutic target for early intervention in Parkinson's disease. *Science translational medicine 2*, 52ra73.

Zielasek, J., and Hartung, H.P. (1996). Molecular mechanisms of microglial activation. *Advances in neuroimmunology 6*, 191-122.

Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Uitti, R.J., Calne, D.B.*, et al.* (2004). Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron 44*, 601-607.

Zlotnik, A. (2006). Involvement of chemokine receptors in organ-specific metastasis. *Contributions to microbiology 13*, 191-199.