



**HAL**  
open science

# Contrôle de l'activation microgliale par les lymphocytes T dans un modèle murin de neurodégénérescence induite par la 6-OHDA

Josselin Uhrich

► **To cite this version:**

Josselin Uhrich. Contrôle de l'activation microgliale par les lymphocytes T dans un modèle murin de neurodégénérescence induite par la 6-OHDA. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10139 . tel-01127362

**HAL Id: tel-01127362**

**<https://theses.hal.science/tel-01127362>**

Submitted on 7 Mar 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.

Année 2014

THÈSE DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

ÉCOLE DOCTORALE

**Neurosciences et Cognition (NSCo)**

DIPLÔME DE DOCTORAT

**Soutenu publiquement le 02 juillet 2014**

par

**UHLRICH Josselin**

**CONTRÔLE DE L'ACTIVATION MICROGLIALE PAR  
LES LYMPHOCYTES T DANS UN MODÈLE MURIN DE  
NEURODÉGÉNÉRESCENCE INDUITE PAR LA 6-OHDA**

Directeur de thèse :

**Professeur Serge NATAF**

Co-Directrice de thèse :

**Docteur Monique TOURET**

Membres du Jury :

**Pr. José BOUCRAUT** (Rapporteur)

**Pr. Sylviane PIED** (Rapporteur)

**Dr Guillaume DOROTHÉE** (Examineur)

**Pr. Emmanuel BROUSSOLLE** (Président du jury et examinateur)

**Dr. Monique TOURET**

**Pr. Serge NATAF**



## UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON 1

### **Président de l'Université**

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Études et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

**M. François-Noël GILLY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

### **COMPOSANTES SANTÉ**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

### **COMPOSANTES ET DÉPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

École Supérieure de Chimie Physique Électronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. C. VITON

École Supérieure du Professorat et de l'Éducation

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE



*À mes parents, pour leur grand soutien jusqu'au bout, même à des heures sombres/impossibles, mes frères et sœur, ma famille, mes amis, et au polymorphisme MTHFR C677T, sans qui je n'en serais sûrement pas là. Merci pour leurs apports au quotidien, sous toutes leurs formes.*

*À tous ceux qui y ont cru. Et aux autres.*

*In memoriam Pr. Claude LAPRAS.*

*Aut agere aut mori, aequiter, sapienter. Adsum.*

*I only hope that we never lose sight of one thing – that it was all started by a mouse.*

*- Walter « Walt » Elias Disney -*



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement les membres de ce jury de thèse, M<sup>me</sup> **Sylviane Pied**, M. **José Boucraut**, les rapporteurs de ce travail, ainsi que MM. **Emmanuel Broussolle** et **Guillaume Dorothée** pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse et de siéger dans ce jury. Je leur adresse toute ma profonde reconnaissance.

Je tiens également à remercier plus particulièrement mes co-directeurs de thèse, pour leurs connaissances et leurs savoirs techniques et pratiques, ainsi que leur grande bienveillance et leur soutien indéfectible tout au long de cette aventure. Jamais je n'oublierai ces quelques années passées sous leur direction.

**Serge Nataf.** Tu m'as fait le très grand honneur de m'accorder ta confiance en m'acceptant en thèse alors que rien ne présidait logiquement à un tel choix. Par la suite, ta patience eu égard à mes nombreuses sollicitations, et ton éclairage scientifique au cours de nos conversations m'ont permis d'avancer dans ce tout nouveau domaine qu'était pour moi la neuro-immunologie. Ta « zenitude » renforcée par une grande efficacité, m'ont été d'un grand soutien dans des moments parfois difficiles. À nos sessions de travail savamment équilibrées par des moments de détente.

**Monique Touret.** Vous m'avez apporté au cours de ces années un très grand soutien technique et scientifique, mais aussi et surtout humain, suppléant au besoin aux lacunes et manquements. Vous avez su passer outre ma novicité dans le domaine et dans le milieu de la recherche et vous montrer présente à chaque fois que la situation le demandait, ce qui m'a permis d'étendre rapidement et de manière efficace mes connaissances et compétences. Un grand merci pour votre très grande disponibilité et votre implication dans ce travail. À nos moments de travail dans une atmosphère agréable et naturelle.

Aux membres du laboratoire, et plus particulièrement, **Chantal, Pascale, Laurent P., Claire B., Anne G., Josiane, Sylvie, Naura, Claire M., Jean-François, Nathalie, Roger, Natalie**, et les autres. Vous êtes l'âme du laboratoire, et c'est par vous qu'il a été un endroit où j'ai tant aimé évoluer.

Aux amis/copains du labo : **Angélique** et **Milica**, les « étincelles » de départ, et particulièrement **Alice**. Mais aussi **Iness, Sandrine, Jessica, Anaïd, Pierre, Romain, Marie, Stéphanie, Aubin, Ingrid, Charlotte, Aude, Laurent M., Élodie, Anda, Nicolas, Anne R., Marie-Ève, Alicia, Bastien, Chloé, Aurélien, Céline M., Olivier, Adeline**. Pour ces petits riens qui font un tout. Les délires, les conversations, les confidences, ou les simples échanges : ce qui me lie à vous est unique.

Aux ami(e)s : **Cédric « Alex », Saphir, Laurent N., Iness, Audran**. Vous avez œuvré dans la même direction, afin de me mener là où j'en suis. Les amis sont comme les bons vins : rares et précieux... Et je ne terminerai pas par une blague.

Et bien entendu, **Elle, Elle** et **Elle** aussi, ayant contribué, chacune à leur façon, parfois regrettable, voire tragique, mais toujours enrichissante, à ce que j'écrive ces pages.

Je tiens en dernier lieu à remercier sincèrement **Jérôme Honorat**, pour son accueil au sein du laboratoire, et pour m'avoir fait confiance pendant ces années de thèse. Je lui assure ici mon profond respect et ma gratitude.

## **Résumé**

Ce travail de thèse décrit et analyse la réaction neuro-inflammatoire accompagnant la mort cellulaire neuronale dans un modèle murin de la maladie de Parkinson. Dans ce modèle, induit par l'injection intrastriatale d'un analogue toxique de la dopamine, la 6-hydroxydopamine (6-OHDA), nous décrivons les caractéristiques et la cinétique de l'activation microgliale, de l'infiltration lymphocytaire T, de la perte de neurones dopaminergiques TH<sup>+</sup> (Tyrosine Hydroxylase) et des altérations du comportement moteur. Nos observations sont complétées par une étude neuropathologique de la substance noire chez des patients atteints de maladie de Parkinson. Les résultats montrent que, chez l'homme comme chez la souris, la mort de neurones dopaminergiques induit une infiltration T de faible intensité, limitée à la substance noire et s'accompagnant d'une activation microgliale. Dans un deuxième temps, nous analysons l'impact d'une déficience lymphocytaire T génétiquement déterminée sur les paramètres histologiques et fonctionnels caractérisant le modèle 6-OHDA. Nos résultats montrent que, comparées à des souris contrôles immunocompétentes, les souris immunodéficientes de souche Foxn1 KO, CD3 KO, NOD SCID ou RAG1 KO présentent toutes, à des degrés divers, une susceptibilité significativement accrue aux effets neurotoxiques de la 6-OHDA. L'aggravation observée de la perte neuronale s'accompagne d'une accentuation majeure des troubles du comportement moteur et de l'activation microgliale. Ce travail démontre l'importance de la neuro-inflammation et de l'immunité adaptative dans la physiopathologie du modèle 6-OHDA. Il suggère également que les LyT infiltrant la substance noire des patients atteints de maladie de Parkinson exercent un rôle inhibiteur sur l'activation microgliale et pourraient par ce mécanisme ralentir l'évolution de la perte neuronale dopaminergique. En résumé, ce travail de thèse apporte un ensemble de données originales sur les interactions entre LyT, microglie et neurones dopaminergiques dans le contexte de la maladie de Parkinson et du modèle murin 6-OHDA.

### **Control of microglial activation by T-cells in a murine model of 6-OHDA-induced dopaminergic neurodegeneration**

## **Abstract**

This thesis work describes and analyzes the neuroinflammatory reaction that accompanies neuronal cell death in a murine model of Parkinson's disease. In this model, induced by the intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA), a toxic dopamine analog, we report on the main features and kinetics of microglial activation, T-cell infiltration, loss of TH<sup>+</sup> (Tyrosine Hydroxylase) dopaminergic neurons and motor behavior alterations. We also assessed the presence of T-cells in the substantia nigra of Parkinson's disease patients and found that, as observed in the 6-OHDA murine model, the neuronal cell death of dopaminergic neurons triggers a low-grade T-cell infiltration that accompanies microglial activation. We then studied the impact of genetically-determined T-cell immunodeficiency on histological and functional outcomes in the 6-OHDA model. Our results show that, as compared to immunocompetent control mice, immunodeficient strains consisting in Foxn1 KO, CD3 KO, NOD SCID or RAG KO mice consistently presented, at varied levels, a highest susceptibility to 6-OHDA induced dopaminergic neurodegeneration. The observed accentuation of neuronal cell loss was accompanied by a marked increase of microglial activation and motor behavior alterations. Our work demonstrates the pathophysiological role of neuroinflammation and adaptive immunity in the 6-OHDA model. It also suggests that T-cells infiltrating the substantia nigra of Parkinson's disease patients dampen microglial activation and could, via this inhibitory effect, slow the progression of dopaminergic cell loss. Overall this thesis work provides original data on the interactions between T-cells, microglia and dopaminergic neurons in the context of Parkinson's disease and the murine 6-OHDA model.

**DISCIPLINE** – Neurosciences

### **MOTS-CLÉS/KEYWORDS**

Neurodégénérescence, Inflammation, 6-OHDA, Microglie, Substance Noire, Lymphocytes T, maladie de Parkinson.

Neurodegeneration, Inflammation, 6-OHDA, Microglia, Substantia Nigra, T-cells, Parkinson's disease.

**Inserm U1028 CNRS UMR 5292, Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, Equipe ONCOFLAM (J.HONNORAT), Faculté de médecine RTH Laënnec, 7-11 rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon Cedex 08**



## Liste des Abréviations

4-HNE : 4-Hydroxynonenal

6-OHDA : 6-Hydroxydopamine

ADN : Acide Désoxyribonucléique

Ag : Antigène

ALCAM : Activated Leucocyte Cell Adhesion Molecule

APoE : Apolipoprotéine E

ATP : Adénosine-5'- Triphosphate

ATP13A2 : ATPase type 13A2

ATV : Aire tegmentale ventrale

BDNF : Brain-Derived NeurotrophicFactor

BHE : Barrière hémato-encéphalique

CCR2 : Récepteur 2 à la chimiokine C-C

CD : Cluster of differentiation (marqueurs de surface)

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

Cop-1 : Copolymère-1

COX : Cyclo-oxygénase

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CX3CR1 : Récepteur 1 à la chimiokine CX3C

D3R : Récepteurà dopamine D3

DAMP : Danger Associated Molecular Patterns

DAT : Transporteur de la dopamine

DC : Cellule dendritique

DN : Double Négatif.

EAE : Encéphalomyélite auto-immune expérimentale

ENO : Encéphalite due au virus du Nil occidental

Fc : Fragment constant des immunoglobulines

Foxp3 : Forkhead box P3

GABA : Acide  $\gamma$ -aminobutyrique

GBA :  $\beta$ -glucocérébrosidase

GDNF : Glial cell line-derived neurotrophic factor

GFAP : Glial fibrillary acidic protein

Gfi-1 : Growth factor independent 1

GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

GWAS : Genome-wide association study

HLA-DRA : Human Leukocyte Antigen-DR alpha chain

IBA1 : Ionized calcium binding adaptor molecule 1

IBP : IRF-4 binding protein

iC3b : Inactivated C3b

ICAM : Inter -Cellular adhesion molecule

IFN : Interferon

*IFNG* : gène codant pour l'IFN- $\gamma$

IgE : Immunoglobuline E

IL : Interleukine

iNOS : Inducible Nitric oxide synthase

IRF4 : Interferon regulatory factor 4

iTregs : Lymphocytes T régulateurs induits

KO : Knock-Out

LCR : Liquide céphalo-rachidien

L-DOPA : L-3,4-dihydroxyphenylalanine

*LRRK2* : Leucine-rich repeat kinase 2

LT $\alpha$  : Lymphotoxine  $\alpha$

LyT : Lymphocyte T

MA-B : Monoamine oxydase B

MP : Maladie de Parkinson

MPDP : 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridium

MPP<sup>+</sup> : Ion 1-methyl-4-phenylpyridium

MPTP : 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tétrahydropyridine

NFAT : Nuclear factor of activated T-cells

NGF : Nerve growth factor

NIH : National Institute of Health

NK : Natural killer

NT-3 : Neurotrophin-3

nTregs : Lymphocytes T régulateurs naturels

PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns

PECAM : Platelet endothelial cell adhesion molecule

*PINK1* : PTEN-induced putative kinase 1 gene

PPR : Pattern Recognition Receptors

*RAG* : Recombination activating gene

ROR $\gamma$ T : Retinoid-related orphan receptor  $\gamma$ T

ROS : Dérivés réactifs de l'oxygène

Runx3 : Runt-related transcription factor 3

SEP : Sclérose en plaques

SLA : Sclérose latéral amyotrophique

SN : Substance noire

SNC : Système nerveux central

*SNCA* : Synuclein, alpha

SNP : Single nucleotide polymorphisms

SNpc : Substance noire pars compacta

SNpr : Substance noire pars reticulata

SOD : Superoxyde Dismutases

SOP : Research-Specific Standard Operating procedures

STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3

TCR : T cell receptor

Tcrb : T-cell receptor  $\beta$ -chain

TEP : Tomographie par émission de positrons

Teffs : Lymphocytes T effecteurs

TGF : Transforming Growth Factor

Tgfb1 : Transforming Growth Factor, Beta 1

TH : Tyrosine Hydroxylase

Th : Lymphocyte T helper

TLR : Toll-like receptor

TNF : Tumor necrosis factor

Tregs : Lymphocytes T régulateurs

VCAM : Vascular cell adhesion protein

VIH : Virus de l'immunodéficience Humaine

VIHE : Encéphalite due au VIH

# SOMMAIRE

<b>PARTIE I</b>	17
<b>Introduction</b>	19
<b>Rappels bibliographiques</b>	21
<b>I. Immunité &amp; Neuro-inflammation</b>	21
<b>I.1. Immunité innée et phagocytes mononucléés</b>	21
<b>I.2. Immunité adaptative et sous-populations lymphocytaires T</b>	26
a. Origine et maturation des LyT	26
b. Différenciation et sous-populations lymphocytaires Th	27
<b>I.3. Neuro-inflammation</b>	34
a. Le cerveau, un site immunoprivilégié aux privilèges contestés	34
b. La microglie, cellule immune sentinelle du SNC	37
c. les LyT infiltrants	42
<b>II. La maladie de Parkinson</b>	51
<b>II.1 Symptomatologie</b>	52
a. Troubles du contrôle moteur	52
b. Troubles associés	53
c. Neuropathologie	53
<b>II.2. Étiologie</b>	56
a. Facteurs génétiques	56
b. Facteurs environnementaux	57
c. Les traumatismes crâniens	59
d. L'origine infectieuse	59



<b>II.3 Réponses neuro-immunes et maladie de Parkinson.</b>	<b>60</b>
a. Activation des cellules microgliales	61
b. Rôle des signaux instructeurs lymphocytaires	62
c. Rôle de l'alpha-synucléine	63
d. Rôle des signaux immuns périphériques	64
e. Implication des LyT	65
f. Implication d'autres populations lymphocytaires	657
<b>II.4. Le système dopaminergique</b>	<b>70</b>
a. Voies dopaminergiques mésencéphaliques	70
b. Les neurones dopaminergiques	71
c. Principales fonctions des systèmes dopaminergiques mésencéphaliques	73
<b>II.5. Modèles animaux de la maladie de Parkinson</b>	<b>74</b>
a. Modèles génétiques	75
b. Modèles induits par des pesticides	78
c. Modèles induits par des neurotoxines	79
<b>PARTIE II</b>	<b>87</b>
<b>I.1. Introduction de l'article 1: <i>Mapping and kinetics of microglia/neuron cell-to-cell contacts in the 6-OHDA murine model of Parkinson's disease.</i></b>	<b>89</b>
<b>I.2. Introduction de l'article 2 : <i>T-cell deficient mice are highly susceptible to 6-OHDA-induced dopaminergic neurodegeneration.</i></b>	<b>91</b>
<b>II.1. ARTICLE 1</b>	<b>95</b>
<b>II.2. ARTICLE 2</b>	<b>129</b>
<b>II.3. Résultats complémentaires</b>	<b>163</b>
<b>III. DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>167</b>
<b>IV. BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>191</b>



# **PARTIE I**



## Introduction

Longtemps considéré comme un site immunoprivilégié, on sait actuellement que le Système Nerveux Central peut être le siège de réactions immunes complexes dont les répercussions sur la survie et les fonctions neuronales sont potentiellement majeures. Les cellules microgliales constituent la population résidente de cellules phagocytaires dans le parenchyme nerveux et forment la première ligne de défense immunitaire au sein du système nerveux central (SNC). Comme dans tous les organes, des perturbations quantitatives et/ou qualitatives du système phagocytaire peuvent entraîner un déséquilibre important de l'homéostasie tissulaire du SNC. Des mécanismes impliquant l'immunité innée et, plus spécifiquement, les cellules du système des phagocytes mononucléés (macrophages dérivant du sang et cellules microgliales résidentes) sont en effet impliqués dans la physiopathologie de maladies neurologiques classiquement identifiées comme purement neurodégénératives. C'est le cas notamment de la maladie d'Alzheimer, de la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) et de la maladie de Parkinson (MP). Par ailleurs, alors que l'incidence et la prévalence de ces pathologies augmentent du fait de l'augmentation de l'espérance de vie et de la plus grande efficacité des thérapies symptomatiques, il n'existe pas à ce jour, de traitement étiologique de ces maladies.

Dans les maladies neurodégénératives, différents mécanismes autonomes de mort neuronale ont été mis en évidence. Ils touchent notamment le fonctionnement de la mitochondrie et les processus d'ubiquitination et de protéolyse des protéines mal conformées. Toutefois, les mécanismes non-autonomes, liés à l'environnement, jouent également un rôle important. En particulier, l'environnement immunitaire des neurones, façonné par les cellules microgliales, les macrophages dérivés du sang ainsi que les astrocytes, détermine pour partie l'évolution des processus de mort neuronale qui peuvent être amplifiés ou inhibés, selon la nature et l'amplitude de cette réaction immunitaire. Un certain nombre d'études sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle le système immunitaire contribuerait de manière significative à la physiopathologie de la MP.

Une activation microgliale majeure accompagnée d'un infiltrat lymphocytaire T dans des prélèvements autopsiques de la structure cible dopaminergique (substance

noire) de patients Parkinsoniens a été mise en évidence. Par ailleurs, une susceptibilité spécifique des neurones dopaminergiques aux mécanismes de mort cellulaire immuno-induits a été observée *in vitro*. Enfin, les effets directement neurotoxiques des LyT CD4 infiltrant la substance noire ainsi que l'importance physiopathologique de l'activation microgliale a été démontrée, dans un modèle murin de MP induit par intoxication au 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP).

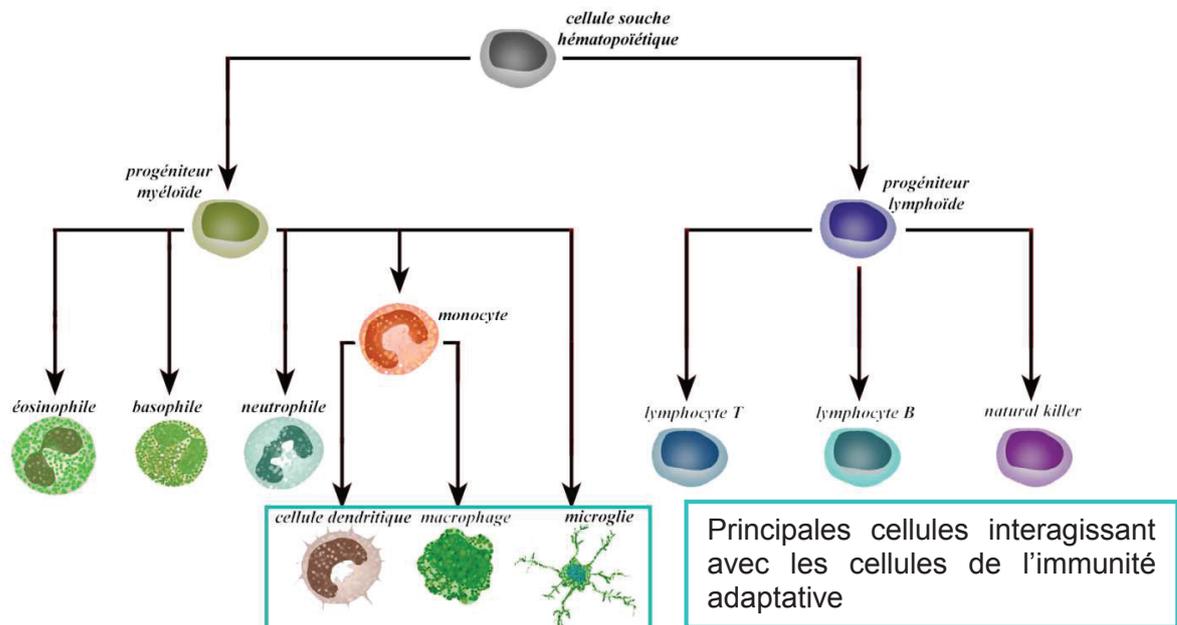
Dans ce contexte, notre objectif de thèse était de mieux caractériser l'impact des interactions entre lymphocytes T (LyT), cellules microgliales et neurones dopaminergiques dans un modèle murin jusqu'alors peu utilisé : le modèle d'injection intracérébrale stéréotaxique d'un analogue toxique de la dopamine, la 6-hydroxydopamine (6-OHDA). Dans une première étude, nous avons caractérisé la cinétique d'activation microgliale en lien avec la cinétique de mort neuronale, mettant ainsi en évidence une corrélation entre l'activation microgliale et la mort des neurones dopaminergiques, ainsi que différents types de contacts inter-cellulaires microglie/neurones. Dans une seconde approche, nous avons réalisé une analyse approfondie de l'implication des LyT sur l'activation microgliale ce qui constitue l'essentiel du travail expérimental présenté dans ce manuscrit de thèse. Par ailleurs, une étude sur coupes humaines de cerveaux de patients parkinsoniens a permis une comparaison des données immunopathologiques obtenues avec celles observées chez la souris, dans le modèle 6-OHDA. Les principaux résultats obtenus suggèrent un rôle potentiellement protecteur des LyT dans la physiopathologie de ce modèle et, possiblement, de la MP.

### I. Immunité & Neuro-inflammation

#### I.1. Immunité innée et phagocytes mononucléés

Les cellules de l'immunité innée forment une large famille de cellules immunes dont les principales fonctions sont la phagocytose, la présentation antigénique et la synthèse de molécules inflammatoires. Ces cellules constituent la première ligne de défense immunitaire de l'organisme et leur activation est mise en jeu à l'échelle de minutes ou d'heures ou cours de la grande majorité des réponses immunes. Longtemps considérées comme non discriminantes du fait de leur incapacité à reconnaître des antigènes, on sait maintenant que les cellules de l'immunité innée sont richement équipées en récepteurs, les PRR ("Pattern Recognition Receptors") ; qui reconnaissent des patterns moléculaires extrêmement variés associés à des pathogènes, les PAMP ("Pathogen Associated Molecular Patterns") ou à des situations de danger, les DAMP ("Danger Associated Molecular Patterns") (Matzinger, 2002). De même, les cellules immunes innées sont capables d'une certaine forme de mémoire immune via le phénomène d'entraînement immunitaire ("trained immunity") (Quintin *et al.*, 2014). Toutes les cellules de l'immunité innée proviennent de progéniteurs myéloïdes, eux-mêmes issus de cellules souches hématopoïétiques. Nous restreindrons notre propos aux phagocytes mononucléés et plus spécifiquement aux 2 catégories cellulaires qui forment la majorité des cellules myéloïdes infiltrant le SNC dans la plupart des situations neuro-inflammatoires : les macrophages et les cellules microgliales.

Ces différents lignages cellulaires sont regroupés et synthétisés dans la figure suivante.



Les **monocytes circulants** représentent environ 2% à 10% des leucocytes chez l'homme et constituent les principaux précurseurs des macrophages tissulaires. Ils sont formés de deux grandes catégories : i) les **monocytes homéostatiques** assurant le renouvellement lent et constant de la majeure partie des macrophages résidents, ii) les **monocytes inflammatoires** qui se différencient en macrophages infiltrants et dont le nombre dans le sang augmente en situation inflammatoire (Geissmann, Jung & Littman, 2003; Auffray, Sieweke & Geissmann, 2009). Ces deux sous-populations présentent le même potentiel de différenciation en cellules dendritiques (DC) mais des comportements migratoires différents essentiellement déterminés par le niveau d'expression des récepteurs à chimiokines CX3CR1, fortement exprimé par les monocytes homéostatiques, et CCR2, fortement exprimé par les monocytes inflammatoires. Les **macrophages résidents** sont les macrophages qui, en situation d'homéostasie, résident dans les tissus de l'ensemble des organes. Les macrophages résidents présentent tous à divers degrés des propriétés de phagocytose et un potentiel cytotoxique. Néanmoins, ils forment une population hétérogène au sein de laquelle on note d'importantes différences quant à la morphologie, l'origine, les mécanismes de renouvellement et les réponses

immunes engagées. Ainsi, les cellules microgliales, macrophages résidents localisés dans le parenchyme du SNC, présentent de nombreuses différences fonctionnelles et phénotypiques avec les cellules de Kupffer, macrophages intravasculaires localisés dans le foie (Hume, 2006; Geissmann *et al.*, 2010; Gautier *et al.*, 2012; Lavin & Merad, 2013). Par ailleurs, de récents travaux montrent que certaines populations de macrophages résidents, en particulier la microglie et les cellules de Kupffer, dérivent de progéniteurs myéloïdes primitifs initialement localisés dans le sac vitellin et qui persistent dans le tissu cible, respectivement le SNC et le foie, après le développement (Schulz *et al.*, 2012; Kierdorf *et al.*, 2013). Ces macrophages ne sont que peu ou pas renouvelés par des monocytes circulants mais voient leur nombre régulé par un mécanisme de prolifération *in situ* des progéniteurs primitifs dont ils dérivent (Ginhoux *et al.*, 2010; Schulz *et al.*, 2012; Kierdorf *et al.*, 2013). Contrairement aux macrophages résidents, les **macrophages infiltrants** dérivent de précurseurs sanguins, les monocytes inflammatoires et nécessitent qu'un signal inflammatoire intra-tissulaire dirige leur différenciation macrophagique à partir de précurseurs monocytaires.

La fonction première des macrophages résidents et infiltrants est la clairance de cellules mortes, de débris tissulaires et d'agrégats moléculaires potentiellement toxiques. Dans le SNC, l'élimination de débris myéliniques est ainsi un préalable indispensable à la réparation tissulaire faisant suite à un épisode démyélinisant (Takahashi *et al.*, 2007). De la même façon, la clairance macrophagique/microgliale d'agrégats de protéines amyloïdes est un mécanisme de défense important au cours de la maladie d'Alzheimer (Rogers *et al.*, 2002). Une autre fonction essentielle des macrophages résidents ou infiltrants est la présentation d'antigènes aux LyT. Alors que les DC (DC) ont été considérées pendant de longues années comme les seules cellules capables de présenter l'antigène de manière efficace et "professionnelle" aux LyT, il apparaît que distinguer macrophages et DC sur la seule base de cette fonction ne reflète qu'imparfaitement la réalité (Geissmann *et al.*, 2010). Une autre caractéristique majeure des macrophages est leur grande plasticité fonctionnelle et leur capacité à engager un large éventail de **programmes d'activation** en réponse aux signaux instructeurs de l'environnement tissulaire (Mantovani, Sica & Locati, 2005). Cette polarisation fonctionnelle a tout d'abord été décrite comme bimodale, suivant un schéma fonctionnel similaire aux sous-populations LyT helper Th1 et Th2

(Cf. *infra*). On distinguait ainsi, les macrophages M1 et les macrophages M2 sur la base des critères suivants : i) le profil M1, induit par l'IFN $\gamma$  et résultant en une majoration des activités cytotoxiques, bactéricides, pro-inflammatoires et de présentation antigénique et ii) le profil M2, induit notamment par l'IL-4 et résultant en une majoration de la synthèse de facteurs angiogéniques, trophiques et anti-inflammatoires (Sica & Mantovani, 2012). Par la suite, cette classification s'est considérablement enrichie et l'on considère actuellement qu'à chaque pathologie est associé un programme d'activation macrophagique spécifique qui, selon les cas, est délétère ou protecteur (Sica & Mantovani, 2012). Toutefois, retenons que les macrophages de type M1 induits par l'IFN $\gamma$  produisent de l'IL12, de l'IL23 et des dérivés oxygénés, qu'ils favorisent les réponses Th1 et jouent un rôle majeur dans l'élimination des pathogènes intracellulaires et des tumeurs (Coscia *et al.*, 2010; Rogers & Holen, 2011; Díaz-Gandarilla *et al.*, 2013). À l'opposé, les macrophages de type M2, induits par l'IL4 (Pechkovsky *et al.*, 2010), ont une activité immunomodulatrice, produisent de l'IL10 et du TGF $\beta$  (Ferrante & Leibovich, 2012) et sont impliqués dans les processus de développement et de réparation tissulaire (Benoit, Desnues & Mege, 2008; Qian & Pollard, 2010).

#### **En résumé :**

- Les **cellules de l'immunité innée** forment la **première ligne de défense** immunitaire de l'organisme et leur activation est **très rapide** au cours de la majorité des réponses immunes.
- Ces cellules sont richement équipées en **récepteurs** et sont capables d'une certaine forme de **mémoire**.
- La majorité des **cellules myéloïdes**, dont font partie les cellules de l'immunité innée comme les **macrophages** et la **microglie**, sont impliquées dans la plupart des situations **neuro-inflammatoires** au sein du SNC.
- Les **monocytes circulants homéostatiques** assurent le renouvellement de la majeure partie des macrophages résidents, tandis que les **monocytes circulants inflammatoires**, se différencient en macrophages sanguins.

- La microglie, **macrophage résident**, dérive de progéniteurs myéloïdes primitifs initialement localisés dans le sac vitellin et persiste dans le SNC. Elle présente des propriétés de **phagocytose** et un potentiel **cytotoxique**.
- Les **macrophages infiltrants**, dérivants des monocytes inflammatoires, nécessitent qu'un signal inflammatoire intra-tissulaire dirige leur différenciation macrophagique à partir de précurseurs monocytaires.
- Les macrophages résidents et infiltrants ont pour fonction : la **clairance** de cellules mortes, de débris tissulaires et d'agrégats moléculaires potentiellement toxiques, préalable indispensable à la **réparation tissulaire**, ainsi que la **présentation d'antigènes** aux LyT, grâce à différents **programmes d'activation**, délétères ou protecteurs, en **réponse** aux signaux instructeurs de l'environnement tissulaire.
- Les macrophages de type **M1** favorisent les réponses **Th1** et jouent un rôle majeur dans l'**élimination** des pathogènes intracellulaires et des tumeurs, et les macrophages de type **M2** sont impliqués dans les processus de développement et de **réparation tissulaire**.

## I.2. Immunité adaptative et sous-populations lymphocytaires T

La réponse de l'immunité adaptative se développe *a posteriori* de la réponse immune innée et repose sur deux grandes catégories de cellules immunes dérivant d'un progéniteur lymphoïde commun : les lymphocytes B et les Lymphocytes T. Le sujet étant très vaste, nous n'envisagerons que les aspects fonctionnels et phénotypiques généraux et/ou présentant un lien direct avec la thématique des interactions entre macrophages/microglie et LyT.

### a. Origine et maturation des LyT

La production et la maturation de LyT sont assurées par les deux organes lymphoïdes primaires que sont la moelle osseuse et le thymus. Les progéniteurs lymphoïdes issus des cellules souches hématopoïétiques quittent la moelle osseuse et pénètrent dans le thymus où ils se divisent jusqu'à générer une large population de thymocytes immatures (Schwarz & Bhandoola, 2006). Les thymocytes subissent une première phase de maturation au cours de laquelle ils n'expriment pas les marqueurs CD4 et CD8. On parle de lymphocytes doubles négatifs ou DN. Schématiquement, durant cette phase, trois étapes sont distinguées en fonction du niveau d'expression de CD44 (une molécule d'adhérence), CD3 (la molécule de signalisation du récepteur T) et CD25 (le récepteur à l'IL-2): on parle de lymphocytes (ou thymocytes) DN1, DN2 et DN3. Au cours d'une deuxième phase de maturation, les lymphocytes co-expriment CD4, CD8 et les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du récepteur T. Cette phase est caractérisée par un processus de **sélection positive** qui se produit dans le cortex thymique et conduit à la mort cellulaire par apoptose des lymphocytes présentant une trop faible affinité pour le complexe CMH/épitope (von Boehmer *et al.*, 2003). La présentation d'auto-antigènes est réalisée par les cellules épithéliales thymiques corticales. Les thymocytes qui interagissent le plus fortement avec le CMH II se différencient alors en LyT CD4<sup>+</sup> et ceux qui interagissent le plus fortement avec le CMH I se différencient en LyT CD8<sup>+</sup> (Klein *et al.*, 2009). Au cours de la troisième phase de maturation, les thymocytes ayant survécu à l'étape de sélection positive vont migrer dans la *medulla* et y subir une **sélection négative** qui conduit à la mort cellulaire par apoptose des lymphocytes présentant une trop forte affinité pour le complexe CMH/épitope. La présentation d'auto-antigènes est réalisée par les

cellules épithéliales thymiques médullaires, des DC et des macrophages (Hinterberger *et al.*, 2010). Seuls des LyT auto-réactifs de phénotype Tregs échappent à ce processus de sélection négative et rejoignent les autres LyT ayant achevé le processus complet d'éducation thymique. A la sortie du thymus, environ 98% des lymphocytes entrant ont été éliminés et les lymphocytes éduqués rejoignent la circulation sanguine et lymphatique à l'état de LyT mature naïf. Ceux-ci gagnent ensuite les organes lymphoïdes secondaires i.e. la rate, les ganglions lymphatiques et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses puis recirculent entre le compartiment sanguin et le système lymphatique à la recherche de l'antigène reconnu par leur TCR.

La production de LyT par le thymus diminue avec l'âge à partir de la puberté du fait d'une involution adipeuse et d'une réduction du volume du thymus d'environ 3% par an à partir de 30-40 ans (Haynes *et al.*, 2000).

#### b. Différenciation et sous-populations lymphocytaires Th

Les DC peuvent résider dans un tissu lymphoïde, mais aussi y migrer depuis le tissu drainé par cet organe lymphoïde. Les DC résidentes vont capturer et présenter les Ag solubles présents au niveau des organes lymphoïdes secondaires (Sixt *et al.*, 2005) tandis que les DC migrantes transportent les Ag depuis les tissus non-lymphoïdes jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires. Elles présentent aux LyT matures naïfs les Ag exprimés à leur membrane dans le contexte des molécules CMH I ou II. En situation pathologique, le nombre de lymphocytes présents dans les organes lymphoïdes secondaires augmente ce qui accroît la probabilité que les Ag présentés soient reconnus par les rares LyT qui leur sont spécifiques (Cahill, Frost & Trnk, 1976). L'orchestration de la réponse immune dépend essentiellement des sous-populations lymphocytaires helper (Th) qui par leurs sécrétions cytokiniques vont favoriser les réponses cellulaires ou humorales et instruire les cellules de l'immunité innée au premier rang desquelles les macrophages. Les principales sous-populations de LyT helper sont les Th1, les Th2, les Th17 et les Tregs.

La différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves résulte en premier lieu de l'interaction entre TCR et l'ensemble CMH II/épitope présenté à la membrane des DC et autres CPA (Jenkins *et al.*, 2001). Un ensemble de cascades de voies de

signalisation mène à la prolifération des cellules T CD4 naïves et à leur différenciation en Th. La différenciation vers les différents lignages Th est déterminée par un réseau complexe et spécifique de signalisation cytokinique et de facteurs de transcription (Tao *et al.*, 1997; Ashkar, 2000). Ces différentes sous-populations Th sont considérées comme exerçant un rôle très important dans la modulation des mécanismes pro- ou anti-inflammatoires prenant place dans le SNC en condition pathologique. Sont résumées ci-dessous les principales caractéristiques fonctionnelles de ces sous-populations.

#### - Les Ly Th1

Les cellules Th1 sont impliquées dans l'élimination des pathogènes intracellulaires et ont été associées à différentes catégories d'auto-immunité organe-spécifique (Del Prete, 1992). Les Th1 sécrètent principalement l'IFN $\gamma$  et l'IL2 mais également la lymphotoxine  $\alpha$  (LT $\alpha$ ), le TNF $\alpha$  et l'IL18. L'IFN $\gamma$  est essentiel pour activer les macrophages et cellules microgliales, induire une polarisation M1 et une activité phagocytaire accrue (Cherwinski *et al.*, 1987). En retour, les macrophages M1 stimulent, tandis que les cellules M2 inhibent la prolifération et la fonction des cellules CD4<sup>+</sup> Th1 (Verreck *et al.*, 2004). Notons que la LT $\alpha$ , un membre de la super famille du TNF, joue un rôle pathogène au cours de l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE) (Suen *et al.*, 1997; Chiang *et al.*, 2009). L'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  sont des cytokines importantes pour initier la cascade de signalisation permettant de développer les cellules Th1 (Trinchieri, Pflanz & Kastelein, 2003), tout en inhibant la maturation des LyT Th2 (Oswald *et al.*, 1994; Mosmann & Sad, 1996). L'IL12 induit la production d'IFN $\gamma$ , augmentant ainsi la différenciation des LyT en Th1. Par ailleurs, Les facteurs de transcription runt-related transcription factor 3 (runx3), et T-bet induisent la transcription du gène *IFNG* (IFN $\gamma$ ) tout en inhibant l'expression du gène *IL4* renforçant l'activation des LyT Th1 et leur co-expression inhibe la différenciation des Th17 (Djuretic *et al.*, 2007; Lazarevic *et al.*, 2011).

## - Les LyTh2

Les cellules Th2 jouent un rôle majeur dans les réponses immunitaires dirigées contre les parasites. Les Th2 sont également impliqués dans la physiopathologie de l'asthme et d'autres maladies allergiques (Del Prete, 1992; Sokol *et al.*, 2009). Les LyTh2 inhibent la réponse Th1 et orientent l'activation des macrophages vers un profil M2 via la sécrétion d'IL4, d'IL5, d'IL10 et d'IL13. L'IL4 et l'IL2 sont essentiels pour la différenciation Th2 de même que le facteur de transcription GATA3 (Wan, 2014).

## - Les LyTh17

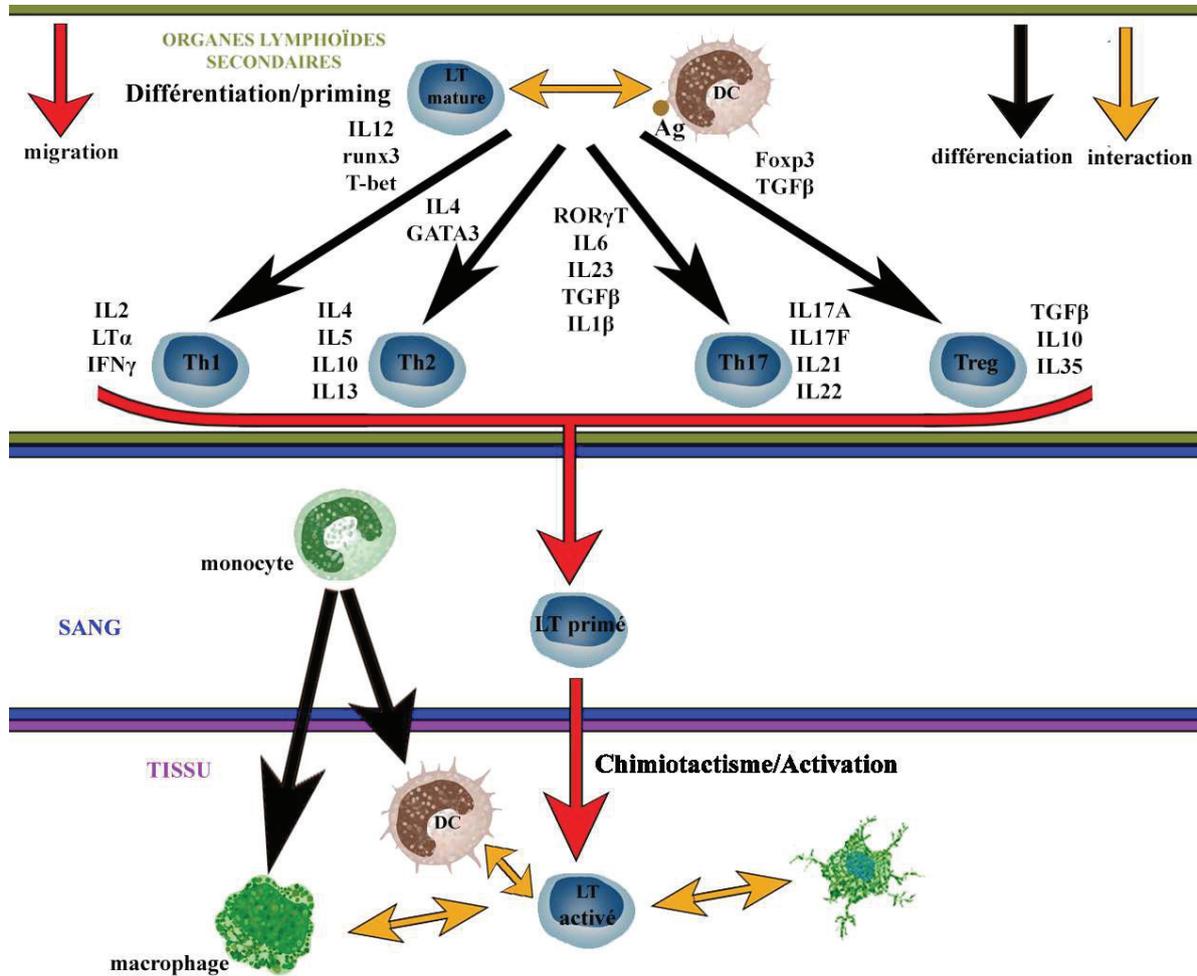
Les LyTh17 sont impliqués dans la réponse immunitaire dirigée contre les bactéries et les champignons extracellulaires. Ils jouent également un rôle physiopathologique important au cours de différentes maladies auto-immunes (Ivanov *et al.*, 2006; Weaver *et al.*, 2006; Annunziato *et al.*, 2007). Les cytokines effectrices clés des Th17 sont l'IL17A, l'IL17F, l'IL21 et l'IL22. L'IL17A induit la production par les macrophages et les cellules microgliales de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL6, l'IL1 et le TNF $\alpha$  de même que la synthèse de chimiokines (Moseley *et al.*, 2003; Ivanov *et al.*, 2006; Gaffen, 2009). Le processus de différenciation des cellules Th17 est complexe et implique le TGF-beta, l'IL6, l'IL23 et le facteur de transcription ROR $\gamma$ t (Bettelli *et al.*, 2006; Mangan *et al.*, 2006; Veldhoen, Hocking, Atkins, Locksley, & Stockinger, 2006 ; Ivanov *et al.*, 2006). Le TGF-beta joue un rôle important dans la détermination de la balance Tregs/TH17 (Wahl, 2007).

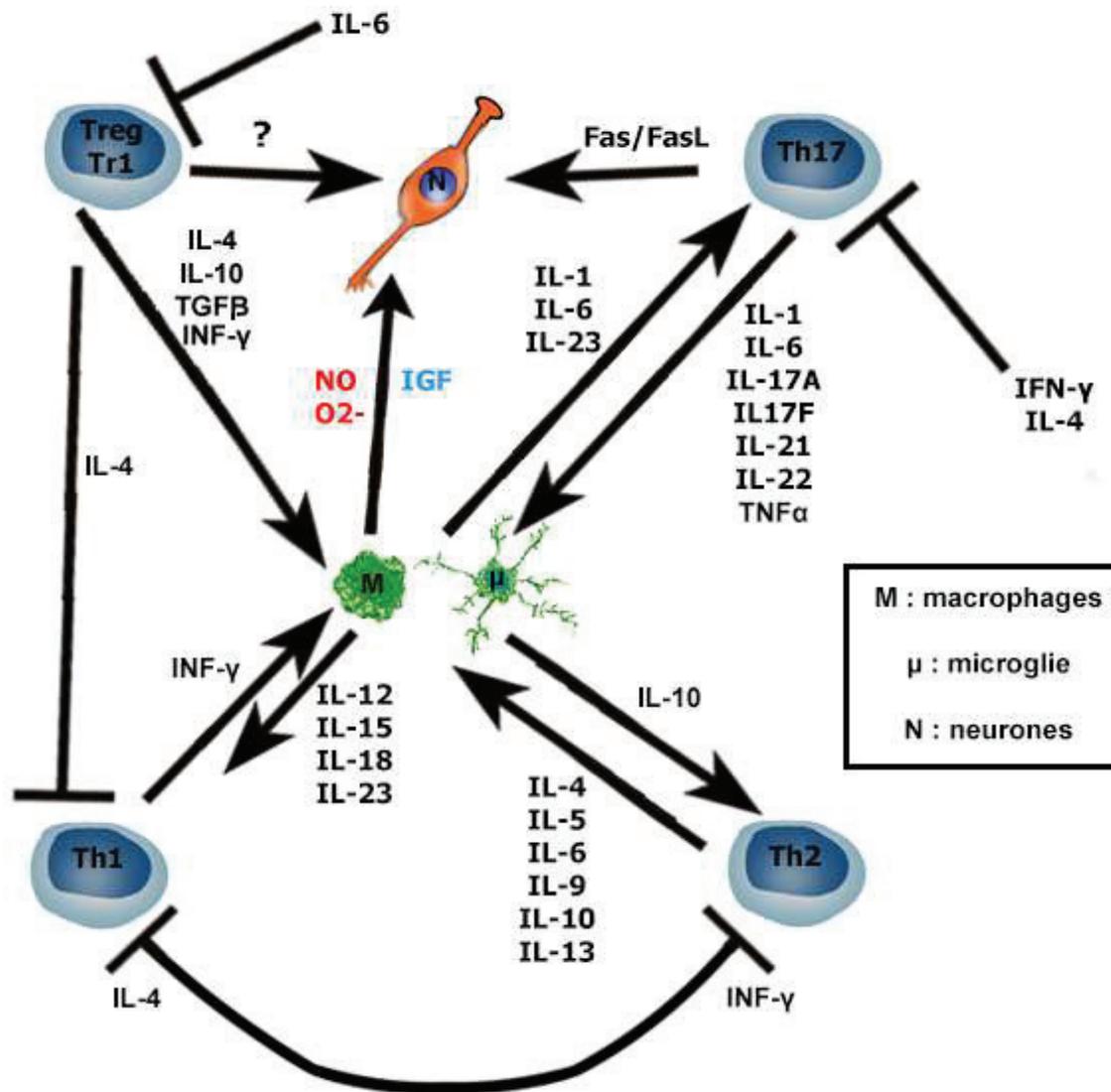
## - Les LyTregs

Les Tregs jouent un rôle important dans le maintien de la tolérance immunitaire et la résolution des réactions inflammatoires (Wraith, Nicolson & Whitley, 2004). Leurs principales cytokines effectrices comprennent l'IL10, le TGF- $\beta$ , et l'IL35 (Curotto de Lafaille & Lafaille, 2002; Wraith *et al.*, 2004; Collison *et al.*, 2007). Les cellules T

régulatrices (Tregs) sont des lymphocytes CD4<sup>+</sup> exprimant le récepteur à haute affinité à l'IL2 (CD25) et le facteur de transcription Foxp3. On distingue les Tregs naturels (nTregs) dont les propriétés immunorégulatrices sont intrinsèques et prédéterminées durant le développement thymique et les Tregs induits (iTregs) qui sont générés secondairement dans les organes lymphoïdes secondaires ou les tissus. C'est la reconnaissance de l'antigène dans un contexte cytokinique *ad hoc* qui permet la génération d'iTregs (Chen *et al.*, 2003). L'activation et la survie des Tregs nécessitent la présence d'IL2, qui favorise l'expression du facteur de transcription Foxp3 dans les cellules naïves, qui acquièrent de ce fait de puissantes fonctions suppressives (Wuest *et al.*, 2008). Le TGF- $\beta$  est la cytokine principale responsable de l'engagement de la différenciation en iTregs (Chen *et al.*, 2003; Selvaraj & Geiger, 2007). Le TGF- $\beta$  seul, à une concentration élevée, peut changer la différenciation lymphocytaire vers un développement Tregs (Chen *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2008). C'est principalement (mais pas uniquement) l'environnement cytokinique et en particulier la concentration en TGF- $\beta$  qui détermine l'engagement de la différenciation lymphocytaire vers la voie TH17, dépendante de ROR $\gamma$ T ou vers la voie iTregs, dépendante de Foxp3 (Zhou *et al.*, 2008). On considère actuellement que la balance Th17/Tregs est régulée par des signaux instructeurs immuns et/ou métaboliques (Barbi, Pardoll & Pan, 2013) et joue un rôle majeur dans le développement des réponses immunitaires au cours de nombreuses pathologies (Noack & Miossec, 2014). Dans le SNC, différentes études montrent que la balance TH17/Tregs est un élément important dans la régulation du profil d'activation macrophagique/microglial et le devenir des pathologies purement neuro-inflammatoires telles que la SEP (Murphy *et al.*, 2010; Kleinewietfeld & Hafler, 2013) ou à composantes neuro-inflammatoires telles que la MP ou la SLA (Reynolds *et al.*, 2007; Gendelman & Appel, 2011; He & Balling, 2012).

Les deux figures suivantes récapitulent les mécanismes de différenciation des LyT matures naïfs et les principales interactions moléculaires que chaque sous-population peut avoir avec son environnement cellulaire, au sein du tissu, en condition pathologique.





**En résumé :**

- La réponse de l'immunité adaptative se développe *a posteriori* de la réponse immune innée et repose sur les **lymphocytes B** et les **LyT**, dérivants d'un progéniteur lymphoïde commun.
- La production et la **maturation de LyT** sont assurées par la **moelle osseuse** et le **thymus**. Les progéniteurs lymphoïdes quittent la moelle osseuse et pénètrent dans le thymus pour **maturer** selon trois phases de sélection/élimination.

- Les thymocytes qui interagissent le plus fortement avec le CMH II se différencient alors en **LyT CD4<sup>+</sup>** et ceux qui interagissent le plus fortement avec le CMH I se différencient en **LyT CD8<sup>+</sup>**.
- Seuls certains LyT auto-réactifs de phénotype **Tregs** échappent à ce processus de sélection et rejoignent les autres LyT ayant achevé le processus complet de maturation.
- Les LyT matures naïfs circulent ensuite entre le **sang** et les **organes lymphoïdes**.
- La production de LyT par le thymus **diminue avec l'âge** à partir de la puberté.
- Les DC, résidentes ou migrantes, **présentent** aux LyT matures naïfs **les Ag** au niveau des organes lymphoïdes secondaires.
- **Des sous-populations** lymphocytaires helper (Th), principalement les Th1, Th2, Th17 et Tregs, dont dépend l'orchestration de la réponse immune, exercent un **rôle** très important dans la **modulation** des mécanismes inflammatoires prenant place dans le SNC en condition pathologique, de par leurs **sécrétions cytokiniques** agissant entre autres sur les **macrophages**.
- La différenciation vers les **différents lignages** Th est déterminée par un réseau de **signalisation cytokinique** et de facteurs de transcription.

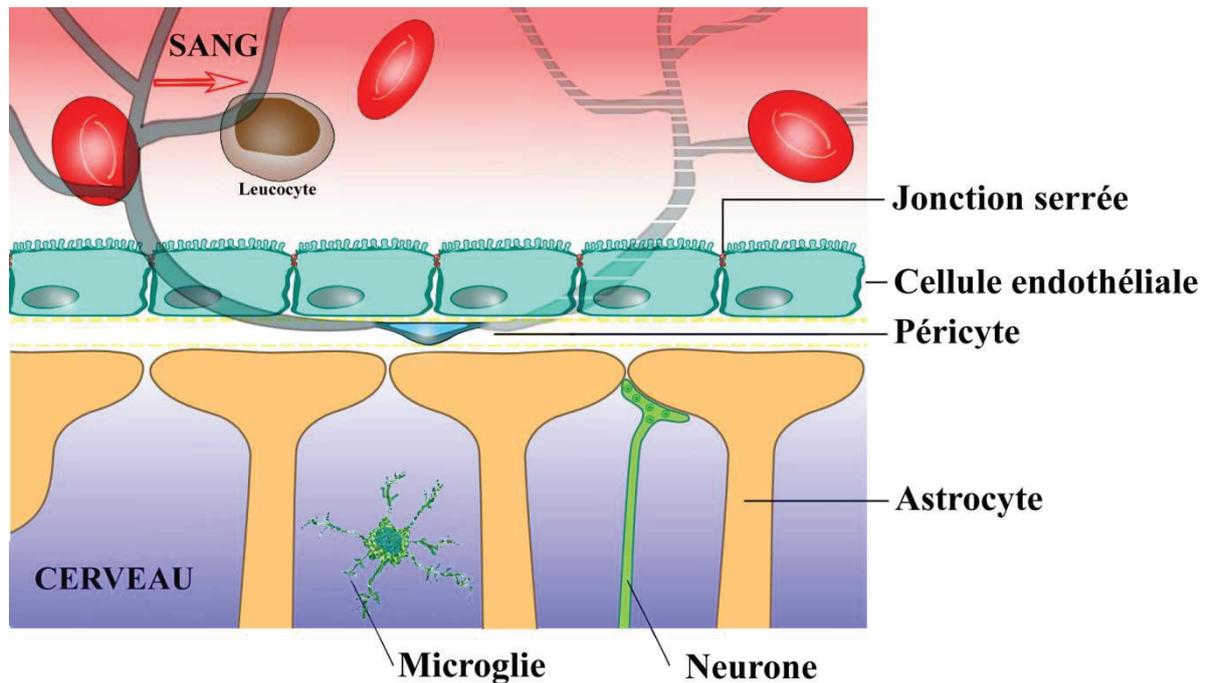
### I.3. Neuro-inflammation

La neuro-inflammation est définie littéralement comme un processus inflammatoire prenant place dans le système nerveux. Historiquement, l'inflammation regroupe 4 signes physiologiques impliquant notamment l'infiltration de cellules immunes sanguines dans les tissus : le gonflement, la rougeur, la chaleur et la douleur. Or, dans le cas de la neuro-inflammation, on n'observe pas la totalité de ces signes cardinaux. De plus, la neuro-inflammation fait essentiellement intervenir des cellules et des signaux chimiques spécifiques au système nerveux, ce qui en fait un processus pathologique unique au sein de l'organisme. Dans cette section, nous étudierons la spécificité des réponses neuro-inflammatoires dans le SNC, les principaux mécanismes immunitaires mis en jeu lors de ces réponses et leur incidence dans les pathologies neurologiques à composante inflammatoire.

#### a. Le cerveau, un site immunoprivilégié aux privilèges contestés

Le cerveau est un site considéré comme « immunoprivilégié ». En règle générale, les processus inflammatoires se déroulant en périphérie n'affectent pas le fonctionnement normal du SNC et, en situation physiologique, les échanges immunologiques restent relativement restreints entre la périphérie et le SNC. En particulier, l'absence de drainage lymphatique, conventionnel limite la migration d'antigènes et de cellules immunes depuis le SNC vers les ganglions lymphatiques. Cet « isolement » du SNC est également lié la présence d'une barrière hémato-encéphalique (BHE) constituée de capillaires d'un type particulier. Les parois de ces capillaires sont formées de 4 principaux composants cellulaires : i) des cellules endothéliales réunies par des jonctions serrées type *zonula occludens*, ii) des péricytes très nombreux localisés dans un dédoublement de la basale, iii) des macrophages périvasculaires eux aussi localisés dans un dédoublement de la basale et iv) les pieds jointifs de prolongement astrocytaires qui établissent un contact avec la paroi externe de la basale des capillaires. (Bundgaard & Abbott, 2008).

Le schéma suivant montre l'organisation de cette barrière.



Cette conformation particulière induit une sélectivité des échanges autorisant uniquement l'influx (entré vers le SNC) de nutriments et l'efflux (sorti vers le sang) de produits du catabolisme en situation physiologique (Ohtsuki, 2004). Il existe cependant au sein du SNC, à l'instar de ce qui est observé en périphérie, des processus d'immunosurveillance. Ainsi, il a été observé en condition physiologique une pénétration à bas bruit de LyT au sein du parenchyme nerveux (Engelhardt & Ransohoff, 2005). En situation pathologique, l'infiltration de cellules immunes s'effectue le plus souvent en 2 temps : i) infiltration limitée à l'espace périvasculaire (espace de Virchow-Robin), sans passage de la basale entourant les vaisseaux, ii) franchissement de la basale et infiltration du parenchyme nerveux (Bechmann, Galea & Perry, 2007). Ceci explique la très faible présence de LyT au sein du parenchyme en condition physiologique, et leur abondance limitée en situation pathologique.

En condition physiologique, la BHE protège le cerveau des agents pathogènes, des anticorps et des leucocytes, ce qui en fait une véritable « barrière immunologique » (Risau, Engelhardt & Wekerle, 1990). Toute lésion ou entrée d'un agent pathogène dans le SNC est susceptible de provoquer une réaction inflammatoire et s'accompagne d'une activation de la BHE ou d'une altération de son intégrité. Les cellules immunitaires sanguines peuvent passer la BHE et infiltrer significativement le

parenchyme nerveux en seulement quelques heures (Hickey, 1999). La migration de leucocytes à travers l'endothélium implique plusieurs molécules d'adhésion présentes à la surface des leucocytes et des cellules endothéliales activées. Les molécules d'adhésion endothéliales ICAM-1, VCAM-1 et PECAM-1, appartenant à la famille des immunoglobulines, contribuent à l'adhésion et/ou la migration transendothéliale de différentes sous-populations de leucocytes vers le SNC (Oppenheimer-Marks *et al.*, 1991; Greenwood *et al.*, 2003). L'activation ou la rupture de la BHE est donc un mécanisme majeur d'amplification de la réponse inflammatoire dans le SNC. Toutefois, si le rôle d'une activation/rupture de la BHE est largement admis et démontré dans le contexte de pathologies neuro-inflammatoires telles que la sclérose en plaques (Larochelle, Alvarez & Prat, 2011; Cramer *et al.*, 2013), l'implication de ce mécanisme dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives reste contestée. S'il est aujourd'hui admis qu'une réponse neuro-inflammatoire est induite par tout type d'atteinte neurodégénérative par exemple durant la maladie d'Alzheimer ou la MP (Carson, Thrash & Walter, 2006), le rôle d'une infiltration de cellules immunes dérivant du sang n'est pas formellement démontré.

Les réponses neuro-inflammatoires reposent sur l'activation immunitaire de deux grandes catégories de cellules : i) des cellules immunes c'est-à-dire appartenant au système immunitaire d'un point de vue ontogénique et ii) des cellules non immunes mais néanmoins immunocompétentes c'est-à-dire capables de dialoguer avec les cellules immunes via un jeu de molécules solubles ou de surface et, le cas échéant d'assurer certaines des grandes fonctions de l'immunité adaptative : la présentation antigénique, la synthèse de cytokines pro- ou anti-inflammatoires, la synthèse de chimiokines, voire, dans une certaine mesure, la phagocytose. Ainsi les astrocytes, l'exemple type de cellules neurales immunocompétentes, synthétisent un large éventail de cytokines et de chimiokines et sont en mesure de moduler l'infiltration intracérébrale de LyT (Gimsa, Mitchison & Brunner-Weinzierl, 2013). Notons également qu'à l'instar des cellules microgliales, les astrocytes engagent un programme d'activation en réponse à tout type d'atteinte neuronale, activation qui se traduit au plan morphologique par une hypertrophie du corps cellulaire et l'accumulation intracytoplasmique de filaments intermédiaires de GFAP. L'acquisition d'un ensemble de compétences immunes accompagne très probablement une telle

réaction gliale nommée astrogliose qui est observée au cours de différentes pathologies neurodégénératives (Teismann *et al.*, 2003). Nous limiterons notre propos aux interactions entre deux catégories de cellules authentiquement immunes, les LyT et les cellules microgliales, dans le contexte des atteintes neuronales.

#### b. La microglie, cellule immune sentinelle du SNC

Dans le parenchyme nerveux normal, la microglie est la seule cellule immune et la principale cellule immunocompétente. Nous nous attacherons dans ce qui suit à en définir l'origine, les modifications morphologiques observées dans le parenchyme cérébral pathologique, ainsi qu'à caractériser de manière détaillée les mécanismes qui régissent son activation.

La découverte des cellules microgliales est due à Del Rio Hortega, qui en fournit la première description au début du XX<sup>ème</sup> siècle. Elles ont une origine hématopoïétique et appartiennent à la population des macrophages tissulaires, cellules phagocytaires réparties dans l'ensemble des tissus. Les cellules microgliales sont issues du mésoblaste et ont ainsi une origine mésenchymateuse (Ransohoff & Cardona, 2010). Leur densité est hétérogène au sein du cerveau. En particulier, il a été décrit que la densité microgliale au sein de la SN était très élevée, et qu'elle était également plus importante dans la substance grise, par rapport à la substance blanche (Lawson *et al.*, 1990). La microglie en fonction des conditions de son environnement et de son état d'activation peut présenter différentes morphologies. Ainsi, on distingue principalement : la microglie ramifiée, caractéristique d'une microglie au repos et la microglie amiboïde, caractéristique d'une microglie pleinement activée. Entre ces deux aspects morphologiques extrêmes, un ensemble d'états intermédiaires ont été décrits (Kreutzberg, 1996).

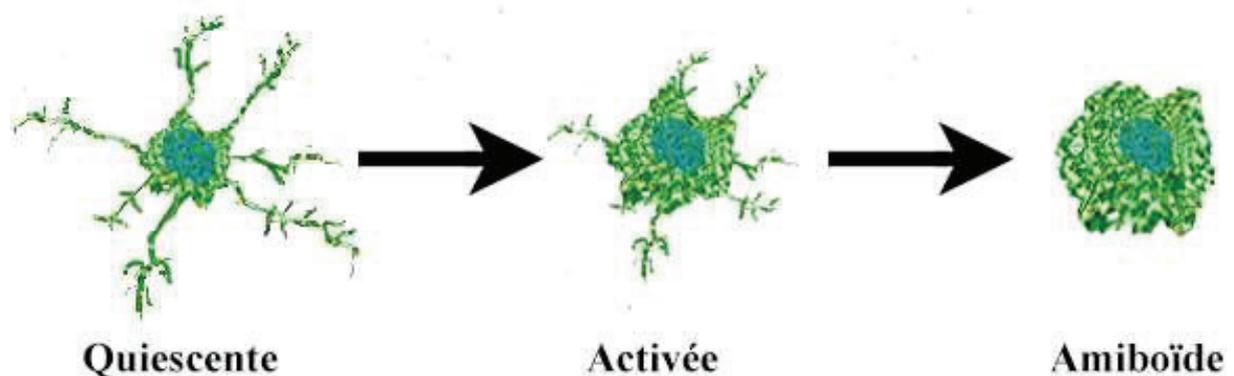
Dans le SNC en conditions physiologique, ces cellules de petite taille, au noyau arrondi, présentent de nombreux prolongements cytoplasmiques ramifiés. Dire que ces cellules ramifiées sont au repos n'est cependant pas tout à fait exact, car il a été montré que la cellule microgliale était capable d'explorer de façon active son environnement via les mouvements constants d'extension/rétractions de ces ramifications et des filopodes qu'elles portent (enregistrables à l'échelle de minutes) et via une activité de microphagocytose exercée vis à vis du liquide interstitiel et des membranes cellules neuronales ou endothéliales (Nimmerjahn, Kirchhoff &

Helmchen, 2005; Raivich, 2005). Durant ce processus d'immunosurveillance, les ramifications microgliales explorent un territoire qui correspond à près de 10 fois le diamètre du corps cellulaire microglial (Raivich, 2005). Celui-ci reste immobile durant l'activité exploratoire des ramifications, et les territoires couverts par des cellules microgliales adjacentes ne se chevauchent pas. Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'exploration effectuée par les prolongements de la microglie est dépendante de la libération d'ATP par les astrocytes (Davalos *et al.*, 2005).

De par son appartenance au système des phagocytes mononucléés, la cellule microgliale présente des caractéristiques phénotypique communes à l'ensemble des macrophages et exprime notamment le marqueur F4/80, le récepteur à la fraction iC3b du Complément (CD11b) la molécule de signalisation IBA1, et, chez certaines espèces, le récepteur CD4. De plus, la microglie exprime aussi CD45, récepteur également exprimé par l'ensemble de leucocytes. En plus des fonctions importantes de microphagocytose à l'état physiologique dans le cerveau mature, la microglie est impliquée dans la régulation de la neurogénèse et de la connectivité synaptique dans le SNC en développement, (Paolicelli *et al.*, 2011). Elle peut également sécréter des molécules guidant les neurites en croissance vers leur cible (Elkabes, DiCicco-Bloom & Black, 1996; Hanisch, 2002), des neurotrophines indispensables à la survie neuronale ou, au contraire, des radicaux oxygénés, impliqués dans la mort neuronale (Frade & Barde, 1998; Wakselman *et al.*, 2008) D'autre part, elle est joue un rôle important en éliminant les débris neuronaux ou myéliniques, préalable indispensable à tout processus de réparation tissulaire (Takahashi *et al.*, 2007).

En situation neuro-inflammation, la microglie engage un programme d'activation qui est finement adapté à la situation pathologique et se traduit par des modifications morphologiques parfois subtiles parfois caricaturales qui conduisent, à l'extrême, à la morphologie amiboïde caractéristique du stade ultime d'activation microgliale.

Les principales étapes de ces changements morphologiques sont décrites dans la figure suivante.



Ces modifications morphologiques s'opèrent sous l'effet de signaux inflammatoires provenant de neurones lésés et/ou d'autres cellules gliales et dont la nature n'a pas été totalement établie (Cho *et al.*, 2006). Les prolongements cellulaires se rétractent, la cellule s'arrondit, et le volume du corps cellulaire augmente. Cette nouvelle conformation présente des caractéristiques proches des macrophages périphériques activés (Kettenmann *et al.*, 2011; Varnum & Ikezu, 2012; Hanisch, 2013). Les cellules microgliales activées acquièrent alors un ensemble de propriétés et de fonctions présentées par les macrophages périphériques activés :

- haut niveau d'expression des molécules du CMH classe II et des récepteurs à la fraction Fc des immunoglobulines
- sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, de facteurs de croissance, de radicaux libres et de molécules oxydatives
- expression de molécules d'adhésion
- fonctions phagocytaires et de présentation antigénique

Par ailleurs, les cellules microgliales expriment des récepteurs aux chimiokines dont l'activation en réponse à un gradient de chimiokines induit la migration des corps cellulaires microgliaux vers les sites de lésion. L'activation et la prolifération des cellules microgliales se mettent en place dans un laps de temps pouvant aller de quelques minutes à plusieurs heures suivant l'établissement initial de lésions neuronales. Dans le cas de lésions non évolutives (dégénérescence rétrograde par transection axonale par exemple), on peut observer un pic d'activation environ une semaine après lésion (Ladeby *et al.*, 2005). Lors de cette activation, la cellule

microgliale secrète des cytokines pro- et/ou anti-inflammatoires, phagocyte les débris cellulaires liés à la mort neuronale, et interagit avec les autres cellules de son environnement. Si la lésion initiale est non évolutive, l'inflammation décroît ensuite naturellement, jusqu'à disparaître totalement (Ley *et al.*, 2007). La question sur le devenir de la microglie après que l'inflammation s'est résorbée est encore débattue aujourd'hui. Il est envisageable qu'elle reprenne un état quiescent, qu'elle dégénère ou qu'elle garde une certaine forme de mémoire de cet état d'activation. Des études ont montré que l'hyperactivation soutenue de la microglie pouvait entraîner leur mort cellulaire (Hao *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2001). Certains auteurs considèrent qu'une dégénérescence des cellules microgliales (induite ou non par un phénomène d'hyperactivation) pourrait compromettre la survie des neurones par un défaut de "clairance" du micro-environnement neuronal (Streit & Xue, 2012).

En situation physiologique, la cellule microgliale communique en permanence avec les cellules de son micro-environnement et différents signaux délivrés par les neurones maintiennent la microglie à l'état quiescent. Citons entre autres la Fractalkine (Cardona *et al.*, 2006), la molécule CD200 (Wang, Ye, Zhang, & Chen, 2007) et l'activité électrique neuronale (Neumann, 2001). En situation neuro-inflammatoire, la coopération cellulaire joue un rôle sans doute encore plus important dans l'induction et l'orientation fonctionnelle de l'activation microgliale.

Comme nous l'avons vu précédemment, les cytokines jouent un rôle important dans le contrôle de l'inflammation et de la réponse immune. Les cellules microgliales ont la capacité, en fonction de l'environnement, de sécréter des cytokines anti- et/ou pro-inflammatoires.

Parmi les cytokines pro-inflammatoires, on peut citer l'IL1 ou le TNF $\alpha$  (Nadeau & Rivest, 2000). Ces cytokines induisent l'expression de molécules d'adhésion et la synthèse de chimiokines par les cellules endothéliales et les astrocytes environnants, facilitant ainsi la migration intra-tissulaire de leucocytes (Kitic *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013b).

Parmi les cytokines synthétisées par la microglie, certaines peuvent exercer des effets pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires selon le contexte et la cellule cible. C'est le cas notamment du TGF- $\beta$  (Sanjabi *et al.*, 2009). D'autres cytokines sont moins ambivalentes et exercent de façon constante des fonctions pro-inflammatoires au sein du SNC : par exemple l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18, trois cytokines qui stimulent

l'activité fonctionnelle des lymphocytes (Aloisi, 2001). D'autres cytokines produites également par la microglie, exercent un rôle anti-inflammatoire, comme l'IL-10 inhibitrice de l'activation macrophagique/microgliale et de la présentation antigénique mais aussi l'IL1-ra (antagoniste du récepteur de l'IL-1) qui inhibe la réponse immune type Th1 (Lamacchia *et al.*, 2010).

La microglie activée produit des chimiokines, molécules cytotoxiques chimiotactiques impliquées dans la migration leucocytaire et qui sont représentées par 4 sous-familles (CXC, CC, C et CX3C). La microglie exprime les sous-familles CXC et CC qui contribuent au recrutement des LyT (Kremlev, Roberts & Palmer, 2004; Jones, Hart & Popovich, 2005), des macrophages et des DC au sein du SNC mais aussi à la migration des cellules microgliales résidentes vers le site de lésion (Nishi *et al.*, 2005; Hinojosa *et al.*, 2011; Selenica *et al.*, 2013).

La grande plasticité fonctionnelle des cellules microgliales s'exprime également par leur capacité à synthétiser, selon les signaux instructeurs qu'elles peuvent recevoir, soit des molécules neurotoxiques, notamment du monoxyde d'azote, des protéases, des acides aminés toxiques ou encore des radicaux libres oxygénés ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ), soit un ensemble de molécules neurotrophiques participant à la survie neuronale et à la réparation tissulaire : par exemple le NGF (Nerve Growth Factor), la NT-3 (Neurotrophine 3) et le BDNF (Elkabes *et al.*, 1996; Kreutzberg, 1996).

Ainsi, la cellule microgliale, du fait de sa plasticité fonctionnelle, constitue un acteur essentiel dans les phénomènes de neurodégénérescence mais aussi de réparation tissulaire. De plus, sa capacité à recruter sur le site de lésion et activer d'autres types de cellules immunes comme les lymphocytes font de cette cellule un pivot dans les mécanismes immuns tant innés qu'adaptatifs au sein du SNC. En conclusion, la neuro-inflammation apparaît comme un processus complexe reposant sur une coopération complexe entre immunité innée et immunité adaptative, cellules immunes et cellules neurales immunocompétentes et enfin cellules résidentes et cellules dérivant de la périphérie.

Dans ce contexte général, les mécanismes de recrutement et l'implication des LyT dans les pathologies neurodégénératives restent à ce jour mal connus. Une brève revue de la littérature concernant cet aspect de la neuro-inflammation est présentée ci-dessous.

### c. les LyT infiltrants

La BHE a longtemps été considérée comme n'autorisant aucun passage de leucocytes en dehors des situations d'altération de son intégrité. On sait actuellement qu'une BHE intègre mais activée permet le passage sélectif de certains pathogènes (Aguzzi, Nuvolone & Zhu, 2013), et/ou de cellules immunes sanguines, notamment les LyT, au cours de pathologies qui ne sont pas primitivement inflammatoires. (McGeer & McGeer, 2002). Par ailleurs, outre les fonctions de barrière histologique là, la circulation des cellules, on reconnaît actuellement des fonctions de barrière enzymatique et métabolique à la BHE (Bechmann *et al.*, 2007; Galea, Bechmann & Perry, 2007). Cette évolution des concepts relativise le rôle de « barrière hermétique » initialement attribué à la BHE, et fait reposer la fonction de barrière sur un ensemble de mécanismes actifs plutôt que passifs.

Nous allons, dans un premier temps, étudier les mécanismes par lesquels les LyT peuvent infiltrer le parenchyme cérébral, en situation pathologique. Nous évoquerons ensuite quelques exemples de maladies et leurs modèles animaux pour lesquels une infiltration de LyT a été observée. Nous verrons quelle incidence cette infiltration peut avoir, la neuro-inflammation, la perte neuronale et les troubles comportementaux associés.

En condition pathologique, le passage des leucocytes à travers l'endothélium est augmenté, les cellules endothéliales de la BHE produisent des cytokines pro-inflammatoires induisant l'expression de molécules d'adhérence, d'intégrines, de chimiokines, et de cytokines. Ces molécules agissent sur les jonctions serrées de la BHE facilitant ainsi le passage des cellules immunitaires (Bednarczyk & Lukasiuk, 2011). Le processus de migration des leucocytes depuis la lumière vasculaire vers le parenchyme tissulaire (quelle qu'en soit la nature) est nommé extravasation et implique l'action séquentielle des sélectines qui permettent le roulement des leucocytes, et des intégrines qui permettent leur adhésion (Springer, 1994).

Un contact initial entre la cellule endothéliale et le leucocyte médié par des sélectines, L-sélectine (L pour leucocyte), P-sélectine (P pour plaquettes) et E-sélectine (E pour endothéliale), et leur ligand amorce la migration de ces cellules. Ce premier contact entraîne le ralentissement des cellules et leur permet de rouler le long de la paroi endothéliale. L-sélectine est exprimée sur les leucocytes alors que les deux autres types, E et P, sont exprimés par les cellules endothéliales. L-

sélectine peut se lier à la surface des cellules endothéliales, spécifiquement (Angiari & Constantin, 2013).

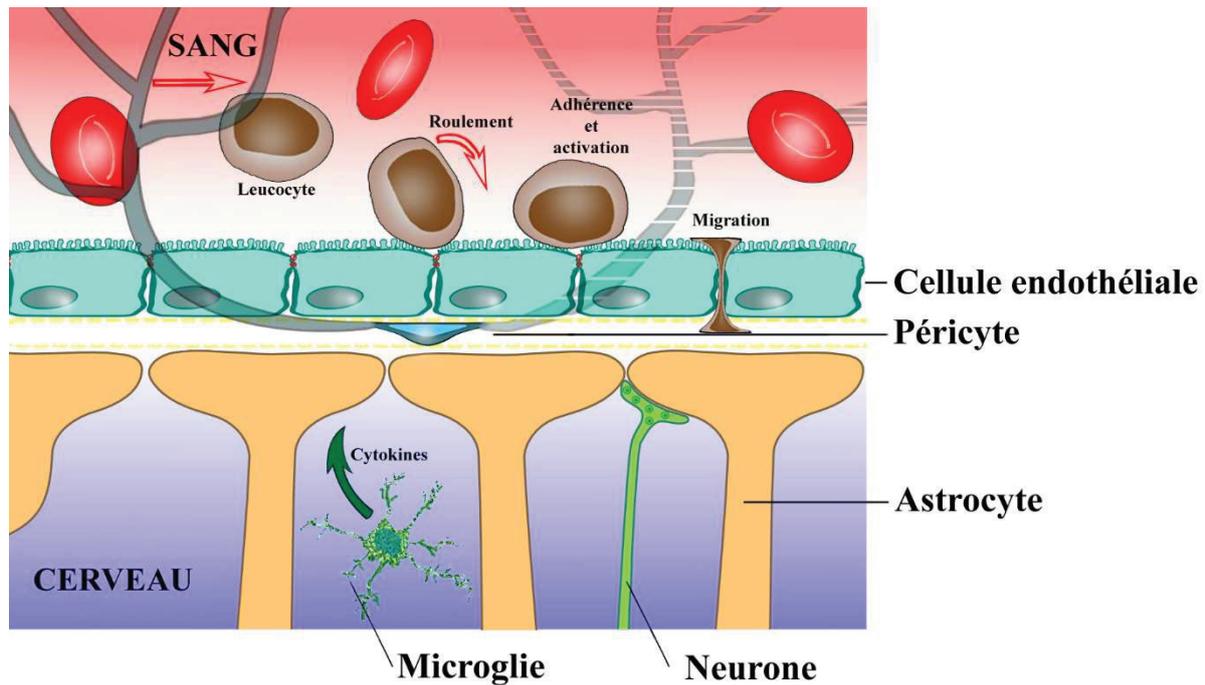
Suite à ce premier contact, les cellules endothéliales produisent des chimiokines, qui augmentent la faculté d'adhésion des leucocytes et jouent un rôle important dans le recrutement des LyT (Springer, 1994; Mahad *et al.*, 2006).

L'adhésion des leucocytes étant augmentée, ces derniers s'arrêtent sur l'endothélium, ce qui précède leur infiltration, rendue possible par la liaison entre les intégrines ( $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha L\beta 2$  et  $\alpha 4\beta 7$ ) produites par les leucocytes avec les molécules d'adhésion à la surface des cellules de l'endothélium, telle que la molécule Activated Leucocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM), pouvant se lier avec CD6 exprimé par les LyT (Cayrol *et al.*, 2008).

Après cette adhésion, a lieu l'infiltration des leucocytes par diapédèse, également médiée par un jeu de molécules d'adhésion et d'intégrines.

Les cellules endothéliales vont ensuite progressivement guider la diapédèse (Carman & Springer, 2004). Les différentes molécules d'adhésion présentes au niveau des jonctions serrées vont interagir avec certaines intégrines, et la molécule d'adhésion PECAM-1 va interagir avec la protéine CD99, exprimée chez tous les leucocytes, mais préférentiellement chez les thymocytes, précurseurs des LyT dans le thymus (Choi *et al.*, 1998). Ces interactions cellulaires vont provoquer un relâchement des jonctions serrées et l'ouverture de la BHE (Greenwood *et al.*, 2011; Ley, Laudanna, Cybulsky, & Nourshargh, 2007).

Le processus de diapédèse est synthétisé dans le schéma suivant.



Une fois infiltrées dans le parenchyme, les cellules immunes périphériques vont suivre les signaux chimiques (chimiotactisme) émis par les cellules nerveuses lésées, par les cellules gliales (microglie et astrocytes) ou bien par les cellules immunes infiltrées antérieurement.

Chez l'homme, ce phénomène d'infiltration du SNC a été observé dans un grand nombre de pathologies infectieuses, inflammatoires ou neurodégénératives. On peut ainsi observer un infiltrat T intracérébral au cours de pathologies aussi diverses que l'encéphalite due au virus du Nil occidental (ENO), les encéphalites liées au virus de l'immunodéficience humaine (VIH), la Sclérose en plaque (SEP) mais aussi la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), la maladie d'Alzheimer et la MP, sur laquelle nous nous attarderons plus particulièrement. Notons qu'au plan mécanistique, la plupart des données disponibles sur ces processus d'infiltration T ont été obtenues dans les modèles animaux des maladies sus-citées.

Dans le modèle souris de l'ENO, les animaux développent une infection systémique, puis le virus traverse la BHE, pour aboutir à une encéphalite puis la mort en quelques semaines (Wang et al., 2001; Wang et al., 2004). Durant cette phase, une réponse immunitaire antivirale est mise en place afin de limiter l'infection, avec la production d'IFN de type I et l'infiltration de macrophages et de LyT  $\gamma\delta$ , CD4 et CD8

au sein du SNC (Gilfoy & Mason, 2007; Glass et al., 2005; Wang et al., 2003). Il a été montré que des souris déficientes pour le Toll-like receptor 7 (TLR7) produisent moins d'IL-23 après infection par le virus, ce qui conduit à la diminution de la survie et de l'infiltration des lymphocytes dans le SNC, et à une pathologie aggravée (Finberg & Wang, 2009; Town *et al.*, 2009).

Les complications neurologiques dues au VIH, dont les mécanismes pathologiques restent mal connus, sont moins fréquentes depuis l'avènement de la trithérapie. L'infiltration des monocytes/macrophage est toutefois bien caractérisée, et provoque une gliose réactionnelle, une démence, ainsi qu'une perte neuronale, caractéristiques de l'encéphalite due au VIH (VIHE) (González-Scarano & Martín-García, 2005; Ghafouri *et al.*, 2006). Des LyT CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> ont été observés dans l'hippocampe de patients atteints de VIHE, en contact direct avec les neurones, suggérant un rôle dans le processus de mort neuronale (Petito, Adkins, McCarthy, Roberts, & Khamis, 2003; Petito, Torres-Muñoz, Zielger, & McCarthy, 2006). En faveur de cette hypothèse, dans un modèle souris de VIHE, le transfert adoptif de Tregs a entraîné une diminution de la réplication virale et une atténuation de la gliose réactionnelle et de la perte neuronale. Dans cette même étude, le transfert de LyT effecteurs (Teffs) a eu des effets inverses (Liu et al., 2009). Contrairement aux autres encéphalites infectieuses, la SEP est actuellement considérée comme d'origine purement inflammatoire et dysimmunitaire. Chez les patients atteints de SEP, des LyT autoréactifs reconnaissant des antigènes de la myéline ont été mis en évidence dans le sang, le liquide céphalo-rachidien et le tissu cérébral (Zhang *et al.*, 1994; Wucherpfennig & Strominger, 1995; Balashov *et al.*, 1999; Hohlfeld, 2009). Le rôle pathogène des LyT infiltrant les lésions de SEP est fortement suggéré par le modèle d'encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale (EAE), où des animaux (le plus souvent des rongeurs) immunisés contre certains antigènes de la myéline, développent des lésions démyélinisantes similaires à celles de la SEP et caractérisées notamment par une infiltration de LyT auto-réactifs, plus particulièrement dans la moelle épinière (Fujinami & Oldstone, 1985; Schliesener & Wekerle, 1985; Flügel *et al.*, 2001).

Différents arguments expérimentaux démontrent l'importance du dialogue entre LyT et microglie au cours de l'EAE, aussi bien dans la phase de migration intracérébrale et de polarisation des LyT que dans la phase d'activation terminale des cellules

microgliales par les sous-populations Th1 ou Th17. Ainsi, la microglie activée aux stades initiaux de l'EAE synthétise un ensemble des chimiokines qui induisent l'infiltration sélective de LyT pro-inflammatoires Th1 ou Th17 au sein du SNC (Greter *et al.*, 2005; Codarri, Greter & Becher, 2013). L'abrogation dans l'EAE de l'activation microgliale inhibe le développement et le maintien des lésions inflammatoires dans le SNC (Heppner *et al.*, 2005). L'interaction entre la microglie CD40<sup>+</sup> et les LyT CD40L<sup>+</sup> initie la production lymphocytaire d'INF- $\gamma$  qui en retour entraîne la production de TNF $\alpha$  par la microglie activée (Tan *et al.*, 1999). Toutefois, il faut également noter qu'en fonction des conditions expérimentales, les cellules microgliales peuvent également favoriser l'activation de Tregs capables d'inhiber l'EAE (Ebner *et al.*, 2013). Par ailleurs, les Th 17 peuvent pénétrer dans le SNC de façon indépendante des cellules microgliales en activant directement les cellules endothéliales de la BHE (Kebir *et al.*, 2007). Des LyT CD8<sup>+</sup> ont aussi été observés dans le SNC durant la phase effectrice de l'EAE (Laouar *et al.*, 2008; Vogt *et al.*, 2009). Cependant, le rôle de cette sous-population lymphocytaire semble différent de celui des LyT CD4<sup>+</sup>. Les LyT CD8<sup>+</sup> suppriment l'induction de l'EAE chez des rats, suggérant que ces cellules régulent l'activité des LyTh1 via un effet cytotoxique (Sun, Ben-Nun & Wekerle, 1988). D'autres données suggèrent que les LyT CD8<sup>+</sup> peuvent se montrer protecteurs ou délétères selon la phase de l'EAE considérée, car leur absence entraîne une diminution des signes cliniques à la phase aiguë mais aussi une augmentation de la fréquence de rechute chez les animaux EAE CD8 KO (Koh *et al.*, 1992).

Au-delà des pathologies neurologiques d'étiologie infectieuse ou inflammatoire, une infiltration intracérébrale de LyT est également observée dans un certain nombre de maladies neurodégénératives liées à une atteinte primitivement neuronale. C'est le cas notamment de la SLA, maladie neuromusculaire progressant rapidement et caractérisée par la neurodégénérescence des motoneurones du tronc cérébral et de la moelle épinière. Alors que chez les patients SLA, la présence de LyT infiltrant le tronc cérébral et la moelle épinière est bien établie (Lampson, Kushner & Sobel, 1990; Kawamata *et al.*, 1992), on peut intuitivement concevoir qu'il pourrait s'agir d'un épiphénomène représentant une réponse secondaire à la mort neuronale et dont les effets propres seraient mineurs (Holmøy, 2008). Toutefois, au moins deux études réalisées dans l'un des modèles animaux de SLA, le modèle génétique

copper–zinc superoxide dismutase SOD1, suggèrent que l'infiltrat lymphocytaire T pourrait avoir un effet bénéfique chez les patients SLA. Dans la première de ces études, des souris exprimant une forme mutée du gène SOD1, la mutation la plus souvent reliée aux formes familiales de SLA, ont été croisées avec des souris mutées pour le gène *recombination activating gene-2* (*RAG2*), déficientes en LyT et B. Dans la seconde étude, les souris SOD1 ont été croisées avec des souris KO pour le gène *T-cell receptor  $\beta$ -chain* (*Tcrb*), déficientes en LyT matures. De manière intéressante, dans ces deux études, l'activation microgliale était réduite et la neurodégénérescence était notablement augmentée (Beers *et al.*, 2008; Chiu *et al.*, 2008). Ces données suggèrent que, dans ce modèle, les cellules T CD4<sup>+</sup> infiltrant le SNC jouent donc un rôle neuroprotecteur en modulant le profil pro- versus anti-inflammatoire de la microglie en faveur de ce dernier. Ces données soutiennent l'importance du dialogue entre l'immunité innée et l'immunité adaptative *via* le dialogue établi entre microglie activée et LyT infiltrants (Appel, Beers & Henkel, 2010).

La MP fournit un autre exemple de pathologie neurodégénérative à composante inflammatoire. Il y a plus de 25 ans, était rapportée pour la première fois la présence de LyT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> dans le parenchyme cérébral de patients atteints de la MP (McGeer, Itagaki, Boyes, & McGeer, 1988). Dans le modèle 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) ainsi que chez les patients atteints de MP, le rôle de l'IFN- $\gamma$  (cytokine Th1 par excellence) comme orchestrateur d'une activation microgliale neurotoxique trouve un certain nombre d'arguments expérimentaux (Hunot *et al.*, 1999; Mount *et al.*, 2007). De plus, des souris traitées au MPTP, utilisées comme modèle murin de la maladie, et, immunisées avec de l' $\alpha$ -synucléine nitrosylée, ont montré une forte réponse pro-inflammatoire et une importante prolifération de LyT dirigés contre ce néo-antigène (Benner *et al.*, 2008). Le transfert adoptif de cellules T issues de ces souris vers des souris non immunisées mais traitées au MPTP a entraîné l'augmentation de la perte neuronale chez ces animaux. Ces LyT étaient capable d'infiltrer le SNC et des souris déficientes en LyT étaient moins sensibles à la toxicité du MPTP (Benner *et al.*, 2008). En accord avec ces travaux et les résultats obtenus par McGeer et ses collaborateurs, une étude (Brochard *et al.*, 2009) a montré que des LyT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> infiltraient le parenchyme cérébral de patients parkinsoniens et de souris traitées au MPTP,

validant ainsi la pertinence du modèle pour la pathologie humaine. La présence de ces LyT à proximité immédiate avec les neurones dopaminergiques suggérait que les cellules T avaient un rôle cytotoxique direct. Confirmant les résultats de Benner et collaborateurs, les auteurs ont montré, chez des souris immunodéficientes pour les gènes *recombination activating gene-1 (RAG1)* ou *Tcrb*, une résistance au MPTP, montrant ainsi que la présence de LyT au sein de la SN des animaux traités au MPTP avait un rôle d'amplification de la neurodégénérescence. De plus, cette étude montre que cet effet est uniquement dépendant des LyT CD4<sup>+</sup> et non des CD8<sup>+</sup>, *via* une signalisation Fas-FasL qui est indépendante d'une présentation peptidique par les neurones (Giuliani *et al.*, 2003). Une autre étude a cependant montré que des Tregs infiltrant le SNC étaient en mesure d'inhiber l'activation microgliale en sécrétant des cytokines qui diminuent la réponse inflammatoire, ou en induisant directement l'apoptose des cellules microgliales *via* une signalisation Fas-FasL similaire (Reynolds *et al.*, 2009a). *In vitro*, les cellules Tregs inhibent la synthèse et la libération de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) par la microglie activée (Reynolds *et al.*, 2007). Toutefois, il convient de rappeler que l'état fonctionnel des Tregs est instable et très dépendant de l'environnement cytokinique. On ne peut donc pas anticiper la stabilité sur le moyen ou le long terme de Tregs dans un contexte d'activation microgliale M1 persistante. En outre, on ne sait pas, dans le modèle MPTP, si les cellules Tregs exercent une action neuroprotectrice par la suppression de cellules T cytotoxiques tels que Th1 ou Th17, en convertissant les phénotypes pro-inflammatoires M1 de la microglie en microglie M2, anti-inflammatoires, ou par la sécrétion directe de facteurs neurotrophiques.

Enfin, une autre étude a montré que l'injection de venin d'abeille à des souris traitées au MPTP permet une diminution de l'activation microgliale et de la perte neuronale en parallèle à une augmentation du nombre de Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Chung *et al.*, 2012).

Au total, les travaux portant sur le rôle des LyT dans le modèle MPTP n'ont à ce jour pas clairement établi le rôle protecteur ou délétère de ces cellules. Cependant, il a été montré qu'induire le recrutement de Tregs au sein du SNC était une stratégie thérapeutique efficace dans le modèle MPTP et offrant des perspectives prometteuses pour les patients atteints de MP (Reynolds *et al.*, 2007, 2009a). Dans ce cadre, notons une étude récente montrant que l'injection du facteur de croissance

hématopoïétique GM-CSF ("Granulocytes Macrophages Colony Stimulating Factor") pouvait atténuer la réponse immunitaire innée et adaptative, en altérant les profils d'activation de la microglie et en induisant la maturation de Tregs dans le modèle MPTP (Kosloski *et al.*, 2013). Dans ce travail, le transfert adoptif de Tregs induits par le GM-CSF avait un effet protecteur sur les neurones dopaminergiques soumis à l'effet toxique du MPTP. Les analyses ont en outre montré une augmentation de la production d'IL-27, régulant l'activité des LyT et B, après le transfert des Tregs (Kosloski *et al.*, 2013).

Dans le contexte général de l'immunomodulation neuroprotectrice, il a été également montré que le transfert passif, chez des souris intoxiquées au MPTP, de cellules T obtenues à partir de souris immunisées avec du copolymère-1 (Cop-1), médicament immunomodulateur, prévenait partiellement la mort cellulaire neuronale (Benner *et al.*, 2004; Schwartz & Kipnis, 2005). Le mécanisme impliquerait un effet des LyT infiltrant sur la polarisation de l'activation microgliale avec *in fine* une induction de la sécrétion microgliale des cytokines anti-inflammatoires IL-4, IL-10 et TGF- $\beta$ , accompagnée d'une diminution de la production de facteurs pro-inflammatoires. Le Cop-1 est utilisé de façon classique dans le traitement de la SEP où il favorise les réponses de type Th2, la synthèse lymphocytaire d'IL4 et l'inhibition d'IL-4 dépendante de la synthèse microgliale de radicaux libres et d'autres facteurs neurotoxiques (Duda *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2006). Un autre effet neuroprotecteur de Cop-1 pourrait être de bloquer, au moins partiellement, la différenciation et la survie des Th17 en agissant sur l'expression des facteurs de transcription clés de cette sous-population (Chen *et al.*, 2009). Il n'a cependant pas été établi avec certitude si la neuroprotection médiée par Cop-1 dans le modèle MPTP est due à un renforcement de la réponse Th2, une promotion de la fonction des Tregs CD4+CD25+ ou bien une réduction fonctionnelle des LyTh1 et/ou Th17. De façon intéressante, Cop-1 a également été montré comme diminuant fortement l'expression de l'IL-1b et augmentant la production de l'IL-1ra par des monocytes dans un modèle d'activation des monocytes induits par des cellules T (Carpintero *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent un mécanisme potentiel de neuroprotection via l'augmentation des niveaux d'IL-1ra circulant dans le sang et, possiblement, dans le SNC inflammatoire.

Au total, il apparaît clairement que dans les modèles de MP, la microglie et les cellules T sont des acteurs importants qui déterminent l'effet amplificateur ou inhibiteur du système immunitaire sur les processus de mort cellulaire autonome des neurones dopaminergiques.

**En résumé :**

- Le cerveau des vertébrés terrestres possède une **barrière hémato-encéphalique**, réputée imperméable, mais dont le **statut de site immunoprivilégié est aujourd'hui contesté**.
- La **microglie** est la cellule immune du SNC et joue le rôle de **sentinelle**. Elle peut revêtir plusieurs patterns d'activation, de la **microglie ramifiée quiescente** à la **microglie activée amiboïde** ramassée sur son soma, aux prolongements quasi-inexistants.
- Les **cellules microgliales activées** acquièrent alors un ensemble de propriétés et de fonctions présentées par les **macrophages** périphériques activés.
- Les cellules microgliales ont la capacité, en fonction de l'environnement, de **secréter des cytokines** anti- et/ou pro-inflammatoires mais encore des molécules **neurotoxiques**, ou un ensemble de molécules **neurotrophiques** participant à la survie neuronale.
- Elles ont la capacité à **recruter** sur le site de lésion et **activer** entre autres des **lymphocytes**.
- Les LyT infiltrés dans le SNC sont de **différentes sous-populations** pouvant jouer des **rôles** différents sur le processus de neurodégénérescence.
- La **microglie** et les **lyT** sont des acteurs **importants** de la régulation de la réponse immune.

## II. La maladie de Parkinson

La MP est une pathologie neurodégénérative du SNC se traduisant au plan clinique par des troubles du mouvement et du contrôle moteur. La MP se présente typiquement sous la forme d'une triade symptomatique, la triade parkinsonienne regroupant les éléments sémiologiques suivants :

**1) tremblements de repos** : lent, disparaissant lors du mouvement, touchant les membres, les lèvres ou le menton

**2) akinésie** ou, *a minima*, bradykinésie/hypokinésie, correspondant à un ralentissement et une raréfaction des mouvements volontaires

**3) rigidité de type plastique**, caractérisée par une raideur des extrémités ou de la nuque et par une résistance à la mobilisation passive, cédant par à-coups et responsable du phénomène de la roue dentée.

Cette maladie, réel problème de santé publique, avec des répercussions importantes sur les conditions de vie des malades, est la maladie neurodégénérative la plus commune après la maladie d'Alzheimer. La MP touche ainsi 0.3% de la population mondiale et 1% des individus de plus de 60 ans (de Lau & Breteler, 2006).

Bien que les premiers cas de la maladie aient été décrits et caractérisés par Sir James Parkinson en 1817 dans « An essay on the shaking palsy », le tableau des troubles cliniques moteurs de la pathologie ne fut complété qu'en 1872, par Jean-Martin Charcot. C'est à cette période que ce dernier proposa d'appeler cette affection « maladie de Parkinson », du nom de celui qui en avait le premier décrit la grande majorité des symptômes. Au cours des études suivantes, de nombreux autres symptômes, pour la plupart non-moteurs, sont venus compléter la description clinique de la MP.

La caractérisation anatomopathologique de la MP a été rendue possible grâce à l'amélioration des techniques d'immunohistologie. Différentes observations basiques peuvent être faites lors de l'étude de cerveaux de patients parkinsoniens : en premier lieu, la destruction de certaines populations dopaminergiques est notable, dans des régions bien précises de l'encéphale. Parmi ces neurones, les neurones dopaminergiques de la substantia nigra pars compacta (SNpc) sont les plus sévèrement touchés (Hirsch, Graybiel & Agid, 1988). De plus, des agrégats intraneuronaux nommés corps de Lewy sont observables à l'aide de colorations

standard et correspondent à des inclusions d' $\alpha$ -synucléine mal conformée (Kazantsev & Kolchinsky, 2008). Enfin, et bien que cette donnée ne soit pas uniquement le fait de la MP, une importante réaction inflammatoire est présente dans le cerveau des patients atteints de la MP (McGeer *et al.*, 1988a).

## II.1 Symptomatologie

### a. Troubles du contrôle moteur

La MP regroupe un ensemble de symptômes moteurs, dont nous ne détaillerons ici que les principaux.

- La bradykinésie/hypokinésie/akinésie est le symptôme le plus représentatif de la MP. Ce signe correspond à des troubles dans la planification, l'initiation et l'exécution des mouvements, notamment pour les séquences et tâches motrices simultanées (Berardelli *et al.*, 2001), probablement dus à un dysfonctionnement de l'activité corticale motrice, comme il a été montré chez le rat (Parr-Brownlie & Hyland, 2005).
- La rigidité musculaire rencontrée est caractérisée par une raideur des membres et une résistance aux mouvements au niveau des articulations occasionnant des mouvements saccadés dits « en roue crantée ou dentée » lors de la mobilisation passive.
- Les tremblements de repos constituent le symptôme le plus couramment rencontré dans la pathologie et le signe le plus fiable d'une MP (Shahed & Jankovic, 2007). 75% des patients atteints de la MP présentent un tremblement de repos. Ce symptôme semble être dû à l'atteinte d'un groupe spécifique de neurones dopaminergiques du globus pallidus (Helmich *et al.*, 2011).

- Aux trois symptômes moteurs cardinaux de la pathologie, s'ajoutent des troubles moteurs secondaires tels que, entre autres, une instabilité de posture dans les stades tardifs de la maladie, source importante de chutes chez les patients (Bronte-stewart *et al.*, 2002).

#### b. Troubles associés

Bien que la pathologie soit essentiellement caractérisée par différentes anomalies du contrôle moteur, des troubles non-moteurs associés peuvent apparaître, plus ou moins fréquemment selon les patients, soit lors de la phase pré-symptomatique, soit de manière tardive, avec l'évolution terminale de la maladie. Ces troubles peuvent regrouper une altération des fonctions cognitives allant jusqu'au stade de démence (Aarsland *et al.*, 2007), des troubles des fonctions exécutives, des troubles mnésiques (Kehagia, Barker & Robbins, 2010), du langage, émotionnels (Vriend *et al.*, 2014), ou du sommeil (Bruin, Bittencourt & Tufik, 2012; Maass & Reichmann, 2013). A noter également la présence possible d'une constipation tenace qui signe une atteinte *a minima* du système nerveux autonome (Edwards, Quigley & Pfeiffer, 1992).

#### c. Neuropathologie

Sur le plan de la symptomatologie clinique, la MP est relativement polymorphe ce qui rend le diagnostic parfois difficile. Alors que pendant longtemps, seule l'autopsie des patients permettait de manière certaine d'établir un diagnostic de MP, de nouvelles méthodes, notamment en imagerie, sont des outils diagnostiques fiables du vivant du patient (Alberio *et al.*, 2012; Schmid *et al.*, 2013). Toutefois, les études neuropathologiques sont un apport majeur à la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la MP et à l'identification de formes frontières telles que les synucleopathies (Goedert, 1999).

Dans les formes sporadiques de la pathologie, des corps de Lewy dans le cytoplasme des neurones dégénérés sont observés dans la SN ainsi que dans d'autres régions cérébrales touchées par le processus dégénératif (Braak *et al.*, 2003b; Braak & Del Tredici, 2008).

L'étude de la distribution topographique des corps et neurites de Lewy à l'aide de marquages  $\alpha$ -synucléine a permis à Braak et collaborateurs de proposer un décours évolutif en 6 stades neuropathologiques (Braak *et al.*, 2003b) :

- le stade 1 est caractérisé par la présence de corps de Lewy dans la partie dorsale des noyaux moteurs IX/X.
- Le stade 2 regroupe les lésions du stade 1 plus des lésions du bulbe olfactif, des *raphe caudalis* et du *locus coeruleus*.
- Le stade 3 regroupe les lésions du stade 2 plus des lésions du mésencéphale, et plus spécifiquement de la substance noire *pars compacta*. À ce stade-là de la pathologie, les symptômes n'apparaissent pas encore. C'est la phase présymptomatique.
- Le stade 4, premier stade de la phase symptomatique, voit l'aggravation des lésions du stade 3, notamment au niveau de la substance noire *pars compacta*, et l'apparition de lésions du prosencéphale et du mésocortex. Les premiers signes cliniques de la MP n'apparaissent pas avant que 60-75% des neurones de la SNpc n'aient disparu (DelleDonne *et al.*, 2008).
- La pathologie s'étend au stade 5 jusqu'à toucher des aires sensorielles associatives et préfrontales du néocortex.
- Au cours du stade 6, les lésions au niveau des zones sensorielles associatives et du néocortex s'étendent ; les aires prémotrices et l'aire motrice primaire sont atteintes.

Des patterns neuropathologiques similaires ont été décrits dans les formes génétiques les plus courantes (i.e. celles concernant les gènes *SNCA*, *PARKIN*, *LRRK2* et *PINK1*), avec une perte de neurones et de fibres de la voie nigrostriée et la présence d'agrégats protéiques (principalement de l' $\alpha$ -synucléine) également appelés corps de Lewy (Duda *et al.*, 2002; Gouider-Khouja *et al.*, 2003; Zimprich *et*

*al.*, 2004; Pramstaller *et al.*, 2005; Samaranch *et al.*, 2010). Il est à noter cependant que dans le cas de certaines mutations, on n'observe pas d'agrégats d' $\alpha$ -synucléine dans le cerveau des patients (Mori *et al.*, 1998; Hayashi *et al.*, 2000).

Par ailleurs, comme mentionné plus haut, il existe également d'autres pathologies neurodégénératives caractérisées par la présence d'agrégats d' $\alpha$ -synucléine mais qui pour autant n'impliquent pas spécifiquement le système nigrostrié (Gilman *et al.*, 2008; Lee, Bae & Lee, 2014).

### **En résumé :**

- La MP est un **trouble du contrôle moteur** touchant 1% des personnes de plus de 60 ans.
- Les troubles moteurs principaux consistent en une **bradykinésie**, une **rigidité** et un **tremblement** de repos.
- Des **troubles non-moteurs associés peuvent apparaître** : démence, troubles du contrôle émotionnel, du sommeil, mnésiques et troubles des fonctions exécutives.
- La neuropathologie de la MP est caractérisée par **une perte de neurones** et de fibres dopaminergiques et par la présence d'**agrégats intraneuronaux d' $\alpha$ -synucléine** (corps de Lewy) dans les structures touchées.
- L'étendue topographique des lésions et des corps de Lewy, partant du *tegmentum* jusqu'aux aires néocorticales motrices, a permis à Braak et collaborateurs d'établir **6 stades d'évolution**.

## II.2. Étiologie

### a. Facteurs génétiques

L'étiologie de la MP est mal connue. En effet, du fait d'une détection tardive de la maladie, il s'avère difficile d'en déterminer les causes, excepté dans les formes héréditaires où des anomalies génétiques ont été identifiées. Les cas où une origine monogénique de la maladie a pu être clairement établie représentent environ 5% de l'ensemble des patients (Thomas & Beal, 2007). Selon le gène incriminé, la transmission de l'anomalie génétique s'effectue selon un mode autosomique dominant ou autosomique récessif. Les mutations dans le gène  $\alpha$ -synucléine (SNCA), dont le lien avec la MP fut pour la première fois montré, puis par la suite confirmé, il y a de cela environ 17 ans (Polymeropoulos *et al.*, 1997), rendent compte d'environ 2% des formes autosomiques dominantes de la MP. Un exemple intéressant est donné par le gène LRRK2 dont la mutation G2019S est responsable de formes familiales à transmission autosomique dominante mais également de cas sporadiques. Le gène LRRK2 est ainsi retrouvé dans 2% à 6% des formes sporadiques de la maladie, et près de 5% à 18% des formes familiales (Di Fonzo *et al.*, 2005 ; Nichols *et al.*, 2005). L'exemple de LRRK2 souligne la complexité de la génétique de la MP et l'importance des phénomènes de pénétrance incomplète, c'est-à-dire de disparité entre un génotype et l'expression phénotypique en résultant. Parmi les gènes impliqués dans une transmission autosomique récessive, citons le gène *Parkin* responsable d'environ 50% de ces formes monogéniques récessives, et les gènes *PINK1* et *DJ-1* beaucoup moins souvent en cause (Hedrich *et al.*, 2004). Alors que des formes sporadiques de la MP peuvent être de cause monogénique, la susceptibilité génétique de ces formes non familiales est souvent portée par plusieurs gènes dont certains variants sont significativement associés à un risque plus élevé de MP. L'identification de ces gènes et de leurs variants (liés à la présence de mutations ponctuelles altérant de façon subtile leur fonction) a été rendue possible par les études GWAS ("Genome-wide association studies"). De façon intéressante, certains des gènes identifiés sont également impliqués dans les formes familiales de MP, mais présentent alors des mutations différentes. C'est le cas de SNCA et de LRRK2 dont les mutations sont soit de simples variants associés

à un risque accru de MP soit des anomalies responsables de formes monogéniques de la MP. Parmi les gènes dont certains SNP ("single nucleotide polymorphisms") sont associés à la MP, citons les gènes HLA-DRA, ApoE et GBA (beta glucocérébrosidase) (Klein & Westenberger, 2012).

#### b. Facteurs environnementaux

##### - Exposition à des toxines

Des facteurs environnementaux peuvent, éventuellement seuls ou sur un terrain génétique prédisposant, déclencher une MP.

En 1976, un cas de MP identifié au sein d'une communauté d'héroïnomanes a été associé à l'utilisation de drogue. Un composé neurotoxique puissant, le MPTP, avait été obtenu par inadvertance suite à une mauvaise synthétisation de l'héroïne. Lorsque le jeune drogué mourut quelques mois plus tard des suites d'un surdosage de cocaïne, son autopsie révéla que les neurones dopaminergiques de la SN avaient été détruits en grand nombre. Plus tard, en 1982, 7 nouveaux cas de MP sont détectés. Le neurologue J. Langston, en collaboration avec le National Institute of Health (NIH), imputa ces cas à l'utilisation de MPPP contaminé au MPTP (Langston & Ballard, 1983), identifiant ainsi le premier composé environnemental pouvant être responsable de la pathologie.

##### - Exposition à des pesticides

Plusieurs facteurs environnementaux sont suspectés d'être l'une des causes de l'apparition de la MP (Chung *et al.*, 2013), comme l'exposition à des produits chimiques tels que des solvants ou bien encore des pesticides. Cette maladie résulte très probablement de multiples facteurs prédisposants génétiques et environnementaux, mais la manière dont l'exposition à un composé chimique conduit à une perte neuronale et aux symptômes de la MP est assez mal connue. L'intérêt suscité concernant la relation entre l'exposition aux pesticides et le risque de maladie neurodégénérative telle que la MP est ancien, et a été l'objet de nombre débats (Wirdefeldt *et al.*, 2011a). Une récente analyse de plus de cent études

épidémiologiques publiées a établi un lien évident entre une exposition chronique (*i.e.* en l'absence d'empoisonnement) à des pesticides et la MP (Pezzoli & Cereda, 2013).

Le principe d'un lien de causalité entre pesticides et MP a été accepté par le législateur en 2012 (Décret n° 2012-665 du 4 mai 2012 révisant et complétant les tableaux des maladies professionnelles en agriculture annexés au livre VII du code rural et de la pêche maritime). Plus spécifiquement, la roténone, insecticide d'origine naturelle et le Paraquat, un herbicide, ont été reconnus comme les responsables de la déclaration de la maladie (Tanner *et al.*, 2011). Il s'avère que ces deux pesticides ont des structures et modes d'action similaires avec le MPP+, l'agent actif du MPTP (Wirdefeldt *et al.*, 2011b). Bien que les effets et mécanismes d'action du paraquat soient plus souvent étudiés que ceux de la roténone, des données récentes issues d'une étude menée chez des fermiers a pu mettre en évidence un lien entre l'utilisation de cet insecticide et l'apparition de la MP (Tanner *et al.*, 2011).

Le Paraquat est un herbicide produit dès le début des années 60. Il est l'un des plus utilisés au monde et, selon son fabricant, serait distribué dans plus d'une centaine de pays. Considéré comme très toxique, son utilisation a malgré tout été autorisée pendant des années, jusqu'en 2007. Plusieurs études épidémiologiques ont pourtant identifié le paraquat comme un facteur de risque pour la MP (Liou *et al.*, 1997).

Une étude menée chez la souris a montré que le stress oxydatif semblait jouer un rôle important dans les mécanismes de toxicité du paraquat (McCormack *et al.*, 2005). Lors de cette expérience, les auteurs ont injecté en intrapéritonéal 3 doses de paraquat aux animaux, et ont constaté dès la seconde injection, une importante perte de neurones dopaminergiques. Les auteurs concluent que la première injection agirait comme un « priming » augmentant la vulnérabilité des neurones à dopamine à une lésion toxique subséquente. La perte des neurones dopaminergiques suite à l'exposition au paraquat était accompagnée d'une augmentation de neurones immunoréactifs pour le 4-HNE, un marqueur de la lipoperoxydation, mécanisme produisant des radicaux libres, responsables de l'oxydation. Par ailleurs, plusieurs études montrent que le paraquat perturbe le métabolisme dopaminergique en altérant la fonction du transporteur à la dopamine DAT (Ossowska *et al.*, 2005; Rappold *et al.*, 2011)

### c. Les traumatismes crâniens

Les traumatismes crâniens et, d'une manière générale, les chocs violents à la tête pouvant parfois occasionner des lésions de la SN, ont également été identifiés comme l'un des facteurs déclencheurs d'une MP ; risque d'autant plus augmenté chez des personnes présentant une susceptibilité génétique (Jafari *et al.*, 2013). Dans ces conditions, les boxeurs, ont un plus grand risque de développer une MP s'ils y sont génétiquement prédisposés (Lolekha, Phanthumchinda & Bhidayasiri, 2010). On peut par exemple citer le célèbre cas du boxeur Mohamed Ali, ayant déclenché une MP, diagnostiquée en 1984, bien qu'aucun lien entre sa profession et sa maladie ne puisse être établi de manière certaine.

### d. L'origine infectieuse

Enfin, la dernière hypothèse concernant un facteur à risque pour la MP est l'existence d'une origine infectieuse de la maladie. En effet, plusieurs études ont établi un lien entre MP et différents agents pathogènes. Si l'on sait depuis Pasteur et le virus de la rage que les virus neurotropiques peuvent persister dans le SNC et induire une encéphalite infectieuse chronique, les virus neurotropes peuvent également rester latents pendant de nombreuses années puis se réactiver ou induire une infection aiguë qui néanmoins provoque une altération durable et évolutive de l'homéostasie cérébrale : il s'agit de l'hypothèse du "hit and run" (Lo *et al.*, 2003). Dans le contexte de la MP, c'est le virus de la grippe qui a été le plus souvent incriminé. La majeure partie des liens qui peuvent être établis entre la MP et le virus de la grippe repose sur la vague d'Encephalitis Lethargica, plus connue sous le nom Encéphalite de Von Economo, et qui correspond à une incidence anormalement élevée de parkinsonisme postencéphalite subséquente à l'épidémie de grippe de 1918, causée par le virus de la grippe H1N1.

L'ensemble de ces données indique que l'étiologie de la MP n'est pas clairement établie et découle possiblement d'une conjonction d'événements déclencheurs, survenant sur un terrain génétiquement prédisposé.

## En résumé :

- L'étiologie de la MP est **mal connue**, du fait d'une détection **tardive**.
- Environ 5% des MP ont été imputées à des **anomalies génétiques** à transmission autosomique dominante, notamment sur les gènes **SNCA**, **LRRK2**, ou à transmission autosomique récessive, avec les gènes **Parkin**, **PINK1** et **DJ1**, responsables de **formes familiales** et/ou **sporadiques** de la pathologie, en fonction de la mutation
- Des **facteurs environnementaux** ont également été identifiés comme pouvant faire partie de l'étiologie de la MP : solvants, **pesticides**, **toxines**, traumatismes crâniens.
- Une **origine infectieuse** de la MP a été suggérée par une **incidence anormalement élevée** de parkinsonisme postenchéphalite subséquente à l'épidémie de grippe de 1918, causée par le **virus de la grippe H1N1**.

### II.3 Réponses neuro-immunes et maladie de Parkinson.

Comme nous l'avons vu précédemment, les maladies neurodégénératives et en particulier la MP induisent une réaction neuro-immune dont la composante purement neuro-inflammatoire n'est que l'un des aspects. En effet, cette réponse neuro-immune met en jeu non seulement les cellules et molécules de l'immunité innée, au premier rang desquelles la microglie et le système du complément, mais également les cellules du système immunitaire adaptatif et notamment les LyT. Une large partie de la littérature considère que ces processus neuro-immuns dans leur ensemble pourraient être impliqués dans la mise en place et l'évolution de la neurodégénérescence (Khandelwal, Herman & Moussa, 2011).

Dans ce chapitre de notre introduction bibliographique, nous fournirons une description critique de la littérature relative au rôle du système immunitaire dans la physiopathologie de la MP ou de ses modèles animaux. Deux aspects seront plus spécifiquement abordés : l'activation microgliale et l'implication des LyT. Nous verrons ainsi que la MP s'accompagne non seulement de processus immuns au sein du SNC, par le concours de l'immunité innée et adaptative, mais également d'altérations immunes périphériques tant moléculaires que cellulaires.

### a. Activation des cellules microgliales

- phagocytose vs. présentation antigénique

De nombreuses études ont impliqué la neuro-inflammation et plus spécifiquement les cellules microgliales dans le développement et la progression de la mort des neurones dopaminergiques de la SNpc (Tansey & Goldberg, 2010). Du vivant des patients, l'imagerie par tomographie par émission de positron (TEP), après injection d'un radioligand liant les récepteurs au benzodiazépines, a permis de visualiser l'activation microgliale dans le pons, les noyaux gris centraux, le striatum et des régions corticales frontales et temporales des patients atteints de MP (Ouchi *et al.*, 2005; Gerhard *et al.*, 2006). Ces résultats sont en accord avec les analyses immunohistologiques *post-mortem*, montrant dans le SNC les signes morphologiques et fonctionnels d'une activation microgliale : augmentation de la densité cellulaire, rétraction des ramifications et hypertrophie du corps cellulaire, expression des molécules du CMH II (McGeer *et al.*, 1988a; Imamura *et al.*, 2003; Croisier *et al.*, 2005; Orr *et al.*, 2005), augmentation de l'expression du marqueur lysosomal CD68 (Banati, Daniel & Blunt, 1998; Croisier *et al.*, 2005). La phagocytose et la présentation antigénique sont classiquement les deux principales fonctions attribuées aux cellules microgliales. Dans le modèle 6-hydroxydopamine (6-OHDA), l'analyse du marqueur lysosomal CD68, reflet de l'activité de phagocytose, et des molécules CMH II, reflet du rôle de présentation antigénique montre que ces deux fonctions évoluent possiblement suivant des cinétiques indépendantes et ne sont pas nécessairement parallèles à celle de la mort neuronale (Akiyama & McGeer, 1989; Marinova-Mutafchieva *et al.*, 2009; Vázquez-Claverie *et al.*, 2009; Sanchez-Guajardo *et al.*, 2010). Selon les études, le pic d'activité phagocytaire, déterminé par le niveau d'expression de CD68, a été rapporté comme étant antérieur ou postérieur au pic de mort neuronale (Henry *et al.*, 2009; Marinova-Mutafchieva *et al.*, 2009). Ces résultats contradictoires conduisent à des hypothèses opposées quant au rôle de l'activation microgliale. Dans le cas d'une activité phagocytaire qui précède ou accompagne la mort neuronale, on peut supposer qu'un processus de dérégulation des fonctions phagocytaires amplifie les mécanismes autonomes de mort neuronale. Le terme de phagocytose primaire ou de "phagoptosis" a récemment été proposé pour décrire la phagocytose de neurones non apoptotiques exprimant des signaux "eat-me" perçus

par la microglie activée (Brown & Neher, 2012; Emrich *et al.*, 2013; Neher *et al.*, 2013). *A contrario*, un pic d'activité phagocytaire qui suit le pic de mort neuronale suggère que la principale fonction des cellules microgliales est l'élimination de débris cellulaires neuronaux. Historiquement, cette activité de cellule éboueur ("scavenger cell") est la principale fonction attribuée à la microglie et continue d'ailleurs à être proposée comme fonction prédominante dans la MP et d'autres types de pathologie (Barnett, Henderson & Prineas, 2006; Henry *et al.*, 2009).

#### b. Rôle des signaux instructeurs lymphocytaires

Outre la phagocytose et la présentation d'antigènes, la microglie activée présente la propriété importante de sécréter un ensemble de cytokines qui, selon le programme d'activation, sont soit pro-inflammatoires, soit anti-inflammatoires. Des protéines pro-inflammatoires potentiellement neurotoxiques sont exprimées dans les cerveaux de patients atteints de MP : citons COX et iNOS, le TNF $\alpha$ , l'L1 $\beta$ , et l'IFN $\gamma$  (Hunot *et al.*, 1996; Knott, Stern & Wilkin, 2000). Bien que les niveaux endogènes d'IFN $\gamma$  dans le cerveau humain normal sont connus pour être pratiquement indétectables (Frugier *et al.*, 2010), une surproduction de cette cytokine a été rapportée chez certains patients parkinsoniens (Hunot *et al.*, 1996) et un polymorphisme du gène *IFNG* est associé à un plus grand risque de développer des troubles cognitifs chez les patients MP (Nie *et al.*, 2013). Les LyT sont les principales cellules productrices d'IFN $\gamma$ , cytokine connue pour activer les macrophages (dont la microglie). De nombreuses études réalisées chez l'animal démontrent un rôle délétère de l'IFN $\gamma$  dans la physiopathologie de la MP (Litteljohn *et al.*, 2009; Barcia *et al.*, 2011; Chakrabarty *et al.*, 2011; Mangano *et al.*, 2012). Les LyTh1 étant la principale source d'IFN $\gamma$  et les macrophages la principale cellule cible de cette cytokine, ces résultats suggèrent que le dialogue entre Th1 et les cellules microgliales dans la SN des patients MP pourrait constituer un évènement clé de la perte neuronale dopaminergique. *A contrario*, la cytokine Th2 IL-10 induit un programme d'activation microgliale neuroprotecteur qui prévient la mort cellulaire des neurones dopaminergiques *in vitro* ou *in vivo* (Qian *et al.*, 2006a; Qian, Hong & Flood, 2006b; Arimoto *et al.*, 2007). De la même façon, dans le modèle MPTP, les Tregs préviennent la dégénérescence des neurones dopaminergiques en modifiant le comportement moléculaire des cellules microgliales

(Reynolds *et al.*, 2007; Kosloski *et al.*, 2013). Les cellules microgliales exercent donc probablement des effets distincts et possiblement opposés en fonction du stade évolutif de la MP, du terrain immunogénétique, et d'un ensemble de signaux instructeurs délivrés notamment par les LyT infiltrants. Par ailleurs, bien que la notion de mémoire immune soit réservée au système immunitaire adaptatif, on peut émettre l'hypothèse qu'un phénomène de priming ou d'apprentissage des cellules microgliales, déjà décrit sous le nom de "trained immunity" pour certaines cellules de l'immunité innée (Quintin *et al.*, 2014) pourrait induire des programmes d'activation complexes que l'on ne peut pas observer ni reproduire dans des cellules "naïves". Il faut d'ailleurs noter que les profils cytokiniques observés dans le tissu cérébral et/ou le LCR des patients parkinsoniens associent le plus souvent cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 entre autres) et des cytokines réputées anti-inflammatoires (IL-4 et TGF- $\beta$  notamment) (Mogi *et al.*, 1996; Hirsch *et al.*, 1998; Nagatsu *et al.*, 2000).

### c. Rôle de l'alpha-synucléine

Si l'activation microgliale est reconnue et relativement bien caractérisée dans la MP, les molécules instructrices induisant les programmes d'activation microgliaux sont encore imparfaitement connues. Venant s'ajouter aux signaux dérivant des LyT infiltrants, un certain nombre de molécules doivent être considérées. En particulier, l' $\alpha$ -synucléine relarguée par les neurones dégénérés est un puissant inducteur de la migration et de l'activation microgliale (Zhang *et al.*, 2005; Harms *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013, 2014; Roodveldt *et al.*, 2013). Cet effet activateur est médié par la liaison de l' $\alpha$ -synucléine au récepteur Toll-like TLR2 (Kim *et al.*, 2013). Toutefois, une étude récente réalisée dans un modèle de souris transgénique surexprimant l' $\alpha$ -synucléine montre que l'expression microgliale de TLR4 permet la clairance de l' $\alpha$ -synucléine et en limite partiellement les effets neurotoxiques (Noelker *et al.*, 2013). Par ailleurs, dans un modèle transgénique similaire, les molécules CMH II exprimées par la microglie sont nécessaires à l'effet activateur de l' $\alpha$ -synucléine, à la prolifération des LyT CD4 *in situ* et à la perte neuronale dopaminergique (Harms *et al.*, 2013). Enfin, il est également intéressant de noter que la microglie activée, en sécrétant des espèces réactives oxygénées, peut induire la formation d' $\alpha$ -synucléine nitrosylée

(Shavali, Combs & Ebadi, 2006) qui correspond à une forme immunogène d' $\alpha$ -synucléine (Benner *et al.*, 2008). Il faut également considérer la possibilité d'un effet activateur de l' $\alpha$ -synucléine sur le système immunitaire à la périphérie. En effet, des formes anormales d' $\alpha$ -synucléine phosphorylée ont été détectées dans les organes périphériques (intestins, glandes endocrines notamment) chez des patients atteints de MP (Beach *et al.*, 2010) et des anticorps anti  $\alpha$ -synucléine sont détectables dans le sérum et le LCR de patients atteints de certaines formes familiales de MP (Papachroni *et al.*, 2007).

#### d. Rôle des signaux immuns périphériques

Depuis les travaux de Cunningham et Perry, on reconnaît que des événements immuns périphériques peuvent modifier le décours de pathologies neurodégénératives *via* notamment une modification du comportement moléculaire des cellules microgliales (Cunningham *et al.*, 2005; Perry, Cunningham & Holmes, 2007). Plusieurs études ont mis en évidence des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires et/ou de chimiokines dans le sérum de patients parkinsoniens (Dobbs *et al.*, 1999; Reale *et al.*, 2009; Menza *et al.*, 2010; Lindqvist *et al.*, 2012). En particulier des taux sériques élevés de TNF- $\alpha$  sont corrélés à une plus grande incidence des troubles cognitifs ou de l'humeur (Menza *et al.*, 2010; Lindqvist *et al.*, 2012). Il est difficile d'établir la cause de ces anomalies cytokiniques à la périphérie même si l'hypothèse d'un effet activateur de l' $\alpha$ -synucléine sur les cellules sanguines est à prendre en compte. Quoi qu'il en soit, un effet pro-inflammatoire de ces cytokines sanguines sur les cellules microgliales participe très probablement à la physiopathologie de la MP.

### e. Implication des LyT

Plusieurs études ont décrit une infiltration de LyT dans la SN de patients atteints de la MP (McGeer, Itagaki & McGeer, 1988b; Brochard *et al.*, 2009). Dans le contexte neuro-inflammatoire de la MP, les facteurs chimiotactiques sécrétés par la microglie participent probablement au recrutement des LyT (Aloisi, 2001; Kim & de Vellis, 2005; Sriram, Miller & O'Callaghan, 2006), de même que les nombreuses cytokines qui augmentent la perméabilité de la BHE et qui sont sécrétées par les cellules gliales et/ou les cellules endothéliales activées (Combes *et al.*, 2012; Alvarez, Katayama & Prat, 2013). Des anomalies de la BHE pouvant, possiblement, induire un recrutement des LyT ont été décrites dans la MP et dans d'autres pathologies neurodégénératives (Grammas, Martinez & Miller, 2011; Guan *et al.*, 2013). Toutefois, le rôle exercé par les Ly T infiltrant la SN des patients Parkinsoniens reste débattu : s'agit-il d'une réponse T aspécifique secondaire à l'altération de la BHE ? S'agit-il d'une réponse antigène spécifique ? L'antigène cible est-il présenté par les cellules microgliales et/ou les neurones ? L'antigène cible est-il l' $\alpha$ -synucléine ? Ces questions ont jusqu'alors été abordées au travers du modèle MPTP. Dans ce modèle, une infiltration T a été démontrée dans la SN, les souris déficientes en LyT sont protégées des effets neurotoxiques du MPTP (Brochard *et al.*, 2009) et une réponse T dirigée contre une forme nitrosylée de l' $\alpha$ -synucléine a été rapportée (Benner *et al.*, 2008; Reynolds *et al.*, 2009b). Sur la base de ces travaux, au moins deux schémas physiopathologiques sont proposés qui confèrent un rôle majeur aux LyT dans le modèle MPTP : i) les lymphocytes cytotoxiques T CD4 exprimant FasL induisent l'apoptose des neurones dopaminergiques (Brochard *et al.*, 2009), ii) les lymphocytes CD4 Th1, Th17 et CD4 Tregs induisent des programmes d'activation microgliale respectivement neurotoxiques ou neuroprotecteurs (Benner *et al.*, 2008; Reynolds *et al.*, 2009b, 2010). Dans le cadre général de ces hypothèses, les résultats de deux études récentes méritent d'être mentionnés : l'une d'elle montre que les neurones activés par des molécules inflammatoires synthétisées par la microglie, expriment les molécules CMH classe I, les rendant susceptibles aux effets cytotoxiques de LyT CD8 (Cebrián *et al.*, 2014) ; la deuxième montre que l'expression lymphocytaire du récepteur à la dopamine D3R est nécessaire à l'effet neurotoxique exercé par les LyT CD4 Th1 *via* l'activation microgliale (González *et al.*, 2013). De nombreuses interrogations restent donc en suspens quant au rôle des LyT

dans la MP et ses modèles animaux. Toutefois, si le tissu cérébral reste d'analyse relativement difficile sur des échantillons *post-mortem*, les études réalisées sur des prélèvements sanguins ont permis de générer un certain nombre de résultats intéressants concernant les anomalies périphériques du phénotype et/ou des fonctions lymphocytaires chez les patients atteints de MP. Ainsi, il a été montré que le nombre total de lymphocytes circulants était réduit de 17%, tandis que le nombre de cellules B CD19<sup>+</sup> est diminué d'au moins 35% et que les LyT CD3<sup>+</sup> ont une baisse de leur nombre de 22% (Bas *et al.*, 2001). Parmi les cellules CD3<sup>+</sup>, le nombre de cellules T CD4<sup>+</sup> était diminué de 31%, alors que le nombre de LyT CD8<sup>+</sup> n'était lui pas significativement changé. Une perte importante de LyT CD4<sup>+</sup> (CD45RA<sup>+</sup>) a aussi été observée, mais également dans d'autres maladies telles que la SEP et le syndrome de Down, suggérant une anomalie immunologique commune entre ces pathologies (Fiszer *et al.*, 1994; Crucian *et al.*, 1995). Certains arguments expérimentaux suggèrent que la relative lymphopénie observée chez les patients Parkinsoniens résulte d'un processus d'apoptose accrue des LyT sanguins (Migliore *et al.*, 2002; Blandini *et al.*, 2003; Cornetta *et al.*, 2009; Calopa *et al.*, 2010). Par ailleurs, une augmentation de LyT cytotoxiques (Hisanaga *et al.*, 2001), en parallèle avec une diminution du nombre et des fonctions des Tregs ont été démontrées dans le sang de patients atteints de MP (Baba *et al.*, 2005; Saunders *et al.*, 2012), tandis qu'une augmentation de Tregs est observée, en condition physiologique, chez le sujet âgé (Rosenkranz *et al.*, 2007). Enfin, une fréquence plus élevée de LyT exprimant les chaînes  $\gamma$  et  $\delta$  du TCR (LyT TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>) a aussi été observée dans le LCR de patients parkinsoniens (Fiszer *et al.*, 1994). En résumé, ces résultats mettent en évidence une réponse lymphocytaire T complexe, périphérique et centrale, caractérisée par la co-existence de signes d'activation (recrutement intracérébral de LyT) et de signes d'immunodéficiência (défaut de fonction des Tregs, lymphopénie). Relier ces anomalies au processus neuro-inflammatoire et à la neurodégénérescence est un challenge important pour la compréhension physiopathologique de la MP et pour le design de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant le système immunitaire.

## f. Implication d'autres populations lymphocytaires

Outre l'implication des LyT classiques (portant un TCR  $\alpha\beta$ ), un rôle de populations lymphocytaires non conventionnelles telles que les Ly NK et les LyT  $\gamma\delta$  est suggéré dans la physiopathologie de la MP. En particulier, des études montrent que les lymphocytes NK, présentent des perturbations de nombre ou de fonction au cours de la pathologie.

Les lymphocytes NK (« Natural Killer »), aussi appelés **cellules tueuses naturelles**, sont des cellules de l'immunité innée, en mesure de **lyser**, sélectivement et **indépendamment de la présentation d'antigène**, les cellules tumorales ou les cellules infectées, directement, ou en orientant la réponse des lymphocytes T et B, au moyen de cytokines sécrétées et de présentation d'antigènes. Ils n'ont de plus **pas besoin d'être activés** au préalable pour exercer cette activité. Les fonctions cytotoxiques des NK sont **régulées** par un ensemble de molécules membranaires exprimées par les cellules interagissant avec les NK (Vivier *et al.*, 2008). La destruction de la cellule cible ne se fera **que si la somme** des signaux activateurs dépasse la seule présence d'un signal inhibiteur. Qui plus est, les cellules tumorales ou infectées présentent à leur surface des antigènes contre lesquels le système immunitaire a développé une **réponse anticorps**. Ainsi, les **NK se fixent aux cellules identifiées** pour les détruire, soit *via* les voies **perforines/granzymes** ou encore Fas (Trapani & Smyth, 2002; Tauzin *et al.*, 2012) soit par un mécanisme dit de cytotoxicité anticorps-dépendante (« Antibody-dependent cell cytotoxicity »).

Il a été montré que le nombre de **cellules NK était augmenté** dans le sang des patients parkinsoniens (Niwa *et al.*, 2012). Il a également été observé, chez les parkinsoniens, que l'expression du **récepteur inhibiteur NKG2A était diminuée** à la surface des NK périphériques, les rendant ainsi **plus sensibles** à l'activation (Mihara *et al.*, 2008).



## En résumé :

- Les maladies neurodégénératives et en particulier la MP induisent **une réaction neuro-immune** mettant en jeu les molécules (système du complément) et cellules de l'immunité innée (**microglie**), mais également du système immunitaire adaptatif (**LyT**).
- Le **pic** d'activité phagocytaire de la microglie est **antérieur ou postérieur au pic de neurodégénérescence**. Une dérégulation des fonctions phagocytaires pourrait **amplifier** les mécanismes autonomes de **mort neuronale** ou les cellules microgliales pourraient éliminer les **débris** cellulaires neuronaux.
- L'**IFN-γ**, principalement produite par les **Th1** est connue pour **activer les macrophages**. La cytokine **Th2 IL-10** ainsi que les **Tregs** induisent une **protection** envers les neurones dopaminergiques **via** la microglie.
- La microglie activée exprime les molécules **CMH II**, impliquées dans la **perte** dopaminergique et la **prolifération** des LyT CD4, et peut induire la formation de **formes anormales** d' $\alpha$ -synucléine, puissant inducteur de la migration et de l'**activation microgliale**, relarguées par les **neurones dégénérés**.
- Des événements immuns **périphériques**, comme un effet pro-inflammatoire de cytokines sanguines de patients parkinsoniens, peuvent **modifier le décours** de pathologies neurodégénératives **via** une modification du comportement de la **microglie**, ce qui pourrait **participer** à la physiopathologie de la MP.
- Une réponse complexe et globale des **LyT** est mise en évidence par la co-existence de signes d'activation (**recrutement** intracérébral de LyT) et de signes de modifications immunes (lymphopénie, **défait de fonction** des Tregs, et **augmentation** des LyT cytotoxiques chez les patients parkinsoniens).
- Des études montrent que les **lymphocytes NK**, présentent des **perturbations de nombre ou de fonction** au cours de la pathologie.

## II.4. Le système dopaminergique

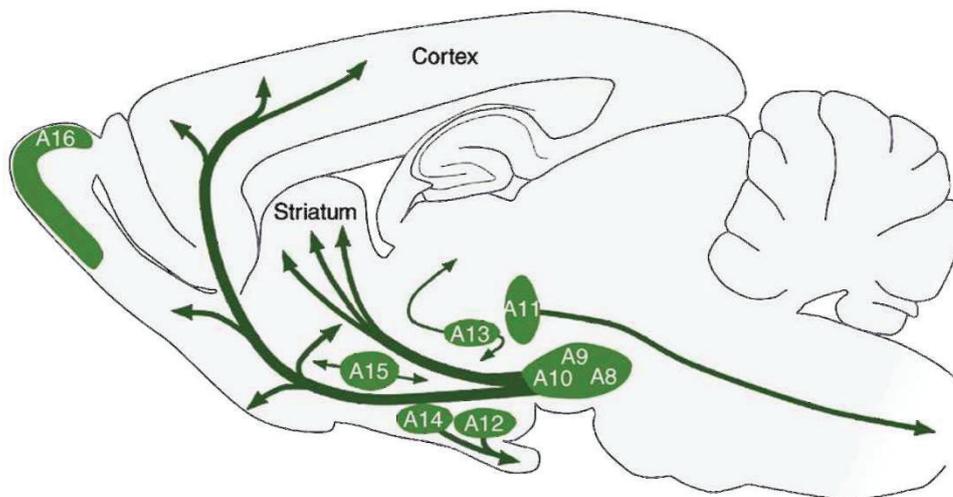
La MP étant principalement caractérisée par la dégénérescence des voies dopaminergiques, la bonne connaissance de la neurophysiologie et de la neuro-anatomie des structures mésencéphaliques impliquées ainsi que des neurones dopaminergiques est primordiale afin d'étudier la pathologie de manière pertinente. Dans cette optique, la SN est par ailleurs d'un intérêt plus particulier, car cette structure est la plus sévèrement touchée dans la pathologie.

### a. Voies dopaminergiques mésencéphaliques

Dans le cerveau, la principale source de dopamine est représentée par les neurones dopaminergiques mésencéphaliques. Grâce aux avancées des techniques d'histofluorescence au début des années 60, Dahlström et Fuxe ont pu identifier les neurones à dopamine dans le mésencéphale (Dahlström & Fuxe, 1964). Ces neurones sont répartis en trois groupes de noyaux présents dans chaque hémisphère. Ces groupes ont été nommés A8, A9 et A10 (Björklund & Dunnett, 2007). Selon cette nomenclature, la SN est la région A9, et l'aire tegmentale ventrale (ATV) est la région A10. La SN est un petit groupe de neurones situé dans le mésencéphale exprimant fortement la mélanine chez l'homme (ce qui donne la couleur noire à ce noyau). Ce n'est pas une structure homogène, et plusieurs types de neurones y coexistent, se distinguant d'un point de vue morphologique et neurochimique. Les corps cellulaires des neurones dopaminergiques forment un ensemble compact et uniforme, regroupés dans la SNpc, située dorsalement par rapport à la SN *pars reticulata* (SNpr), constituée essentiellement de fibres dopaminergiques et d'autres populations neuronales, entre autre les neurones GABAergiques (Parent & Hazrati, 1995). Ces différentes populations neuronales sont interconnectées au sein de la structure (Damier *et al.*, 1999). La SN projette vers le striatum principalement pour former la « voie nigrostriée ». Cette voie est responsable du contrôle de la motricité volontaire. Des projections entre la SN et des structures thalamiques ont été décrites (Cebrián & Prensa, 2010). L'ATV est située dans la partie médiane et dorsomédiane de l'hémisphère par rapport à la SN. 80% des neurones constituant cette structure sont dopaminergiques. Cette structure se projette au niveau du système limbique et du cortex, pour former le système de

récompense de la « voie mésocorticolimbique » (Swanson, 1982), ayant des connections avec le noyau accumbens. La SN s'étend caudalement et dorsalement pour former le noyau A8, projetant sur les aires limbiques, corticales et striatales (Björklund & Dunnett, 2007). Par ailleurs, il semble que les neurones dopaminergiques de la SN projettent aussi sur les interneurons GABAergiques striataux (Tepper, Abercrombie & Bolam, 2007).

Le schéma suivant reprend les différents réseaux dopaminergiques dans le cerveau de souris adulte (Björklund & Dunnett, 2007):



Le système dopaminergique n'a pas la même complexité chez toutes les espèces, et le nombre de cellules immunoréactives pour la tyrosine hydroxylase (TH) pour les 3 principaux groupes de neurones est d'environ 25 000 chez la souris, 45 000 chez le rat et 500 000 chez l'Homme (Nelson *et al.*, 1996; Damier *et al.*, 1999).

## b. Les neurones dopaminergiques

### - Description morphologique

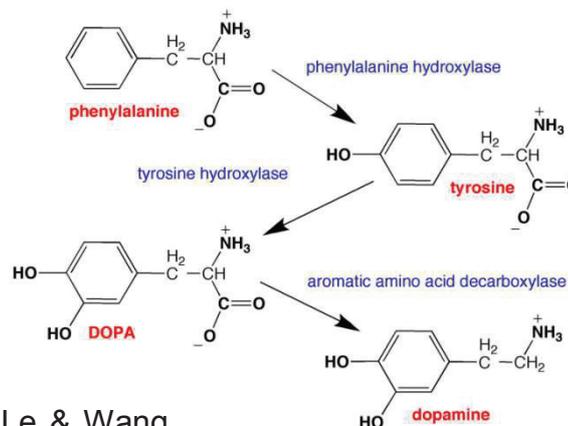
La partie dorsale du système dopaminergique mésencéphalique est constituée d'une part des neurones de l'ATV et de la SN, et d'autre part du noyau neuronal A8. Ce noyau projette dans le striatum ventral et dorsal, le système limbique et le cortex. Les neurones et fibres constituant le système dopaminergique divergent sur le plan morphologique et fonctionnel, en une organisation complexe présentant différents

marqueurs fonctionnels et patterns de projection (Björklund & Dunnett, 2007), comme par exemple les boucles corticostriatales, et celles reliant la SNpr aux zones sous-corticales chez le primate (Kitano, Tanibuchi & Jinnai, 1998; Borra *et al.*, 2013).

- Synthèse et libération de dopamine

La dopamine est synthétisée, à partir de la L-tyrosine, acide aminé précurseur. Transformé par réaction enzymatique par la TH en L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), ce composé est transformé en dopamine par l'enzyme DOPA décarboxylase cytoplasmique. Ensuite, la dopamine est transportée, notamment par le DAT, principal transporteur de la dopamine, dans des vésicules pour y être stockée au niveau des synapses.

Le processus de synthèse de la dopamine, régulé par la TH, enzyme limitante de cette synthèse (Daubner, Le & Wang, 2011) est représenté dans la figure suivante :



D'après Daubner, Le & Wang,

La libération synaptique de la dopamine s'effectue par exocytose, déclenchée au niveau de la terminaison neuronale par une dépolarisation membranaire, induisant l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. Les vésicules fusionnent à la membrane pré-synaptique et libèrent la dopamine (Edwards, 2007). Le DAT est exprimé modérément dans la partie dorsale de la SN, et fortement par les neurones dopaminergiques de la partie ventrale, dont les dendrites projettent sur la SNpr et innervent exclusivement le striatum. La dopamine libérée va agir sur des récepteurs dopaminergiques généralement classés en deux groupes incluant cinq sous-types de

récepteurs. Le groupe de récepteurs D1 regroupe les récepteurs D1 et D5 et le groupe de récepteurs D2 regroupe les récepteurs D2, D3 et D4 (Vallone, Picetti & Borrelli, 2000). Ces récepteurs ont différentes propriétés dépendantes de leur localisation dans le SNC, de leur micro-environnement, de leurs interactions avec certains composés ainsi que de leur régulation qui peuvent changer d'un type à l'autre (Beaulieu & Gainetdinov, 2011).

### c. Principales fonctions des systèmes dopaminergiques mésencéphaliques

De nombreuses études montrent un rôle important de la dopamine dans le contrôle de multiples fonctions neurophysiologiques, comportementales et intégratives (e.g., intégration des fonctions sensorielles, motivationnelles et motrices) (Ena, de Kerchove d'Exaerde & Schiffmann, 2011; Salamone & Correa, 2012; Baldo *et al.*, 2013). Parmi ces fonctions de régulation, celle consistant à contrôler la commande motrice volontaire est la plus fortement touchée dans la MP. Ce contrôle se fait par l'intermédiaire de boucles faisant intervenir la voie nigrostriée et certaines aires motrices et prémotrices corticales. Dans ce processus, la SN a pour fonction d'évaluer les actions dans l'environnement et de transmettre l'information aux aires prémotrices afin de faciliter ou d'inhiber l'initiation de la commande motrice volontaire (Lindenbach & Bishop, 2013).

Le système dopaminergique est la cible principale de la MP. En effet, des analyses effectuées sur les cerveaux de patients atteints de la MP montrent des taux de dopamine très diminués dans la SN, ainsi que dans le striatum (Obeso *et al.*, 2008). Cette diminution s'accompagne de la perte des neurones dopaminergiques de la SN et de troubles du contrôle moteur (Plowman & Kleim, 2011). Un traitement à la L-DOPA, qui augmente le niveau en dopamine, améliore les troubles des patients parkinsoniens, montrant un lien direct entre la destruction des structures dopaminergiques et les déficits moteurs (Tolosa *et al.*, 1998).

## En résumé :

- Les corps des **neurones dopaminergiques mésencéphaliques**, répartis en 3 groupes, A8, A9 (SN) et A10 (ATV), sont regroupés au sein de la SN dans la **SN pars compacta (SNpc)**, tandis que la **SN pars reticulata (SNpr)** regroupe les fibres dopaminergiques.
- La SN projette vers le **striatum** principalement pour former la « **voie nigrostriée** », responsable du **contrôle de la motricité volontaire**.
- La **dopamine**, stockée au niveau des **synapses** avant d'être libérée par exocytose, est synthétisée à partir de la L-tyrosine, transformé par la **TH** en **L-DOPA**, composé transformé en dopamine par l'enzyme DOPA décarboxylase cytoplasmique.
- La dopamine libérée va agir sur les récepteurs dopaminergiques, de **5 sous-types** différents (D1 à D5).
- La dopamine joue un rôle important dans le **contrôle** de la commande motrice volontaire, **fortement touché dans la MP**. La SN sert de **relais** entre l'environnement et les aires corticales prémotrices, afin de faciliter ou d'inhiber l'initiation de la commande motrice volontaire.
- Des analyses montrent des taux de **dopamine très diminués** dans la SN et le striatum de patients parkinsoniens, la **perte des neurones dopaminergiques** de la SN et des **troubles du contrôle moteur**.
- Un traitement à la **L-DOPA**, qui **augmente le niveau** en dopamine, **améliore** les troubles des patients parkinsoniens.

## II.5. Modèles animaux de la maladie de Parkinson

De par les différences d'espèces, les modèles animaux de la MP ne peuvent refléter de manière fidèle la pathologie humaine. Toutefois, ils permettent de répertorier et d'étudier *in vivo*, dans des conditions contrôlées, un certain nombre de processus physiopathologiques fondamentaux qui sont possiblement mis en œuvre dans la MP. Idéalement, un modèle animal de la MP devrait être en mesure de :

- mimer les troubles moteurs, leur développement sur un mode chronique et leur sensibilité au traitement à la L-DOPA.

- provoquer une perte cellulaire dans les structures impliquées dans la MP, principalement une perte de neurones dopaminergiques dans la SNpc.
- présenter des caractéristiques neuropathologiques similaires à celles de la MP notamment en ce qui concerne la présence de corps de Lewy et d'agrégats d' $\alpha$ -synucléine.

À ce jour, aucun modèle ne parvient à répondre à tous ces critères, malgré la grande diversité des protocoles employés et des espèces animales utilisées, depuis les primates non humains jusqu'à la drosophile en passant par les rongeurs. Outre les problèmes d'espèces, cette relative imperfection est liée pour partie à notre méconnaissance de l'étiologie de la MP et à l'incapacité de reproduire le décours progressif de la pathologie humaine sur plusieurs décades.

Dans ce chapitre, nous aborderons d'abord les modèles animaux obtenus par transgénèse, puis les modèles induits par des pesticides et enfin les modèles toxiques, les plus fréquemment utilisés de nos jours.

#### a. Modèles génétiques

- Modèles d'altération de la protéine  $\alpha$ -synucléine

Chez les patients parkinsoniens, les analyses biochimiques ont montré que les corps de Lewy s'accumulant dans les neurones dégénérés résultaient essentiellement de l'agrégation de molécules d' $\alpha$ -synucléine mal conformées, (Kazantsev & Kolchinsky, 2008). De plus, il a été montré que de tels agrégats sont toxiques pour les neurones dopaminergiques *in vitro* (Kalia *et al.*, 2013a) et *in vivo* (Winner *et al.*, 2011). D'autre part, plusieurs mutations du gène de l' $\alpha$ -synucléine ont été observées dans les formes familiales de la pathologie.

Les modèles d'animaux génétiquement modifiés consistent en la surexpression de formes sauvages ou mutées de l' $\alpha$ -synucléine chez la souris ou chez la drosophile (Giasson *et al.*, 2002; Fleming *et al.*, 2006; Alvarez-Fischer *et al.*, 2008; Daher *et al.*, 2009; Watson *et al.*, 2012; Siddique *et al.*, 2013).

Plus particulièrement, Giasson et collaborateurs ont les premiers produit des souris génétiquement modifiées exprimant une  $\alpha$ -synucléine mutée (mutation A53T). Ces souris présentent un défaut de redressement de la posture, une diminution de

l'activité motrice allant jusqu'à une paralysie totale des membres et à la mort. On observe également, des dépôts filamenteux d' $\alpha$ -synucléine dans le cerveau, toutefois sans agrégats types corps de Lewy tels qu'observés dans la SN de patients Parkinsoniens (Giasson *et al.*, 2002). Récemment, l'introduction de la mutation A53T d' $\alpha$ -synucléine a conduit chez la souris à un phénotype caractérisé par une activité locomotrice réduite. Dans la même étude une expression accrue du transporteur de la dopamine (DAT) à la membrane des neurones, est associée à une augmentation de la fonction de recapture de la dopamine dans le striatum, ainsi qu' à un nombre moins important de neurones dopaminergiques dans la SN, et à des troubles physiopathologiques associés (Oaks *et al.*, 2013). Ces résultats soulignent l'implication de l' $\alpha$ -synucléine dans des dysfonctionnements dopaminergiques, de la voie nigrostriée.

D'une façon générale, on considère que ces modèles basés sur l'expression d'une  $\alpha$ -synucléine mutée sont proches de la neuropathologie observée dans un contexte large de synucléopathies humaines et qui dépasse la cadre strict de la MP.

Outre ces modèles murins, quelques modèles de MP ont été développés chez la drosophile *via* l'expression forcée d'une forme mutée de l' $\alpha$ -synucléine, alors que la forme sauvage est non-exprimée chez ces insectes (Scherzer *et al.*, 2003; Waxman & Giasson, 2009; Siddique *et al.*, 2013). Ces modèles de drosophiles transgéniques montrent une perte dopaminergique dans la SN, des inclusions intracytoplasmiques d' $\alpha$ -synucléine et des troubles du contrôle moteur (Bilen & Bonini, 2005; Du *et al.*, 2010). Quelques modèles basés sur la mutation du gène de l' $\alpha$ -synucléine chez le *C. elegans* existent également et montrent des déficits moteurs ainsi qu'une perte de neurones dopaminergiques (Kuwahara *et al.*, 2012; Li & Le, 2013). Ces modèles non murins, bien qu'imparfaits, sont simples à utiliser, peu coûteux et permettent d'explorer le rôle physiopathologique d'un grand nombre de gènes conservés durant l'évolution.

#### - Modèles d'altération du couple Pink1/Parkin

Un nombre croissant d'études s'intéresse aux modèles animaux des formes familiales de la pathologie. Parmi les gènes mutés impliqués dans ces formes familiales, les gènes à transmission autosomique récessive *PINK1* (*PARK6*) et

*Parkin* (*PARK2*) ont mis en lumière le rôle des dysfonctionnements mitochondriaux dans la physiopathologie de la MP. La mitochondrie est sujette à de nombreux mécanismes de fusion et de scission, faisant intervenir diverses protéines, dont *Parkin* et *PINK1*, qui jouent un rôle majeur dans la régulation physiologique et fonctionnelle des mitochondries. En particulier, la *Parkin*, molécule du complexe "ubiquitine-ligase" composant le protéasome, participe à la dégradation des mitochondries non fonctionnelles par un mécanisme de mitophagie (Narendra, Tanaka, Suen, & Youle, 2008 ; Yang & Yang, 2013). Cette dégradation des mitochondries lésées est régulée par l'expression mitochondriale de *PINK1*, une protéine sérine/thréonine kinase, menant au recrutement de la *Parkin* au niveau des mitochondries, et entraînant des mécanismes de mitophagie (Narendra et al., 2010). Une étude récente a aussi montré que le couple *Parkin/PINK1* était impliqué dans le maintien de l'intégrité mitochondriale (Youle & Narendra, 2011). Dans cette voie, *PINK1* agit comme un "drapeau" qui s'accumule sur les mitochondries dysfonctionnelles et recrute la *Parkin* qui marque ces mitochondries pour qu'elles soient détruites par les lysosomes. Les auteurs avancent que, puisque l'altération du couple *PINK1/Parkin* inactive cette voie, les patients présentant ces mutations peuvent ne plus être en mesure d'éliminer les mitochondries altérées, menant à des dommages neuronaux. En faveur de cette hypothèse, les souris *PINK1* KO présentent des troubles locomoteurs et des anomalies du système dopaminergique (Glasl et al., 2012), ainsi qu'une susceptibilité accrue au MPTP (Haque et al., 2012). Par ailleurs, les cultures de neurones dopaminergiques de souris *PINK1* KO présentent la particularité d'engager un programme apoptotique en réponse à la dopamine (Gandhi et al., 2012). De la même façon, chez la drosophile, l'invalidation de *PINK1* induit une dégénérescence des neurones dopaminergiques et des anomalies motrices accompagnant un dysfonctionnement mitochondrial (Sang et al., 2007; Guo, 2012; Humphrey et al., 2012; Zhang et al., 2013).

En conclusion, les modèles animaux d'altération génétique du couple *PINK1/Parkin* sont intéressants pour la compréhension des mécanismes associant dysfonctions mitochondriales, stress oxydatif et mort neuronale dans le contexte des formes familiales de MP (Harvey, Wang, & Hoffer, 2008 ; Matsuda, Kitagishi, & Kobayashi, 2013).

## b. Modèles induits par des pesticides

Des causes environnementales pourraient être pour partie à l'origine de la MP. Parmi les facteurs incriminés, les études épidémiologiques ont montré que l'exposition à des pesticides, comme par exemple le paraquat et la roténone, pouvait provoquer l'apparition de la pathologie (Moisan *et al.*, 2011; Kamel, 2013; Pezzoli & Cereda, 2013). En effet, les mitochondries des neurones dopaminergiques sont sensibles à la toxicité du paraquat, qui réagit avec l'oxygène moléculaire pour former des dérivés réactifs de l'oxygène et interagit avec le système de transport d'électrons des mitochondries (Ossowska *et al.*, 2006; Ren, Zhao & Sun, 2009). D'autre part, la roténone est un insecticide d'origine naturelle dont les propriétés neurotoxiques dues à son activité inhibitrice sur le complexe I de la chaîne respiratoire des mitochondries, entraînent une augmentation du stress oxydatif (Sherer *et al.*, 2007). Ce composé a été largement utilisé dans le monde agricole jusqu'à son interdiction en 2007.

Il existe plusieurs modèles animaux basés sur une intoxication par les pesticides chez les rongeurs, la drosophile ou le *C. elegans*, traités de manière aigue ou chronique (Sherer *et al.*, 2003; Mocko *et al.*, 2010; St Laurent, O'Brien & Ahmad, 2013; Weetman *et al.*, 2013). On observe dans ces modèles une neurodégénérescence dopaminergique, provoquée par une action sur l'activité respiratoire des mitochondries, ainsi que des anomalies motrices en partie similaires aux troubles du comportement moteur observés au cours de la MP. Dans un modèle d'intoxication chez le rat, ont été observées des inclusions intracytoplasmiques, riches  $\alpha$ -synucléine et en ubiquitine, ainsi que des troubles du comportement moteur (Alam & Schmidt, 2002). Cependant, les résultats obtenus dans ces diverses études sont très différents selon le protocole d'intoxication et l'espèce animale choisie. En conclusion, les résultats obtenus dans ces différents modèles toxiques, sont intéressants mais restent difficiles à interpréter et synthétiser, du fait de la grande disparité des protocoles. Par ailleurs, les risques d'exposition aux pesticides utilisés dans ces modèles sont un frein indéniable pour l'expérimentateur.

### c. Modèles induits par des neurotoxines

#### - Modèle MPTP

Le MPTP est une neurotoxine découverte accidentellement après que des jeunes toxicomanes ont développé un syndrome parkinsonien suite à l'utilisation d'héroïne de synthèse (Langston & Ballard, 1983). De par son action toxique sur les voies catécholaminergiques, et notamment les voies dopaminergiques, il provoque des symptômes semblables à ceux de la MP. Ce composé franchit la barrière hématoencéphalique, puis est métabolisé par la monoamine oxydase B (MA-B) en ion 1-méthyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>), composé actif, via la molécule 1-méthyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridium (MPDP). Il est ensuite transporté par le DAT dans les neurones dopaminergiques de la SNpc où il bloque l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire des mitochondries (Blandini & Armentero, 2012; Przedborski & Vila, 2003). Ainsi, une inactivation pharmacologique des transporteurs à catécholamines induit une résistance aux effets neurotoxiques provoqués par le MPTP (Bezard *et al.*, 1999). Le MPTP est actuellement la molécule la plus utilisée pour mimer la MP chez l'animal, essentiellement chez la souris, le primate non-humain, le *C. elegans* et même le poisson medaka mais très peu chez le rat, du fait d'une résistance naturelle dont la cause reste à ce jour inconnue (Braungart *et al.*, 2004; Matsui, Gavinio & Takahashi, 2012; Schumm *et al.*, 2012; Kavitha *et al.*, 2013; Kortekaas *et al.*, 2013). Le modèle MPTP permet d'obtenir, sous certaines conditions, des agrégats intracytoplasmiques d' $\alpha$ -synucléine, formant des inclusions de type corps de Lewy. Ces expérimentations n'ont cependant pas été reproduites par tous les auteurs (Kowall *et al.*, 2000; Fornai *et al.*, 2005; Shimoji *et al.*, 2005). Selon les espèces, le modèle MPTP reproduit plus ou moins un certain nombre de caractéristiques de la MP. Il est particulièrement intéressant lorsqu'il est développé chez le primate non-humain, car il y présente une bonne reproductibilité et est relativement proche de la pathologie humaine tant en terme de neurodégénérescence que de troubles du comportement moteur. Chez la souris, le modèle a été utilisé dans de nombreuses études pour étudier le rôle du système immunitaire et notamment celui des LyT dans la physiopathologie de la MP. Toutefois, du fait de sa toxicité importante, le MPTP est une molécule dangereuse à manipuler (d'après la procédure issue de "Research-Specific Standard Operating

Procedure" (SOP) de l'Université de Washington, Environmental Health and Safety), ce qui rend ce modèle difficile à mettre en œuvre.

- Modèle 6-OHDA

La 6-OHDA, analogue hydroxylé naturel de la dopamine (Blum *et al.*, 2001), est un composé neurotoxique pour les neurones dopaminergiques. La 6-OHDA est injectée classiquement dans le parenchyme cérébral (au niveau du striatum ou de la substance noire) car cette substance ne traverse pas la BHE. Cette toxine est utilisée pour modéliser la MP chez plusieurs espèces d'animaux (Roeling *et al.*, 1995), principalement le rat, le primate non-humain, et plus rarement la souris. A noter de façon intéressante que cette molécule a été retrouvée augmentée dans l'urine de patients atteints de MP (Andrew *et al.*, 1993). La 6-OHDA exerce son effet neurotoxique en 3 étapes : i) fixation aux transporteurs des catécholamines présents au niveau des terminaisons synaptiques intrastriales des neurones dopaminergiques de la substance noire, ii) transport rétrograde jusqu'aux corps cellulaires neuronaux, iii) induction d'un processus d'apoptose lié à un dysfonctionnement mitochondrial (Sachs & Jonsson, 1975; Glinka & Youdim, 1995; Jeon, Jackson-Lewis & Burke, 1995). Plus spécifiquement, la 6-OHDA induirait parallèlement une élévation du stress oxydatif via la production de peroxyde d'hydrogène et de composés hydroxyles (Sachs & Jonsson, 1975), ainsi qu'une inactivation du complexe I de la chaîne respiratoire des mitochondries, ce qui aboutit également à la libération de radicaux libres oxygénés.

Dans le modèle 6-OHDA, l'administration intrastriale d'un analogue toxique de la dopamine induit une dégénérescence sélective des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée. A ce jour, il n'a pas été montré de lésions dans les différentes structures cérébrales normalement touchées dans la pathologie humaine (Betarbet, Sherer & Greenamyre, 2002). D'autre part, on ne relève pas la présence d'inclusions intracytoplasmiques d' $\alpha$ -synucléine. Cependant la 6-OHDA peut mimer chez le rat certains troubles non moteurs observés dans la MP, notamment des troubles comportementaux et cognitifs (Tadaiesky *et al.*, 2008).

Le modèle 6-OHDA que nous avons développé chez la souris nous a permis d'aborder dans un système contrôlé les mécanismes immunitaires impliqués dans la neurodégénérescence des neurones dopaminergiques.

**En résumé :**

- Afin d'étudier la MP, des **modèles animaux** de la maladie sont mis en place, **reflétant de manière imparfaite la réalité**.
- Ils permettent cependant **d'étudier *in vivo***, dans des conditions contrôlées, un certain nombre de **processus physiopathologiques** fondamentaux qui sont possiblement mis en œuvre dans la MP.
- Un modèle animal de la MP devrait être en mesure de : **mimer les troubles moteurs**, leur **développement chronique** et leur **sensibilité aux traitements**, provoquer une **perte neuronale** surtout les neurones **dopaminergiques de la SNpc**, des caractéristiques neuropathologiques similaires à celles de la MP notamment la **présence de corps de Lewy et d'agrégats d' $\alpha$ -synucléine**.
- On peut citer les modèles basés sur **l'altération de gènes** tels que **SNCA** et le couple **PINK1/parkin**.
- Certains **pesticides** sont également utilisés comme modèles de la MP pour leurs propriétés neurotoxiques : la roténone et le paraquat.
- Certaines **neurotoxines** sont également utilisées comme modèles de la MP, principalement le **MPTP**, en systémique, et la **6-OHDA**, en intracérébral.



## OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE

Ces dernières années, les recherches se sont orientées vers le rôle exercé par l'immunité adaptative, et plus spécifiquement, les LyT, en situation pathologique, notamment en ce qui concerne les mécanismes d'inflammation, et plus spécialement au cas particulier de la neuro-inflammation, ayant un rôle particulièrement important dans les maladies neurodégénératives. On voit clairement émerger des différents travaux sur le sujet l'importance de telles cellules sur la surveillance immunitaire en conditions physiologiques à la périphérie, mais aussi leur rôle majeur en condition pathologique dans les processus de mort neuronale au sein du SNC. Dans le cadre de la MP, la ou les causes de la neurodégénérescence ne sont pas clairement établies, et les recherches actuelles tentent de comprendre les raisons pour lesquelles les neurones dopaminergiques au sein de la SN démontrent une telle susceptibilité face à la mort. Il est aujourd'hui connu que la réaction microgliale est la principale caractéristique de la réaction inflammatoire ayant lieu au cours de ce processus de neurodégénérescence. Or, l'infiltration de LyT au sein du parenchyme cérébral dans un contexte de neuro-inflammation en lien avec une MP, est aujourd'hui de plus en plus admise. À l'instar de la microglie, les phénomènes cellulaires et moléculaires relatifs aux LyT notamment la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires et/ou anti-inflammatoires et ses interactions physiques et/ou chimiques avec les autres acteurs cellulaires impliqués dans ces processus de neuro-inflammation et de mort neuronale, font l'objet de nombreuses études. Ces études tendent à montrer que les différentes sous-populations lymphocytaires pourraient jouer de multiples rôles, en fonction de leur environnement cellulaire et moléculaire et des différentes cinétiques de ces nombreux facteurs. De par la grande variabilité et instabilité des phénotypes des LyT, la complexité des processus peut mener à la polarisation de la microglie vers un programme d'activation pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire. Ceci peut de ce fait refléter un mécanisme spécifique à chaque point des multiples cinétiques cellulaires/moléculaires dans une pathologie, et par extension à leurs modèles respectifs, et ne pas résulter d'un mécanisme général.

Il existe peu d'études décrivant les rôles conjoints de la microglie et des LyT dans le contexte de la neuro-inflammation. De plus, de par l'apparente disparité de certains résultats obtenus dans ces deux champs d'investigation, ces rôles complexes et multiples ne sont pas encore inscrits dans le cadre d'une théorie unificatrice des mécanismes de neuro-inflammation. L'influence directe de l'infiltration lymphocytaire sur les neurones reste à explorer.

**Le but principal de ce travail de thèse a été d'étudier le rôle de l'infiltrat lymphocytaire sur l'activation microgliale dans un contexte de neurodégénérescence spécifique du système nigrostrié chez la souris.**

Les **hypothèses** de ce travail de thèse étaient que dans le modèle murin 6-OHDA :  
Un infiltrat de LyT pouvait être observé, de caractéristiques semblables à ce qui pouvait être observé chez le patient parkinsonien.

Cette présence de LyT jouerait un rôle important dans les processus d'activation des cellules microgliales.

L'activité des LyT modulerait l'activation microgliale et réduirait ainsi la mort des neurones dopaminergiques.

Cette activation microgliale ne serait pas modulée par d'autres types de cellules immunes.

De ces hypothèses générales ont découlé plusieurs objectifs de recherche.

Le **premier objectif** visait à valider et analyser la présence de LyT dans le parenchyme cérébral de patients parkinsoniens, au niveau de la substance noire, à tous les stades de la phase symptomatique de la maladie. Pour ce faire, nous avons, sur des tissus autopsiques de patients parkinsoniens, mené une étude en immunohistochimie par la technique DAB, dans la substance noire, afin de cibler les LyT CD3<sup>+</sup>.

Le **deuxième objectif** consistait à mener en parallèle la même étude dans le modèle murin 6-OHDA, en immunofluorescence, afin de cibler les LyT CD4<sup>+</sup> et les LyT CD8<sup>+</sup>.

Ensuite, **notre objectif** visait à étudier en parallèle dans le modèle murin 6-OHDA chez des souris immunodéficientes : l'activation microgliale, la perte de neurones dopaminergiques et les altérations comportementales en relation avec un dysfonctionnement de la boucle nigrostriée. A cet effet, nous avons induit le modèle chez les souris *Foxn1*<sup>-/-</sup> et les souris génétiquement modifiées *CD3* « Knock-Out », déficientes en LyT

Le **quatrième objectif** de ce travail de thèse a été d'étudier les mêmes paramètres d'activation microgliale, de perte de neurones dopaminergiques et d'altérations comportementales chez des souris présentant une immunodéficiences combinée. Pour ce faire, nous avons induit le modèle chez des souris génétiquement modifiées *Rag1*, déficientes en LyT et B, et des souris « Knock-out » NOD SCID, déficientes en LyT, B et en Natural Killers.

Ce travail de thèse avait donc pour buts d'utiliser le modèle 6-OHDA pour : **i) déterminer *in vivo* le rôle potentiel des LyT dans les mécanismes de neurodégénérescence induits par la 6-OHDA, ii) Mettre en évidence un dialogue entre les LyT et la microglie dans les mécanismes de neuro-inflammation, iii) Montrer que les processus de neuro-inflammation en lien avec les mécanismes de neurodégénérescence impliquent non seulement des mécanismes immunitaires innés mais aussi issus de l'immunité adaptative.** Ces objectifs s'inscrivaient dans un projet global visant à mieux caractériser la neuro-inflammation au cours de la MP dans le but de mettre au point de nouvelles thérapies immunomodulatrices.



## **PARTIE II**



## I.1. Introduction de l'article 1

### *Mapping and kinetics of microglia/neuron cell-to-cell contacts in the 6-OHDA murine model of Parkinson's disease.*

Publié dans *Glia*, octobre 2013

#### ÉTAT DE LA QUESTION

La MP est caractérisée par une neurodégénérescence du réseau dopaminergique nigro-strié et par la présence de corps de Lewy dans le cytoplasme des neurones dopaminergiques de la substance noire. D'autre part, il apparait clairement que la neuro-inflammation est fortement impliquée dans cette pathologie. De nombreuses études montrent que la mort neuronale serait dépendante de phénomènes environnementaux, impliqués dans l'initiation et/ou la progression de la mort neuronale, entre autre par le biais des cellules gliales environnantes, comme la microglie (Orr *et al.*, 2005; Whitton, 2007), bien que des données suggèrent également une implication de l'immunité adaptative, notamment des LyT, dans les mécanismes de mort neuronale (McGeer *et al.*, 1988a; Brochard *et al.*, 2009). Dans les modèles murins de la MP utilisant la molécule neurotoxique MPTP, un rôle délétère de la microglie a été démontré par plusieurs équipes (Cardona *et al.*, 2006; Sriram *et al.*, 2006), et il apparait que, dans ce modèle, les LyT joueraient un rôle similaire (Brochard *et al.*, 2009). En revanche, très peu de travaux ont été effectués dans le modèle murin 6-OHDA. Dans l'optique d'étudier les différents mécanismes impliqués dans la neurodégénérescence, les présents travaux se sont attachés à étudier le versant inné de la réaction neuro-inflammatoire, que représente la microglie activée, ainsi que les interactions entre les neurones dopaminergiques et la

microglie dans le contexte de mort neuronale induit par la 6-OHDA. Dans ce but, un modèle 6-OHDA de neurodégénérescence chez la souris a été mis en place au sein du laboratoire, ayant permis de : i) décrire une cinétique de l'activation microgliale, ii) étudier son rôle dans le processus de mort neuronale, iii) caractériser les contacts physiques entre les neurones de la substance noire lésée et la microglie.

## I.2. Introduction de l'article 2

**T-cell deficient mice are highly susceptible to 6-OHDA-induced dopaminergic neurodegeneration.**

**A soumettre dans Journal of Clinical Investigation, mai 2014**

### ÉTAT DE LA QUESTION

Il est aujourd'hui admis que les processus neuro-inflammatoires qui caractérisent classiquement la MP s'accompagnent d'une infiltration de LyT (McGeer *et al.*, 1988a), que l'on retrouve dans le modèle murin MPTP (Brochard *et al.*, 2009). Le rôle de cet infiltrat lymphocytaire est aujourd'hui encore mal décrit. Il a été montré dans le modèle MPTP, que ces cellules interagissent de manière directe avec les neurones dopaminergiques afin d'induire leur mort. En outre, il a été montré dans la même étude que l'absence de LyT chez des souris immunodéficientes apportait une relative protection aux souris contre la toxicité du MPTP, conduisant à une diminution de perte de neurones dopaminergiques (Brochard *et al.*, 2009). Il a été conclu que les LyT CD4<sup>+</sup> jouaient un rôle délétère dans la mort des neurones dopaminergiques dans la MP. Depuis, plusieurs études sont venues nuancer ces résultats (Liu *et al.*, 2009; Reynolds *et al.*, 2009b; Gendelman & Appel, 2011; Ha *et al.*, 2012). La problématique semble donc plus complexe et relever de mécanismes moléculaires encore inconnus à ce jour. De plus, ces travaux ont été effectués dans le modèle MPTP souris de la pathologie, alors que peu d'études sont menées dans le modèle murin 6-OHDA. L'un des objectifs de ce travail était donc d'étudier l'infiltrat lymphocytaire et son impact dans le contexte de mort neuronale induit par la 6-OHDA. Pour se faire, nous avons utilisé le modèle 6-OHDA de

neurodégénérescence mis en place au laboratoire chez la souris nous permettant d'utiliser plusieurs lignées de souris immunodéficientes pour : i) décrire une cinétique de l'infiltrat lymphocytaire, ii) étudier son rôle dans le processus de mort neuronale, iii) étudier les interactions entre les LyT et les autres populations cellulaires impliquées dans le processus de mort neuronale.

## RÉSULTATS

Ce travail fournit plusieurs données décrivant la cinétique d'infiltration ainsi que le rôle majeur des LyT dans la mort neuronale dopaminergique induit par la 6-OHDA. Cette étude donne quelques résultats permettant d'en savoir d'avantage sur l'implication de ces cellules dans les processus de neurodégénérescence. En particulier, nos résultats ont montré :

- Un infiltrat lymphocytaire au sein de la SN de patients parkinsoniens, de faible intensité, région spécifique, et ne dépendant pas du stade évolutif de la maladie.
- Un infiltrat lymphocytaire au sein de la SN de souris traitées à la 6-OHDA, précoce, d'intensité similaire à ce qui a pu être observé chez les patients, connaissant un pic quelques jours après l'induction du modèle et région-spécifique au sein du parenchyme.
- L'absence de contact direct entre les lyT et les neurones dopaminergiques chez les patients parkinsoniens ou les souris 6-OHDA.
- Une augmentation significative de la sensibilité à la toxine 6-OHDA chez les souris immunodéficientes, non-impactée par une immunodéficiance combinée.
- Une activation dans le thalamus des souris 6-OHDA, substantiellement augmentée chez les animaux immunodéficients.
- Des troubles moteurs spontanés chez une souche de souris déficiente en LyT.

La présence de LyT chez les souris injectée avec la 6-OHDA observée précocement dans ce travail, mise en lien avec la cinétique d'activation microgliale et de perte

neuronale décrite lors d'une précédente étude menée par notre équipe (Virgone-Carlotta *et al.*, 2013), permet de supposer que les LyT ont un rôle important à jouer dans la mise en place des processus d'activation microgliale, elle-même impliquée dans les mécanismes délétères de mort neuronale. Ces résultats sont appuyés par le fait qu'une immunodéficiência combinée n'augmente pas d'avantage la sensibilité des animaux à la toxine, par rapport à des animaux uniquement déficients en LyT. En ce sens, ces résultats sont en accord avec les publications antérieures montrant l'importance des LyT dans les mécanismes de mort neuronale (Brochard *et al.*, 2009), même si, *a contrario* des résultats de ces travaux, cette influence ne semble pas s'exercer de manière directe sur les neurones, mais plutôt par l'intermédiaire des cellules microgliales, comme le suggèrent les différentes cinétiques et le fait qu'aucun LyT n'ait été observé à proximité directe des neurones dopaminergiques, que ce soit dans les tissus autopsiques humains, ou bien dans notre modèle. Ce rôle des LyT semble transitoire dans notre modèle, comme le suggère la diminution de densité observée 7 jours après lésion, et ainsi induire l'activation microgliale.

L'augmentation de sensibilité à la toxine 6-OHDA observée chez les souris immunodéficientes sont en contradiction avec les données obtenues dans le modèle MPTP (Brochard *et al.*, 2009). La similarité des souches utilisées dans ces deux études (et spécifiquement les souris Knock-Out *Rag1*) permet d'avancer un rôle différent des LyT dans notre modèle. Il a été montré que des LyTeffs pouvaient avoir des fonctions régulatrices sous certaines conditions dans un contexte de neurodégénérescence (Kipnis *et al.*, 2004). Il est possible également que les sous-populations régulatrices de LyT jouent un rôle plus important dans notre modèle. Il est à noter que l'injection en i.p. de 6-OHDA entraîne une augmentation du nombre de LyTregs circulants par destruction de l'innervation du système sympathique à la périphérie (Bhowmick *et al.*, 2009). Cependant, il n'existe aucune donnée sur l'impact d'une injection intrastriatale de 6-OHDA sur les sous-populations lymphocytaires dans l'organisme. Cependant, de nombreuses données issues du modèle MPTP tendent à montrer que les Tregs pourraient jouer un rôle dans la modulation des processus de neurodégénérescence (Reynolds *et al.*, 2007, 2010; Liu *et al.*, 2009; Gendelman & Appel, 2011; Chung *et al.*, 2012). On peut donc émettre l'hypothèse que les différences de résultats observées entre les deux modèles proviennent d'une implication distincte des sous-populations lymphocytaires

impliquées dans ces mécanismes de mort neuronale. En d'autres termes, il semblerait que les Tregs aient un rôle prépondérant à jouer dans la modulation de l'activation microgliale impliquée dans la mort des neurones dopaminergiques. Ces résultats sont en adéquation avec les données obtenues chez les personnes âgées, en condition physiologique, chez qui une augmentation du nombre de Tregs a été observée (Rosenkranz *et al.*, 2007), tandis que les patients parkinsoniens voient leur nombre de Tregs significativement réduits (Saunders *et al.*, 2012). De même, l'observation d'une activation microgliale au sein du thalamus, structure fonctionnellement reliée à la substance noire, plus importante chez les souris immunodéficientes, fait écho à des données obtenues chez les patients parkinsoniens, et impliquant le thalamus dans la pathologie (Parent & Hazrati, 1995; Halliday, 2009; Pedrosa *et al.*, 2012; Bosch-Bouju, Hyland & Parr-Brownlie, 2013; Pötter-Nerger & Volkman, 2013).

## CONCLUSION

La cinétique d'infiltration lymphocytaire dans les processus de neurodégénérescence, avec un pic précédant celui de l'activation microgliale, suggère des mécanismes précoces de contrôle de l'activation microgliale par les LyT. De plus, ce travail de thèse apporte des données innovantes concernant le rôle de ces cellules sur le contrôle de la microglie. Nous pouvons faire l'hypothèse que dans notre modèle, ce contrôle est protecteur dans les processus de mort des neurones dopaminergiques *via* la modulation de l'activation microgliale, et implique certaines sous-populations lymphocytaires, dont l'instabilité phénotypique pourrait expliquer les différences de résultats observées dans la littérature. Les résultats concernant les mécanismes moléculaires par lesquels le recrutement et la différenciation des sous-populations lymphocytaires s'effectuent, ainsi que ceux impliqués dans la modulation de l'activation microgliale nécessitent d'être approfondis.

## **II.1. ARTICLE 1**



***Mapping and kinetics of microglia/neuron cell-to-cell contacts in the 6-OHDA murine model of Parkinson's disease***

Angélique Virgone-Carlotta<sup>1</sup>, Denis Ressnikoff<sup>2</sup>, Josselin Uhlrich<sup>1</sup>, Numan Akram<sup>1</sup>, Fabrice Chrétien<sup>3</sup>, Chantal Domenget<sup>4</sup>, Romain Gherardi<sup>3</sup>, Geneviève Despars<sup>4</sup>, Pierre Jurdic<sup>4</sup>, Serge Nataf<sup>1\*</sup> and Monique Touret<sup>1\*</sup>

**1** Inserm - U 1028 (Equipe Honnorat), Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, Faculté de Médecine RTH LAENNEC – 7 rue Guillaume Paradin, 69372 LYON CEDEX 08

**2** Centre Commun de Quantimétrie - Université Claude Bernard - Lyon 1 - Faculté de Médecine - 8 avenue Rockefeller - 69373 LYON Cedex 08

**3** IMRB - Inserm U955, Equipe n°10 "Interactions cellulaires dans le système neuromusculaire", Faculté de Médecine de Créteil - Université Paris 12, 8 rue du général Sarrail, 94011 Créteil

**4** Institut de Génomique Fonctionnelle, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 Allée d'Italie, 69364 Lyon

\*: SN and MT equally contributed to this work

*Corresponding author:* Serge Nataf, Inserm - U 1028 (Equipe Honnorat), Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, Faculté de Médecine RTH LAENNEC – rue Guillaume Paradin, 69372 LYON CEDEX 08. E-Mail : [serge.nataf@inserm.fr](mailto:serge.nataf@inserm.fr)

**Keywords:** Neurodegeneration, Inflammation, 6-OHDA, Microglia, Substantia Nigra, DAP12, Parkinson's disease

## Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder that predominantly affects the dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta (SNpc). With an incidence reaching approximately 1/250 in people over 65 years, PD represents a major challenge for health care systems in western countries (Wirdefeldt *et al.*, 2011). Indeed, although symptomatic treatments allow dopamine deficiency to be compensated for a time, there is yet no cure for PD and mechanisms supporting dopaminergic neurodegeneration are poorly understood. Increasing evidence indicates that PD is not a purely neuronal, cell-autonomous disorder (Hirsch *et al.*, 1998). In particular, an immune-mediated amplification of neurodegeneration is thought to occur that involves, notably, microglia. Thus, a robust microglial activation was demonstrated in the SNpc of PD patients (McGeer *et al.*, 1988, 2001) as well as in different animal models of PD (Depino *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2001). Moreover, in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) murine model of PD, several microglia-related molecules were shown to be crucial to the development of dopaminergic neurodegeneration (Hirsch *et al.*, 1998; Liberatore *et al.*, 1999). These include in particular TNF- $\alpha$  (Sriram *et al.*, 2006), IFN- $\gamma$  (Mount *et al.*, 2007), Mac-1 (Hu *et al.*, 2008), CX3CR1 and 18-kDa Translocator Protein TSPO (Cardona *et al.*, 2006; Maia *et al.*, 2012). Nevertheless, while neuron/ microglia molecular crosstalk has been extensively investigated, the direct cell-to-cell contacts that may support microglia/ neuron interactions are ill defined in PD and its animal models. Assessing such interactions is of particular importance since microglial cells are known to sense the neuronal microenvironment by continuously extending and retracting their processes and ramifications (Davalos *et al.*, 2005; Hines *et al.*, 2009; Nimmerjhan *et al.*, 2005). In addition, at least two types of microglia/neuron cell-to-cell contacts were previously reported that do not relate with phagocytosis per se. First, under developmental conditions, microglia and neuronal cell bodies were shown to closely appose during microglia-induced neuronal apoptosis (Marin-Teva *et al.*, 2004). Second, in adult mice, microglial ramifications were found to monitor integrity and functional state of synapses through transient contacts that establish periodically in a time-scale of minutes (Paolicelli *et al.*, 2011; Schafer *et al.*, 2012, 2013; Tremblay *et al.*, 2010; Wake *et al.*, 2009). However, little is known about such

microglia/ neuron physical interactions under conditions of neurodegeneration such as PD. In this study, we mapped microglia/ neuron intercellular contacts in the 6-OHDA murine model of PD and assessed the links between these interactions and the time-course of 6-OHDA induced neuroinflammation, neurodegeneration, and behavioral alterations.

## **Materials and Methods**

### **Animals**

All animals used in this study were female mice aged 10 to 14 weeks old at the time of experiments. C57Bl/6 female mice were obtained from Roger Janvier (Le Genest Saint Isle, France). DAP12 Knock-In or CX3CR1GFP/+ mice (Fuhrmann *et al.*, 2010) were obtained from colonies bred respectively at the “École Normale Supérieure de Lyon” (from Pierre Jurdic’s team) and “Faculté Créteil” (from Romain Gherardi’s team). DAP12 (DNAX adaptor protein 12) is a transmembrane adaptor molecule that associates to immune receptors expressed on natural killer cells (NK cells) and myeloid cells such as macrophages, microglia and dendritic cells (Lanier, 2009). Several receptors exerting major functions in microglia associate to DAP12 and induce intracellular signaling pathways via the immunoreceptor tyrosine-based activating motif (ITAM) bore by DAP12. These receptors include notably the M-CSF receptor (Macrophage Colony-Stimulating Factor; Otero *et al.*, 2009), TREM-2 (Triggering Receptor Expressed by Myeloid cells 2; Colonna, 2003) and CD11b (Linnartz and Neumann, 2013). It has to be noticed that besides a decreased density of microglial cells (Otero *et al.*, 2009), DAP12 Knock-In mice harbor developmental CNS alterations such as hypomyelination (Nataf *et al.*, 2005) and impaired synaptic functions (Bessis *et al.*, 2007; Roumier *et al.*, 2004). Mice were acclimated to their environment one week prior to surgery. Animals were kept under controlled temperature and humidity with food and water provided ad libitum, with a circadian cycle of light/ dark 12/12 h during the entire time of experiments. Approval from the Regional Committee for Animal Ethics of Rhone-Alpes was obtained for all animal experiments performed in this study.

## Stereotaxy

Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of xylazine/ketamine (10 and 100 mg/kg, respectively). Then, 2  $\mu$ L of 6-OHDA (Tocris) diluted at a concentration of 4  $\mu$ g/ $\mu$ L in 0.02% ascorbic acid were injected into the left striatum (1  $\mu$ L/min) using a stereotaxic apparatus, according to the following coordinates relative to bregma: 20.7 mm anteroposterior, 2 mm lateral, 22.4 mm deep (Meissner *et al.*, 2005). The opposite side was left free from injection and served as a negative control for histological analyses (Schober *et al.*, 2004). Moreover, in each experimental group, one to two animals received an unilateral intrastriatal injection of 2  $\mu$ L ascorbic acid 0.02% diluted in 9& NaCl (Sigma) as a negative control.

## Apomorphine-Induced Rotation Test

An apomorphine-induced rotation test was performed to assess and quantify functional alterations of the nigrostriatal dopaminergic system in 6-OHDA injected mice, as previously described in 6-OHDA rats (Przedborski *et al.*, 1995). This behavioral test was performed on days 4, 7, and 14 following intrastriatal injection of 6-OHDA. Briefly, apomorphine (Sigma; 0.4 mg/kg diluted in NaCl 9&) was injected intraperitoneally (i.p.) and the circling behavior of mice was then assessed. The number of rotations as well as their laterality (ipsilateral or contralateral to the intrastriatal injection side) was recorded manually over a period of 30 min, 20 min following i.p. injections. For each group of 6-OHDA injected mice tested, control healthy mice or that had been injected intrastrially with vehicle alone (i.e., ascorbic acid) were assessed in parallel. Immunohistofluorescence At days 4, 7, or 14 post-6-OHDA injections, animals were euthanized by a lethal intraperitoneal injection of pentobarbital following intracardiac perfusion with paraformaldehyde 4% under deep anesthesia. 14-mm-thick coronal sections were performed on the caudal part of brains and free-floating sections crossing the SNpc were further processed for immunohistochemistry. Briefly, following incubation in blocking solution (PBS–BSA 4% supplemented with 10% normal goat serum and 0.1% Triton) for one hour at room temperature, slices were incubated overnight at 4\_C with a rabbit anti-mouse TH polyclonal antibody (Chemicon International) diluted 1:1500 in PBS and/or a rat

anti-mouse F4/80 monoclonal antibody (Serotec) diluted 1:100 in PBS. Slices were then rinsed in PBS and incubated for two hours at room temperature with Alexafluor 555-conjugated goat anti-rabbit antibody (Molecular Probes) and/or Alexafluor 488-conjugated goat anti-rat antibody (Molecular Probes) diluted respectively 1:1000 and 1:500 in PBS. Finally, coloration with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) was performed to visualize nuclei and slices were mounted on gelatinized slides before examination on a confocal fluorescence microscope (Leica TCS SP2) for confocal imaging of 14- $\mu\text{m}$  z-stacks. When needed, selected areas were digitally photographed on a Zeiss Axioplan II microscope to obtain mosaic views. 3-Dimension (3D) reconstitutions were performed from confocal images obtained at 633 using Amira Software (see below).

#### Quantitative Analysis of TH<sup>+</sup> Cell Loss

For each animal examined, TH<sup>+</sup> cells were counted manually on digital photomicrographs of the SN obtained from 15 to 20 immunostained sections covering the largest anteroposterior axis of the SN as determined by the atlas of Paxinos and Franklin. The ratio of TH<sup>+</sup> cells recorded in the SN ipsilateral to the injection site, relative to the contralateral side, was then calculated allowing TH cell loss to be estimated.

#### Quantitative Analysis of Microglial Density

In preliminary experiments, co-immunostainings of TH<sup>+</sup> neurons and microglia were found to be technically difficult using the microglial markers CD68, CD11b, or CMHII. Indeed, in our hands, only co-immunostainings of TH<sup>+</sup> neurons and F4/80<sup>+</sup> microglia allowed a precise mapping of neuron/microglia interactions. However, in order to confirm these results, we also performed experiments in CX3CR1GFP/+ mice, in which both resting and activated microglial cell bodies could be visualized without the need of immunohistochemical labeling (Fuhrmann *et al.*, 2010). For the quantification of F4/80 microglial density, SNpc sections were double-labeled with anti-TH and anti-F4/80 antibodies and quantified using Image J<sub>V</sub>R analysis software. For all sections analyzed, quantification was performed in three fields covering distinct regions of the

SNpc. Images from selected areas were digitally photographed under 203 magnification using the Confocal Microscope Laser Scanning (Leica TCS SP2). A region of interest (ROI) was first defined and measured in each area analyzed (mean surface area  $5.056 \text{ mm}^2$ ), of the injured and opposite SNpc. Surfaces covered by F4/80 were then automatically detected after setting of a threshold. Finally, the area of F4/80 immunostaining was indexed to the total area covered by the ROI, allowing thus a F4/80<sup>+</sup> microglial density to be estimated. For each time point analyzed, immunohistological assessment of TH<sup>+</sup> cell loss and F4/80<sup>+</sup> microglial density was performed on five mice. In parallel experiments, the density of microglial cells was determined by counting GFP<sup>+</sup> microglial cell bodies in the SN of CX3CR1<sup>GFP/+</sup> mice injected intrastrially with 6-OHDA. Free-hand countings of GFP<sup>+</sup> microglial cells were realized in the injured and contralateral SN, previously delimited by TH staining in six 6-OHDA-injured mice and in one control CX3CR1<sup>GFP/+</sup> mice. The absolute number of GFP<sup>+</sup> cells was then indexed to the total area covered by the ROI in the injured or contralateral SN, allowing thus microglial density to be estimated.

#### Quantitative Mapping of Microglia/ TH<sup>+</sup> Cells

Interactions in the SNc of 6-OHDA C57BL/6 or CX3CR1<sup>GFP/+</sup> mice Cell-to-cell contacts between TH<sup>+</sup> neurons and F4/80<sup>+</sup> or GFP<sup>+</sup> microglia were assessed both quantitatively and qualitatively. Briefly, the percentage of TH<sup>+</sup> neuronal somas harboring contacts with microglial cell bodies or microglial ramifications was assessed by free-hand counting in randomly chosen ROI in the injured SNc and in the contralateral SNc, under 633 magnification. Analyses were performed in SNc obtained from 6-OHDA mice sacrificed on day 4 (seven C57Bl/6) or day 7 (seven C57Bl/6 mice and six CX3CR1<sup>GFP/+</sup> mice) post-6-OHDA injection. Image Processing and 3D Reconstruction The Confocal Microscope Laser Scanning performed image acquisition by optical sectioning process. With a motorized stage, a minimum of 20 optical sections have been recorded through the Z axis by step of 0.6  $\mu\text{m}$  maximum. The confocal images stacks were treated by a three-dimensional visualization software: Amira version 3.1 (Visage Imaging, Feurth, Germany). To create 3D animations and pictures, an isosurface method was used that generated geometric surface that represents points of a constant value as a limit between shadow and

brightness of a staining. This limit was defined through an adjusted threshold. This representation was used to show TH<sup>+</sup> neurons and F4/80<sup>+</sup> or GFP<sup>+</sup> microglia.

## Statistical Analysis

All data are given as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Values from ipsi- and contralateral sides were compared within each animal using a non-parametric two-tailed Mann–Whitney U test. Comparisons of 6-OHDA injected animals with vehicle-treated ones were performed using an unpaired Student's t-test. The level of statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

## Results

### Time Course of TH<sup>+</sup> Neuronal Cell Loss and Behavioral Alterations in C57Bl/6 Injected Mice

The loss of TH<sup>+</sup> neurons in the injured SNc as compared with the contralateral side was estimated as follows: 26.6  $\pm$  4%, on day 4 post-injury (p.i.), 29.4  $\pm$  2.6% on day 7 p.i., and 35.05  $\pm$  0.6% on day 14 p.i. (Fig. 1A,B). Interestingly, such a neuronal cell loss reached significantly higher levels on day 14 as compared with day 4 or 7 p.i. (Fig. 1A,B) indicating that dopaminergic neurodegeneration in this model is not an acute process. Supporting this view, we could observe significant alterations of the apomorphine-induced rotation test occurring as early as day 4 p.i., peaking on day 7 p.i., and remaining until day 14 p.i. (Fig. 1C).

### TH<sup>+</sup> Neuronal Cell Loss, Behavioral Alterations and Microglial Accumulation in DAP-12 Knock-In Injected Mice

To address the question of the function of microglia during neurodegeneration, we used DAP-12 KI mice in which macrophages/microglia are defective with regard to their number and functions (Colonna, 2003). The loss of dopaminergic neurons after 6-OHDA injection was significantly lower in injected DAP-12 KI mice as compared with injected C57Bl/6 WT mice (18.2  $\pm$  1.5% on day 4 and 17.8  $\pm$  2.7% on day 7

versus 26.6 ± 4% on day 4 and 29.4 ± 2.6% on day 7 in C57Bl/6 WT-injected mice, \* $P < 0.05$ , non-parametric two-tailed Mann–Whitney test) (Fig. 2A–C). Accordingly, behavioral alterations were significantly less pronounced in injected DAP-12 KI mice than in injected C57Bl/6 WT mice (Fig. 2D). Finally, as expected, microglial accumulation was dramatically less pronounced in injected DAP-12 KI mice as compared with injected C57Bl/6 WT mice (Fig. 2E,F). Altogether, these results suggest that in our 6-OHDA model, as previously reported in the MPTP model (Liberatore *et al.*, 1999), microglia plays a major deleterious role in the physiopathology of dopaminergic neurodegeneration.

#### Kinetics of F4/80<sup>+</sup> Microglial Accumulation and Appositions Between TH<sup>+</sup> Somas and Microglial Somas in the SNc of C57Bl/6 Injected Mice

When assessing the density of F4/80<sup>+</sup> microglial cells in the SNc, we found that microglia significantly accumulated in the injured SNc as compared with the contralateral side (Fig. 3A,B). Interestingly, such a microglial accumulation was maximum on day 7 p.i. then dramatically dropped on day 14 p.i. (104 ± 10%, 110 ± 17%, 11 ± 1.3% on days 4, 7, and 14 p.i., respectively). We then sought to identify and map cell-to-cell contacts between microglia and dopaminergic neurons in the SNc of 6-OHDA intoxicated mice. The first type of interactions we observed consisted in direct appositions between TH<sup>+</sup> somas and microglial cell bodies labeled with F4/80 (Fig. 3C–E). Indeed, on day 4 p.i., we found such appositions in as much as 32.7 ± 5.5% of TH<sup>+</sup> neurons in the injured SNc as compared with 2.6 ± 1.7% in the contralateral side (\*\* $P < 0.01$ , non-parametric two-tailed Mann–Whitney test, Fig. 3F). Interestingly, we observed that multiple TH<sup>+</sup> somas presenting such appositions harbored fragmented nuclei, indicative of programmed cell death (Fig. 3D,E).

## Microglial Density and Appositions Between TH<sup>+</sup> Somas and GFP<sup>+</sup> Microglial Somas in the SNc of CX3CR1<sup>GFP/+</sup> Injected Mice

Similarly in CX3CR1<sup>GFP/+</sup> mice, in which both microglial ramifications and microglial cell bodies are efficiently visualized, a significant increased density of GFP<sup>+</sup> microglia was demonstrated in the injured SNc as compared with the contralateral SNc on day 7 p.i. (263.6 ± 28 cells/mm<sup>2</sup> versus 132.6 ± 20 cells/mm<sup>2</sup>, \*\*P < 0.01, non-parametric two-tailed Mann–Whitney test, Fig. 4A,B). In 6-OHDA-injected CX3CR1<sup>GFP/+</sup> mice, 25.6 ± 5.7% of TH<sup>+</sup> neurons were in close apposition with GFP<sup>+</sup> microglial cell bodies in the injured SNc as compared with only 3.5 ± 2% in the contralateral SNc, on day 7 p.i. (Fig. 4C,G). As observed in injected C57Bl/6 WT mice, multiple TH<sup>+</sup> somas apposed to GFP<sup>+</sup> microglial cell bodies harbored fragmented nuclei (Fig. 4D). Overall, these results demonstrate that in our mice model, a significant loss of dopaminergic neurons can be observed that is accompanied with both behavioral alterations and a robust microglial accumulation in the injured SNc. Moreover, close appositions occur between microglial cell bodies and the soma of apoptotic dopaminergic neurons.

## Cell-to-Cell Contacts Between TH<sup>+</sup> Somas and Microglial Ramifications in the SNc of C57Bl/6 and CX3CR1<sup>GFP/+</sup> Injected Mice

Besides microglial cell bodies, we also observed F4/80<sup>+</sup> microglial ramifications contacting TH<sup>+</sup> somas (Fig. 5A,B). Such interactions were observed in 78.7 ± 2.9% of TH<sup>+</sup> somas on day 4 p.i. and 55.8 ± 9.7% on day 7 p.i. (Fig. 5C) as compared with less than 30% in the contralateral SN (\*P < 0.05, non-parametric two-tailed Mann–Whitney test). Interestingly, in the great majority of TH<sup>+</sup> somas interacting with microglial ramifications, we did not observe fragmented nuclei indicative of programmed cell death. Also, we could demonstrate microglial ramifications that established close interactions with TH<sup>+</sup> neurites (Fig. 5B). Similarly in CX3CR1<sup>GFP/+</sup> injured-mice, 39.3 ± 7% of TH<sup>+</sup> neurons were in close apposition with microglial ramifications as compared with 14.5% in the contralateral SN on day 7 p.i. (\*P < 0.05, non-parametric two-tailed Mann–Whitney test; Fig. 5D). To further analyze cell-to-cell contacts between microglial ramifications and TH<sup>+</sup> somas, 3D confocal

reconstitutions were performed from double stainings of microglia (F4/80 for C57Bl/6 mice and GFP for CX3CR1<sup>GFP/+</sup> mice) and TH<sup>+</sup> dopaminergic neurons (Fig. 6A and Supp. Info. Movie 1). To our surprise, microglial ramifications not only contacted TH<sup>+</sup> somas but some of them penetrated TH<sup>+</sup> somas (Fig. 6B,C). In addition, we could also observe microglial ramifications that crossed over TH<sup>+</sup> somas (Fig. 6D–G and Supp. Info. Movie 2). Interestingly, it has to be noticed that these penetrating microglial ramifications were demonstrated in TH<sup>+</sup> somas that did not present nuclei fragmentation (Fig. 6D,E).

#### Demonstration of TH<sup>+</sup> vacuole-like structures in the Cytoplasm of Microglia in the SNc of CX3CR1<sup>GFP/+</sup> Injected Mice

In the vicinity of TH<sup>+</sup> neurons, numerous GFP<sup>+</sup> microglial cells harbored a rounded TH<sup>+</sup> “vacuole-like” staining with a size of 1 to 2 μm (Fig. 7A and Supp. Info. Movie 3). Such TH<sup>+</sup> staining could be observed in microglial cells that were not closely apposed to TH<sup>+</sup> somas and, in contrast, none of the TH<sup>+</sup> neurons examined presented a detectable intracytoplasmic GFP<sup>+</sup> fluorescence. Interestingly, we could estimate that 39.8 ± 15.5% microglial cells in the injured SNc harbored a TH<sup>+</sup> intracytoplasmic vacuole-like staining (Fig. 7B, n = 55). 3D reconstitutions of TH<sup>+</sup> microglial cells were then performed allowing to firmly establish that TH<sup>+</sup> inclusions corresponded indeed to intracytoplasmic TH<sup>+</sup> “vacuole-like” (Fig. 7C and Supp. Info. Movie 4). These results suggest that microglia exerts a microphagocytic activity toward TH<sup>+</sup> neurons in the injured SNc.

## Discussion

A number of studies demonstrated the deleterious role of microglia in the murine MPTP model of PD (Cardona *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2003; Sriram *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2002). In contrast, there are yet few works about microglia functions in the murine 6-OHDA model that constitutes a partial lesion model inducing progressive and retrograde neurodegeneration corresponding to an early symptomatic stage of PD. In this view, this study provides several key data describing the time-course of microglial accumulation in relation with behavioral alterations and neurodegeneration.

These results argue for a major role of microglia in 6-OHDA-induced dopaminergic neurodegeneration. In particular, microglial accumulation preceding the maximum of TH<sup>+</sup> cell loss strongly suggests that microglial cells do not exclusively support scavenger functions in this model. Interestingly, we observed that in the SNc of 6-OHDA injected mice, microglial density increased somehow transiently as it returned to baseline levels as early as day 14 post-injection in spite of neuronal loss progression (Fig. 8). These results are in agreement with previous studies performed in mice acutely intoxicated with MPTP (Kurkowska-Jastrzebska *et al.*, 1999; Liberatore *et al.*, 1999) and in rats intrastrially injected with 6-OHDA (Maia *et al.*, 2012; Marinova-Mutafchieva *et al.*, 2009; Rodriguez-Pallares *et al.*, 2007). However, besides these descriptive results, we were able to show that DAP-12 Knock-In mice presented less inflammatory reaction in response to 6-OHDA, and were significantly less susceptible to neurodegeneration. Molecular mechanisms underlying the protective effect observed in DAP-12 KI mice are yet to be assessed. Indeed, this result is possibly related to the constitutive decreased density of microglia in DAP-12 deficient mice (Otero *et al.*, 2009) and/or to an altered functional of microglia in these mice. In this regard, Wakselman *et al.* (2008) showed that convergence of signals mediated by DAP-12 and CD11b triggered neuronal apoptosis in the developing hippocampus in mice. Whatever mechanisms are involved, our results demonstrate that microglia participate to the process of dopaminergic neurodegeneration, induced by 6-OHDA.

Another goal of the present work was to map cell-to-cell contacts between TH<sup>+</sup> neurons and microglia during dopaminergic neurodegeneration in mice. A quantitatively important mode of neuron/microglia physical interactions consisted in close appositions between microglial cell bodies and TH<sup>+</sup> somas. Interestingly, such contacts were demonstrated with a higher frequency on day 4 post-injection (32.7% of TH<sup>+</sup> neurons), before the maximum of TH<sup>+</sup> cell loss was reached, i.e., on day 14 post-injection. At this later time point, we could not observe close appositions between microglial cell bodies and TH<sup>+</sup> somas. Comparative time courses of neuroinflammation, neurodegeneration and microglia/neuron cell-to-cell contacts suggest that microglial accumulation occurs early during the time course of TH<sup>+</sup> cell loss and is accompanied by increased cell-to-cell contacts between microglia and TH<sup>+</sup> neurons (Fig. 8). Interestingly, multiple TH<sup>+</sup> neurons in contact with microglia

harbored nuclei fragmentation, indicating an ongoing apoptotic process. Nuclei fragmentation of apoptotic neurons was also reported in the 6-OHDA rat model (Marinova-Mutafchieva *et al.*, 2009). Along the same line, we recently demonstrated the expression of caspases 3 and 7 in TH<sup>+</sup> neurons and the neuroprotective function of autophagy in the 6-OHDA murine model (Fouillet *et al.*, 2012). Moreover, it was shown that in the developing cerebellum, appositions between microglia and apoptotic neurons were accompanied by a pro-apoptotic activity of microglial cells toward neurons (Marin-Teva *et al.*, 2004). As we have shown that DAP-12 KI mice were partially protected against 6-OHDA effects, one may hypothesize that microglia, possibly via DAP-12-mediated mechanisms, might be mandatory for the completion of programmed cell death in TH<sup>+</sup> neurons. Whether cell-to-cell contacts are dispensable in this process remains to be established. In this regard, it has to be noticed that a number of membranous receptors and their cognate membranous ligands are expressed on microglia and neurons (Biber *et al.*, 2008; DeHaas *et al.*, 2007). Besides apposition between microglia and TH<sup>+</sup> somas, a surprising finding was the demonstration of microglial ramifications entering the soma of apparently non-apoptotic TH<sup>+</sup> neurons. In spite of their relatively large diameter, these penetrating ramifications partly resemble the so-called tunneling nanotubes that support communications between cells *in vitro* and possibly *in vivo* (Gerdes *et al.*, 2009; Kfoury *et al.*, 2012; Onfelt *et al.*, 2005). However, the concomitant presence of TH<sup>+</sup> vacuole-like structures in the cytoplasm of GFP<sup>+</sup> microglia strongly suggests that penetrating microglial ramifications actually support a process of microphagocytosis toward TH neurons. Such an activity of microphagocytosis is likely quantitatively important as nearly 40% of microglial cells in the injured SNc harbored TH<sup>+</sup> vacuole-like structures. Such a behavior of “cell pinching-off” or nibbling was previously demonstrated in dendritic cells as a mean to capture antigens from living cells (Harshyne *et al.*, 2001, 2003). Interestingly, this process requires sustained cell-to-cell contacts and generates endocytic vesicles of 1 μm size within the cytoplasm of dendritic cells (Harshyne *et al.*, 2001, 2003). In this view, our results raise the possibility that penetrating microglial ramifications similarly support a process of nibbling from living TH<sup>+</sup> neurons. On this basis, penetrating microglial ramifications would represent a new mode of neuron/microglia physical interactions through which microglia might sense neuronal intra-cytoplasmic events and/or capture neuronal

antigens under specific pathological conditions (Fig. 8). In this functional scheme, one may extrapolate that neuropathogenic intracytoplasmic proteins such as mutated synuclein or abnormally phosphorylated tau protein might be sensed by microglia before being exposed, and possibly altered, in the extracellular space (Clavaguera *et al.*, 2009; Freundt *et al.*, 2012). While synaptic stripping by microglia is not admitted by all authors (Siskova *et al.*, 2009; Tremblay *et al.*, 2010; Wake *et al.*, 2009; Yamada *et al.*, 2011) our work indicates that alternatively, microglia might alter and/or sense neuronal functions via nibbling from living cells. Mapping the full range of neuron/microglia interactions and the time-course of these events is of major importance to understand the role of microglia in neurodegenerative diseases. In this context, not only paracrine signals but also physical cell-to-cell contacts have to be considered as supports of neuron/microglia crosstalk. Using the murine 6-OHDA model to assess the relationships between neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration may prove useful for the design of new therapeutic approaches.

## References

- Bessis A, Bechade C, Bernard D, Roumier A. (2007). Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 55:233–238.
- Biber K, Vinet J, Boddeke HW. (2008). Neuron-microglia signaling: chemokines as versatile messengers. *J Neuroimmunol* 198:69–74.
- Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang D, Kidd G, Dombrowski S, Dutta R, Lee JC, Cook DN, Jung S, Lira SA, Littman DR, Ransohoff RM.(2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci* 9:917–924.
- Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, Fraser G, Stalder AK, Beibel M, Staufenbiel M, Jucker M, Goedert M, Tolnay M. (2009). Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 11:909–913.
- Colonna M. (2003). DAP12 signaling: From immune cells to bone modeling and brain myelination. *J Clin Invest* 111:313–314.

- Colonna M. (2003). TREMs in the immune system and beyond. *Nat Rev Immunol* 3:445–453. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8:752–758.
- De Haas AH, van Weering HR, de Jong EK, Boddeke HW, Biber KP. (2007). Neuronal chemokines: Versatile messengers in central nervous system cell interaction. *Mol Neurobiol* 36:137–151.
- Depino AM, Earl C, Kaczmarczyk E, Ferrari C, Besedovsky H, del Rey A, Pitossi FJ, Oertel WH. (2003). Microglial activation with atypical proinflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 18:2731–2742
- Fouillet A, Levet C, Virgone A, Robin M, Dourlen P, Rieusset J, Belaidi E, Ovize M, Touret M, Nataf S, Mollereau B. (2012). ER stress inhibits neuronal death by promoting autophagy. *Autophagy* 8:915–926.
- Freundt EC, Maynard N, Clancy EK, Roy S, Bousset L, Sourigues Y, Covert M, Melki R, Kirkegaard K, Brahic M. (2012). Neuron-to-neuron transmission of  $\alpha$ -synuclein fibrils through axonal transport. *Ann Neurol* :72: 517–524.
- Fuhrmann M, Bittner T, Jung CK, Burgold S, Page RM, Mitteregger G, Haass C, LaFerla FM, Kretschmar H, Herms J. (2010). Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 13:411–413.
- Gao HM, Liu B, Zhang W, Hong JS. (2003). Critical role of microglial NADPH oxidase-derived free radicals in the in vitro MPTP model of Parkinson's disease. *FASEB J* 17:1954–1956.
- Gerdes HH. (2009). Prions tunnel between cells. *Nat Cell Biol* 11:235–236. Harshyne LA, Watkins SC, Gambotto A, Barratt-Boyes SM. 2001. Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J Immunol* 166:3717–3723.
- Harshyne LA, Zimmer MI, Watkins SC, Barratt-Boyes SM. (2003). A role for class A scavenger receptor in dendritic cell nibbling from live cells. *J Immunol* 170:2302–2309.

- Hines DJ, Hines RM, Mulligan SJ, Macvicar BA. (2009). Microglia processes block the spread of damage in the brain and require functional chloride channels. *Glia* 57:1610–1618.
- Hirsch EC, Hunot S, Damier P, Faucheux B. (1998). Glial cells and inflammation in Parkinson's disease: A role in neurodegeneration? *Ann Neurol* 44:S115– S120.
- Hu X, Zhang D, Pang H, Caudle WM, Li Y, Gao H, Liu Y, Qian L, Wilson B, Di Monte DA, Ali SF, Zhang J, Block ML, Hong JS. (2008). Macrophage antigen complex-1 mediates reactive microgliosis and progressive dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *J Immunol* 181: 7194–7204.
- Kfoury N, Holmes BB, Jiang H, Holtzman DM, Diamond MI. (2012). Trans-cellular propagation of tau aggregation by fibrillar species. *J Biol Chem* 287: 19440–19451.
- Kurkowska-Jastrzebska I, Wrońska A, Kohutnicka M, Członkowski A, Członkowska A. (1999). The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl- 1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. *Exp Neurol* 156:50–61.
- Lanier LL. (2009). DAP10- and DAP12-associated receptors in innate immunity. *Immunol Rev* 227:150–160.
- Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, Valina LD, Dawson TM, Przedborski S. (1999). Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med* 12:1403–1409.
- Linnartz B, Neumann H. (2013). Microglial activatory (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)- and inhibitory (immunoreceptor tyrosinebased inhibition motif)-signaling receptors for recognition of the neuronal glycocalyx. *Glia* 61:37–46.
- Marin-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M. (2004). Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41:535– 547.
- Marinova-Mutafchieva L, Sadeghian M, Broom L, Davis JB, Medhurst AD, Dexter DT. (2009). Relationship between microglial activation and dopaminergic neuronal loss in the

- substantia nigra: A time course study in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 110:966–975.
- Maia S, Arlicot N, Vierron E, Bodard S, Vergote J, Guilloteau D, Chalon S. (2012). Longitudinal and parallel monitoring of neuroinflammation and neurodegeneration in a 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Synapse* 66:573–583.
- McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. (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 PL, Yasojima K, McGeer EG. (2001). Inflammation in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 86:83–89.
- Meissner KK, Kirkham DL, Doering LC. (2005). Transplants of neurosphere cell suspensions from aged mice are functional in the mouse model of Parkinson's. *Brain Res* 1057:105–112.
- Mount MP, Lira A, Grimes D, Smith PD, Faucher S, Slack R, Anisman H, Hayley S, Park DS. (2007). Involvement of interferon-gamma in microglial-mediated loss of dopaminergic neurons. *J Neurosci* 27:3328–3337.
- Nataf S, Anginot A, Vuillat C, Malaval L, Fodil N, Chereul E, Langlois JB, Dumontel C, Cavillon G, Confavreux C, Mazzorana M, Vico L, Belin MF, Vivier E, Tomasello E, Jurdic P. (2005). Brain and bone damage in KARAP/ DAP12 loss-of-function mice correlate with alterations in microglia and osteoclast lineages. *Am J Pathol* 166:275–286.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314–1318.
- Onfelt B, Purbhoo MA, Nedvetzki S, Sowinski S, Davis DM. (2005). Long-distance calls between cells connected by tunneling nanotubules. *Sci STKE* 313: pe55.
- Otero K, Turnbull IR, Poliani PL, Vermi W, Cerutti E, Aoshi T, Tassi I, Takai T, Stanley SL, Miller M, Shaw AS, Colonna M. (2009). Macrophage colony-stimulating factor induces

- the proliferation and survival of macrophages via a pathway involving DAP12 and beta-catenin. *Nat Immunol* 10:734–743.
- Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D, Gross CT. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333:1456–1458.
- Paxinos G, Franklin KBJ. (2001). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, 2nd ed. San Diego: Academic Press, .
- Przedborski S, Levivier M, Jiang H, Ferreira M, Jackson-Lewis V, Donaldson D, Togasaki DM. (1995). Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience* 67:631–647.
- Rodrigues RW, Gomide VC, Chadi G. (2001). Astroglial and microglial reaction after a partial nigrostriatal degeneration induced by the striatal injection of different doses of 6-hydroxydopamine. *Int J Neurosci* 109:91–126.
- Rodriguez-Pallares J, Parga JA, Muñoz A, Rey P, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. (2007). Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: The role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurochem* 103:145–156.
- Roumier A, Béchade C, Poncer JC, Smalla KH, Tomasello E, Vivier E, Gundelfinger ED, Triller A, Bessis A. (2004). Impaired synaptic function in the microglial KARAP/DAP12-deficient mouse. *J Neurosci* 24:11421–11428.
- Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B. (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74:691–705.
- Schafer DP, Lehrman EK, Stevens B. (2013). The “quad-partite” synapse: Microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia* 61: 24–36.
- Schober A. (2004). Classic toxin-induced animal models of Parkinson’s disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res* 318:215–224.

- Siskova Z, Page A, O'Connor V, Perry VH. (2009). Degenerating synaptic boutons in prion disease: Microglia activation without synaptic stripping. *Am J Pathol* 175:1610–1621.
- Sriram K, Matheson JM, Benkovic SA, Miller DB, Luster MI, O'Callaghan JP. (2002). Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: Implications for Parkinson's disease. *FASEB J* 16:1474–1476.
- Sriram K, Matheson JM, Benkovic SA, Miller DB, Luster MI, O'Callaghan JP. (2006). Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: Role of TNF-alpha. *FASEB J* 20:670–682.
- Tremblay ME, Lowery RL, Majewska AK. (2010). Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol* 8:e1000527.
- Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. (2009). Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* 29:3974–3980.
- Wakselman S, B\_echade C, Roumier A, Bernard D, Triller A, Bessis A. (2008). Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *J Neurosci* 28:8138–8143.
- Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J. (2011). Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: A review of the evidence. *Eur J Epidemiol* 26:S1–S58.
- Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Tieu K, Teismann P, Vadseth C, Choi DK, Ischiropoulos H, 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. *J Neurosci* 22:1763–1771.
- Yamada J, Nakanishi H, Jinno S. (2011). Differential involvement of perineuronal astrocytes and microglia in synaptic stripping after hypoglossal axotomy. *Neuroscience* 182:1–10.

## Figure legends

### **FIGURE 1: Kinetics of TH<sup>+</sup> neuronal cell loss and behavioral alterations in 6-OHDA injured mice.**

(A,B) Tyrosine Hydroxylase (TH) immunostainings were performed on free-floating brainstem sections obtained from 6-OHDA-injected mice sacrificed on day 4 p.i. (n 5 30), 7 p.i. (n 5 22) or 14 p.i. (n 5 9). (A) Photomicrographs show representative TH stainings observed in the injured or contralateral SNc. Note the decreased density of TH<sup>+</sup> cells in the injured SN from day 4 to day 14 p.i. Scale bars: 200  $\mu$ m. (B) The percentage of TH<sup>+</sup> cell loss was evaluated in the injured SNc as compared with the contralateral SNc on day 4 p.i., 7 p.i., or 14 p.i. TH<sup>+</sup> cell loss was found to reach 26.64% on day 4, 29.46  $\pm$  2.6% on day 7, and 35.05  $\pm$  0.6% on day 14 p.i. A significantly increased TH<sup>+</sup> cell loss was observed when comparing day 7 to day 14 p.i. (\*p < 0.05, non-parametric two-tailed Mann–Whiney test). (C) Apomorphine rotation test was performed on 6-OHDA injected-mice on day 4 p.i. (n 5 44), 7 p.i. (n 5 26), or 14 p.i. (n 5 12). In parallel, for each time point analyzed, five control mice injected intrastrially with vehicle alone were submitted to this apomorphine rotation test. The number of rotations contralateral to the lesion was counted over a 30 min period. As compared with control mice, 6-OHDA-injected mice presented a significantly biased rotational behavior that could be evidenced on day 4 p.i. (53.02  $\pm$  5.6 contralateral turns), day 7 p.i. (82.9  $\pm$  11.4 contralateral turns), and 14 p.i. (54.9  $\pm$  10.9 contralateral turns; \*\*\*P < 0.001, Student's t test).

### **FIGURE 2: TH<sup>+</sup> neuronal cell loss and behavioral alterations in DAP-12 Knock In mice.**

(A–C) TH immunostainings were performed on free-floating brainstem sections obtained from 6-OHDA-injected DAP-12 KI mice sacrificed on day 4 p.i. (n 5 10) or day 7 p.i. (n 5 11). (A,B) Photomicrographs show representative TH stainings observed in the injured or contralateral SNc. Note the decreased density of TH<sup>+</sup> cells in the injured SNc as compared with the contralateral SNc on day 7 p.i. Scale bars: 200  $\mu$ m. (C) The percentage of TH<sup>+</sup> cell loss was measured in the injured SNc as compared with the contralateral SNc on days 4 and 7 p.i. TH<sup>+</sup> cell loss was

significantly lower in DAP-12 KI injected mice as compared with C57Bl/6 WT injected mice (18.2  $\pm$  1.5% and 17.8  $\pm$  2.7% on day 4 and 7, respectively in DAP-12 KI mice versus 26  $\pm$  4% and 29.4  $\pm$  2.6% on days 4 and 7, respectively in WT mice; \*P < 0.05, non-parametric two-tailed Mann–Whitney test). **(D)** Apomorphine rotation test was performed in WT injected mice on days 4 p.i. (n 5 34), 7 p.i. (n 5 21) or 14 p.i. (n 5 9) and, in parallel, in DAP-12 KI injected mice on days 4 p.i. (n 5 10) or 7 p.i. (n 5 11). The number of rotations contralateral to the lesion was counted over a 30 min period. As compared with C57Bl/6 WT injected mice, behavioral alterations were less pronounced in DAP-12 KI injected mice on day 4 p.i. (19.7  $\pm$  2 turns in DAP-12 KI mice versus 53.02  $\pm$  5.6 turns in WT mice) as well as on day 7 p.i. (50.8  $\pm$  6 turns in DAP-12 KI mice versus 82.9  $\pm$  11.4 turns in WT mice; \*P < 0.05, Student's t test). **(E,F)** In DAP-12 KI mice, increased microglial density was significantly less pronounced in injected mice as compared with WT injected mice on day 4 p.i. (16  $\pm$  1.3% in DAP-12 KI mice versus 104  $\pm$  10% in WT mice) and on day 7 p.i. (10  $\pm$  2.5% in DAP-12 KI mice versus 110  $\pm$  17% in WT mice (\*\*P < 0.01, nonparametric two-tailed Mann–Whitney test). Scale bar: 20  $\mu$ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

**FIGURE 3: Kinetics of F4/80<sup>+</sup> microglial accumulation and appositions between TH<sup>+</sup> somas and microglial cell bodies in the SNc of C57Bl/6 injected mice.**

**(A,B)** TH and F4/80 co-immunostainings were performed on free-floating brainstem sections obtained from 6-OHDA-injected mice sacrificed on day 4 p.i. (n 5 30), 7 p.i. (n 5 22), or 14 p.i. (n 5 9). **(A)** Photomicrograph shows representative F4/80-TH stainings observed in the injured SNc on day 4, 7, or 14 p.i. Note the accumulation of microglia (green) on days 4 and 7 but not on day 14 p.i. in the injured SNc. Scale bars: 20  $\mu$ m. **(B)** The percentage of increased F4/80 density was evaluated in the injured SNc as compared with the contralateral SNc on days 4, 7, and 14 p.i. Percentage of increased F4/80 density reached 104  $\pm$  10% on day 4 and 110  $\pm$  17% on day 7 p.i. However, on day 14 p.i., only a modest increased density of F4/80 was observed (11  $\pm$  1.3%), which was significantly lower than measured on day 7 p.i. (\*\*P < 0.01, non-parametric two-tailed Mann–Whitney test). **(C–F)** TH and F4/80 coimmunostainings were performed on free-floating brainstem sections obtained

from C57BL/6 injected mice sacrificed on day 4 p.i. (n 5 7) or on day 7 p.i. (n 5 7). Coloration with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) allowed nuclei to be visualized (blue). **(C)** Photomicrograph shows representative F4/80-TH stainings observed in the injured SNc. Close appositions between F4/80<sup>+</sup> microglial cell bodies (green) and TH<sup>+</sup> somas (red) were observed in the injured SNc on day 7 p.i. Scale bar: 50  $\mu$ m. **(D,E)** High-power views of cells from the boxed areas in A. Note that TH<sup>+</sup> somas opposed to F4/80<sup>+</sup> microglial cell bodies present fragmented nuclei (arrow heads) indicative of programmed cell death. Scale bars: 10  $\mu$ m. **(F)** The percentage of TH<sup>+</sup> somas in close apposition with F4/80<sup>+</sup> microglia was measured on day 4 and 7 p.i. Surprisingly, we found that on days 4 and 7 p.i., respectively, 32.7  $\pm$  5.5% and 17.2  $\pm$  5.7% of TH<sup>+</sup> somas showed direct appositions with microglial cell bodies in the injured SNc. In contrast, such appositions were occasionally observed in the contralateral SNc (2.6  $\pm$  1.7% and 1.8  $\pm$  1.8% on days 4 and 7 p.i. respectively; \*\*P < 0.01, non-parametric two-tailed Mann–Whitney test). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

**FIGURE 4: Microglial density and appositions between TH<sup>+</sup> somas and GFP<sup>+</sup> microglial cell bodies in the SNc of CX3CR1<sup>GFP/+</sup> injected mice.**

**(A–F)** TH immunostaining was performed on free-floating brainstem sections obtained from 6-OHDA-injected CX3CR1<sup>GFP/+</sup> mice sacrificed on day 7 p.i. (n 5 6). **(A)** Mosaic reconstitution of a brainstem section crossing the SNc shows that the density of GFP<sup>+</sup> microglial cells is increased in the injured SN as compared with the contralateral side. Scale bar: 500  $\mu$ m. **(B)** The density of GFP<sup>+</sup> microglial cells measured in the injured SN was significantly increased (263  $\pm$  28 cells/mm<sup>2</sup>) as compared with the contralateral SN (132  $\pm$  20 cells/mm<sup>2</sup>) on day 7 p.i. (\*\*P < 0.01, non-parametric two-tailed Mann–Whitney test). **(C)** Photomicrograph showing intimate appositions between GFP<sup>+</sup> microglia cell bodies (green) and TH<sup>+</sup> somas (red). Coloration with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) was performed to visualize nuclei. Scale bar: 50  $\mu$ m. **(D–F)** High-power views of cells from the boxed areas in C. GFP<sup>+</sup> microglial cell bodies (green) are found in close apposition with TH<sup>+</sup> somas (red). Interestingly, multiple TH<sup>+</sup> somas presenting such appositions harbored fragmented nuclei (arrow heads). Scale bars: 10  $\mu$ m. **(G)** The percentage of

TH<sup>+</sup> somas in close apposition with a GFP<sup>+</sup> microglial cell body was evaluated on day 7 p.i. At this time point, 25.6 ± 5.7% of TH<sup>+</sup> somas were apposed to microglial cell bodies as compared with only 3.5 ± 2% in the contralateral SNc (\*\*P < 0.01, non-parametric two-tailed Mann–Whitney test). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

**FIGURE 5: Cell-to-cell contacts between TH<sup>+</sup> somas and microglial ramifications in the SNc of C57Bl/6 and CX3CR1/GFP<sup>+</sup> injected mice.**

(A,B) TH and F4/80 co-immunostainings were performed on free-floating brainstem sections obtained from C57Bl/6 injected mice sacrificed on day 4 p.i. (n = 7) or 7 p.i. (n = 7). Coloration with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) allowed nuclei to be visualized (blue). (A) Photomicrograph shows a representative F4/80-TH double staining observed in the injured SNc on day 7 p.i. Numerous F4/80<sup>+</sup> microglial ramifications (green) were found in close vicinity with TH<sup>+</sup> somas (red). Scale bar: 20 μm. (B) An enlarged view of cells from the boxed area in A is shown. F4/80<sup>+</sup> microglial ramifications (green) are in close apposition with the neurites (arrow head) and the soma (arrow) of a TH<sup>+</sup> neuron (red). Scale bar: 10 μm. (C). The percentage of TH<sup>+</sup> somas in close apposition with F4/80<sup>+</sup> microglial ramifications was measured in the injured SNc as compared with the contralateral SNc on days 4 and 7 p.i. In the injured SNc, the percentage of TH<sup>+</sup> somas showing direct appositions with microglial ramifications reached 78.7 ± 2.9% on day 4 p.i. and 55.8 ± 9.7% on day 7 p.i. as compared with 26.8 ± 6.6% and 23.6 ± 5.8%, respectively in the contralateral SNc (\*P < 0.05, non-parametric two-tailed Mann–Whitney test). (D) In CX3CR1<sup>GFP/+</sup> injected mice (n = 6), the percentage of TH<sup>+</sup> somas in close apposition with GFP<sup>+</sup> microglial ramifications reached 39.3 ± 7% on day 7 p.i. as compared with 14.5 ± 4.6% in the contralateral SNc (\*P < 0.05, non-parametric two-tailed Mann–Whitney test). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

**FIGURE 6: Penetrating microglial ramifications in the soma of TH<sup>+</sup> neurons.**

(A–C) TH and F4/80 co-immunostainings were performed on free-floating brainstem sections obtained from C57BL/6 injected mice sacrificed on day 7 p.i. (n 5 7). (A) Photomicrograph showing a TH<sup>+</sup> neuron in the injured SNc, harboring an intracytoplasmic F4/80<sup>+</sup> dot-like staining (white box). Scale bar: 40 μm. (B,C) Enlarged images of 0.6 μm optical sections show that F4/80<sup>+</sup> microglial ramifications penetrate the soma of this TH<sup>+</sup> neuron (\*). Scale bars: 10 μm and 5 μm. (D–G) TH immunostainings were performed on free-floating brainstem sections obtained from CX3CR1<sup>GFP/+</sup> injected mice sacrificed on day 7 p.i. (n 5 6). (D,E) High magnification views of 0.6 μm optical sections demonstrate GFP<sup>+</sup> microglial ramifications (arrow heads) penetrating the soma of a TH<sup>+</sup> neuron. Note that D and E correspond to distinct optical sections of same neuron/ microglia cell-to-cell contacts obtained at 2 different z levels distant of 12 nm. (F,G) High magnification views obtained from a 3D reconstitution show that GFP<sup>+</sup> microglial ramifications penetrate the soma of a TH<sup>+</sup> neuron (arrow head). Coloration of nuclei in blue with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) demonstrates the absence of DNA fragmentation in this TH<sup>+</sup> neuron. Scale bars: 10 μm. (F) Images of a 3D reconstitution obtained with an isosurface method demonstrate GFP<sup>+</sup> microglial ramifications penetrating a TH<sup>+</sup> soma (arrow head). Scale bar: 20 μm. (G) A high-magnification view from the boxed area in F shows microglial ramifications penetrating the soma of a TH<sup>+</sup> neuron (arrow head). Scale bar: 5 μm. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

**FIGURE 7: Engulfment of TH<sup>+</sup> “vacuole-like” structures by microglia in the SNc of CX3CR1<sup>GFP/+</sup> 6-OHDA injected-mice.**

(A–C) TH immunostainings were performed on free-floating brainstem sections obtained from 6-OHDA-injected CX3CR1<sup>GFP/+</sup> mice sacrificed on day 7 p.i. (n 5 6). Coloration with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) was performed to visualize nuclei (blue). (A) In the injured SNc, numerous GFP<sup>+</sup> microglia harbored a TH<sup>+</sup> vacuole-like intracytoplasmic staining. The insert shows an enlarged view of a GFP<sup>+</sup>/TH<sup>+</sup> microglial cell from the boxed area. Scale bar: 50 μm. (B) Quantitative

analysis indicates that in the injured SNc the percentage of GFP<sup>+</sup> microglia harboring a TH<sup>+</sup> vacuole-like staining reached 39.8% as compared with 1.4 6 0.5% in the contralateral SNc (\*P < 0.05, nonparametric two-tailed Mann–Whitney test). **(C)** Photomicrograph of a 3D reconstituted image obtained with an isosurface method showing a GFP<sup>+</sup> microglial cell that harbor intracytoplasmic TH<sup>+</sup> vacuoles of 2 μm diameter. Panels C0, C00, and C00 0 show 3 of the 0.6 μm optical sections from which this 3D reconstitution was performed. Scale bar: 5 μm. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

**FIGURE 8: Putative kinetics of neuroinflammation, behavioral alterations, neurodegeneration and neuron/microglia cell-to-cell contacts in the murine 6-OHDA model.**

**(A)** Extrapolated comparative time courses of neuroinflammation, neurodegeneration and behavioral alterations in the 6-OHDA murine model. Based on data obtained at days 4, 7, or 14 post-injection, we propose that mice behavioral alterations are concomitant to dopaminergic neurodegeneration. Early and transient microglial accumulation precedes the maximum of TH<sup>+</sup> cell loss and returns to baseline levels as early as day 14 post-injection in spite of neuronal cell loss progression. Microglia/neurons contacts are observed at higher frequency on day 4 post-injection, i.e., before the maximum of TH<sup>+</sup> neuronal cell loss is reached on day 14 post-injection. At this later time point, fewer microglia/neurons cell-to-cell contacts are observed. **(B)** Putative kinetics of neuron/microglia cell-to-cell contacts in the murine 6-OHDA model. **(1)** Microglia surrounding dopaminergic neurons receive a “Go” or a “No Go” signal allowing or not the entry of ramifications in the neuronal cell body. **(2)** Penetrating microglial ramifications allow the microphagocytosis (nibbling) of intracytoplasmic molecules from living TH<sup>+</sup> neurons. **(3)** Depending on signals sensed by penetrating microglial ramifications, microglial cell bodies appose to neuronal somas and support microglia-mediated neuronal death. **(3’)** Alternatively, microglial cells having endocytosed neuronal cytoplasmic material migrate away from neuronal somas. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

**FIGURE 1**

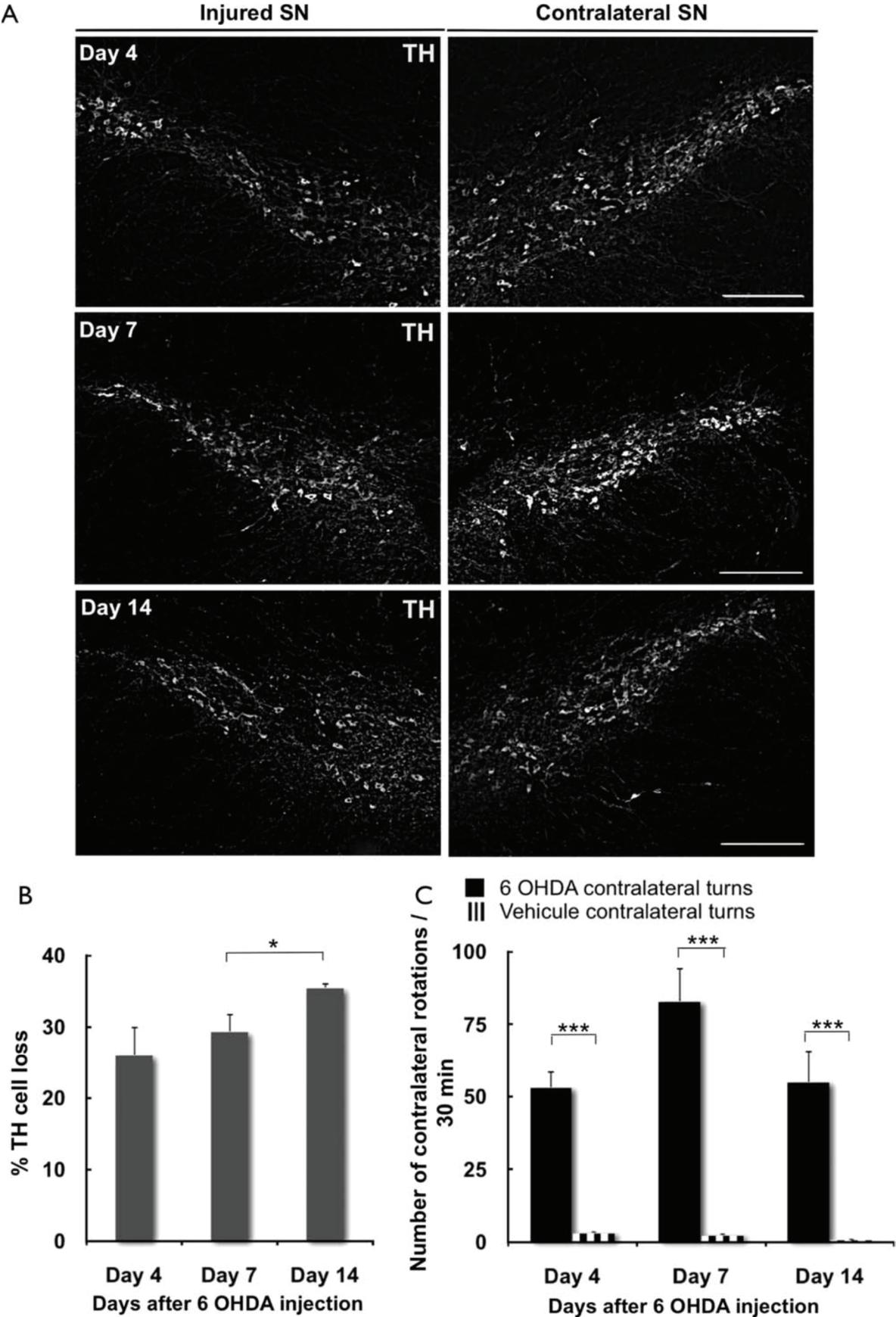
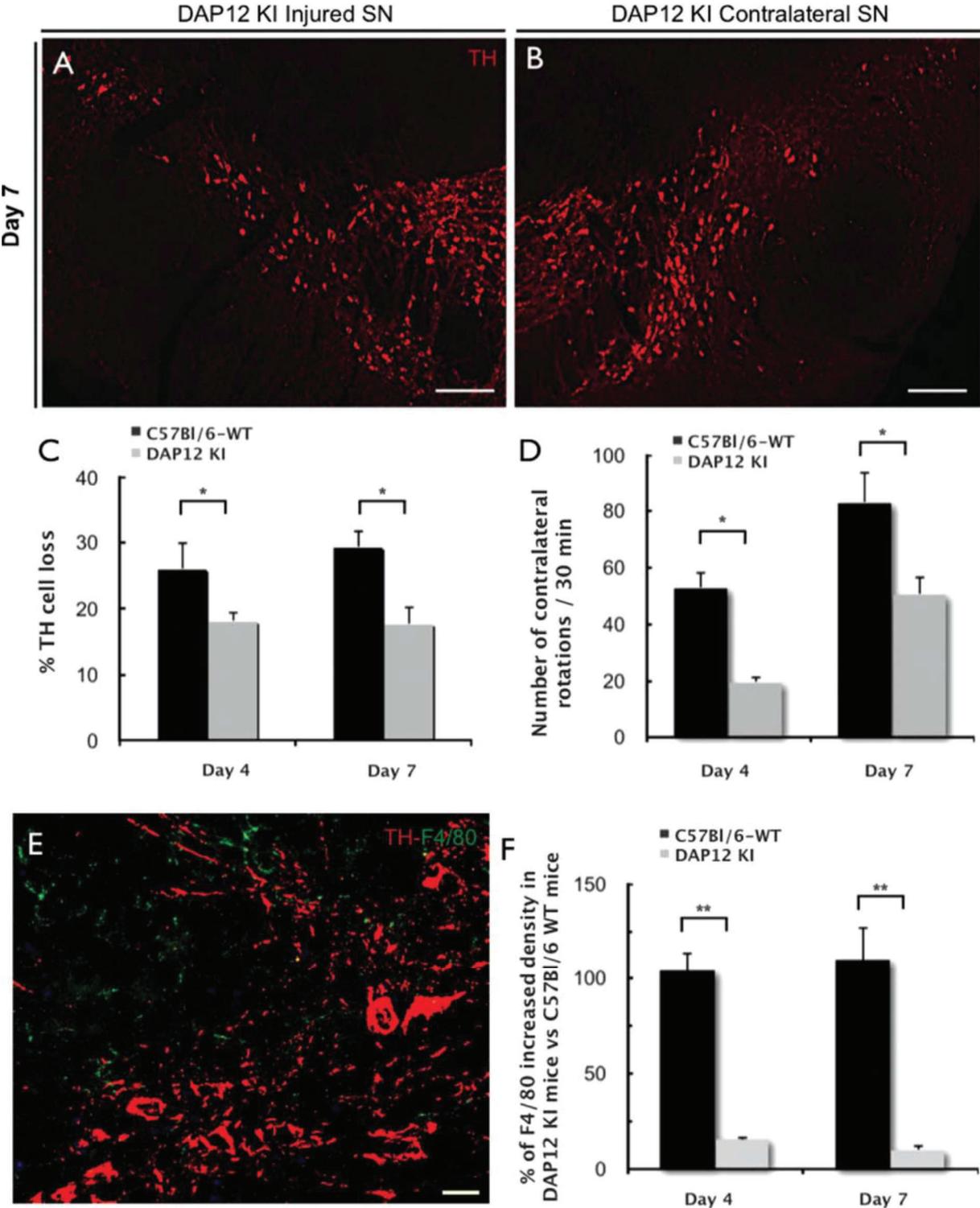


FIGURE 2



**FIGURE 3**

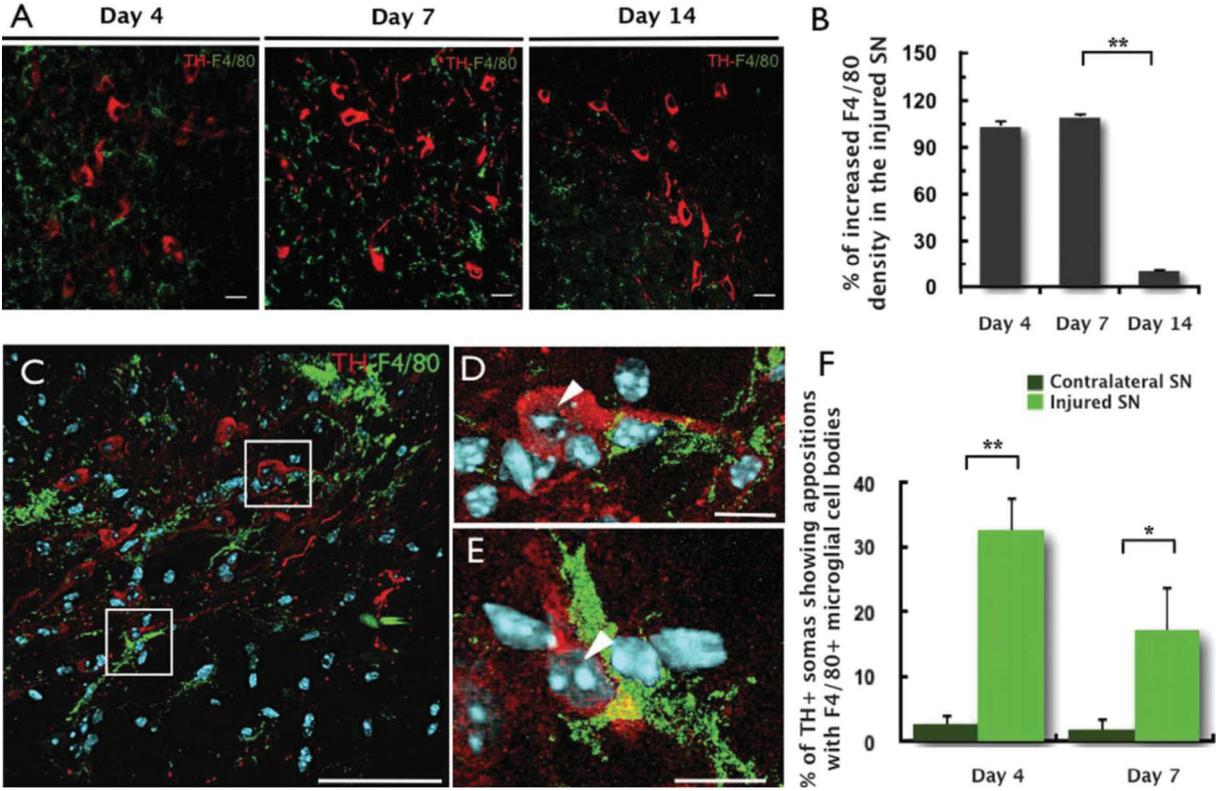


FIGURE 4

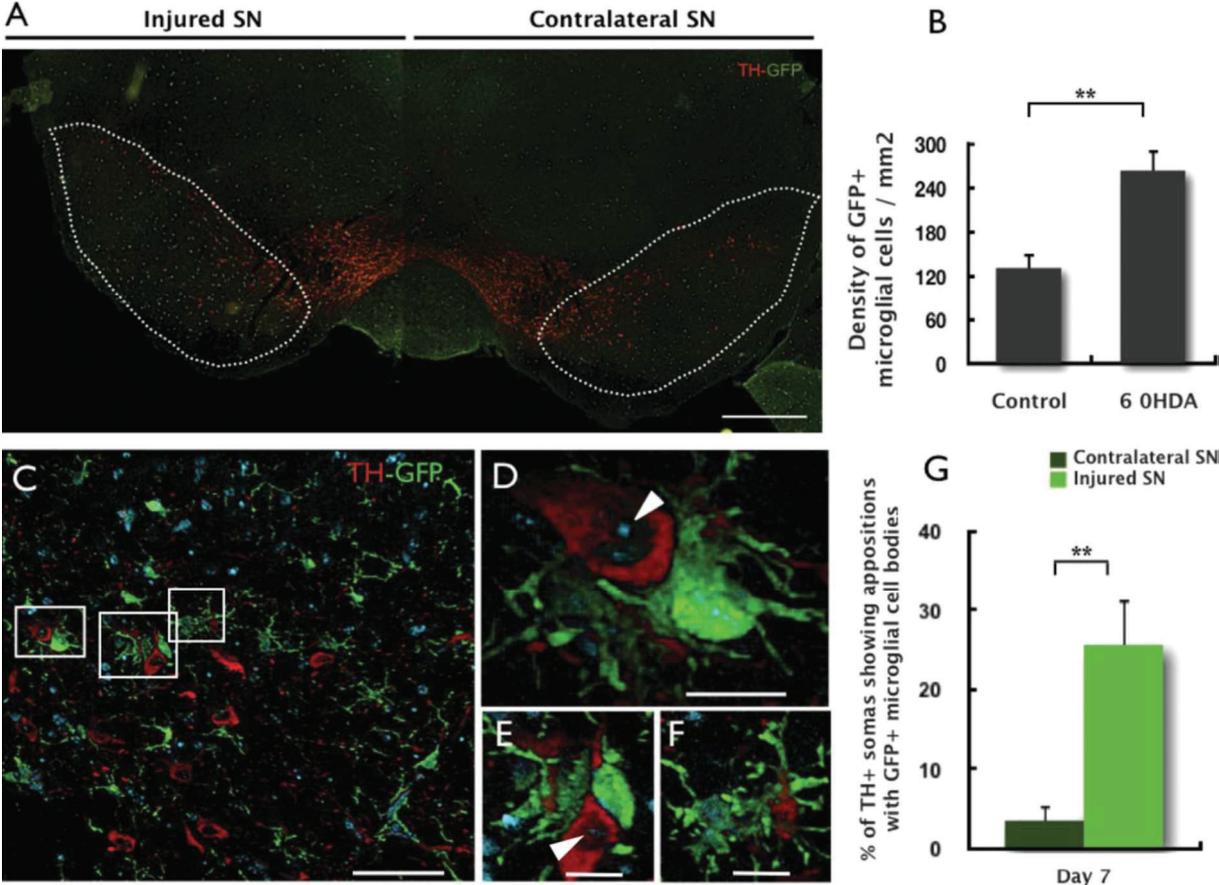


FIGURE 5

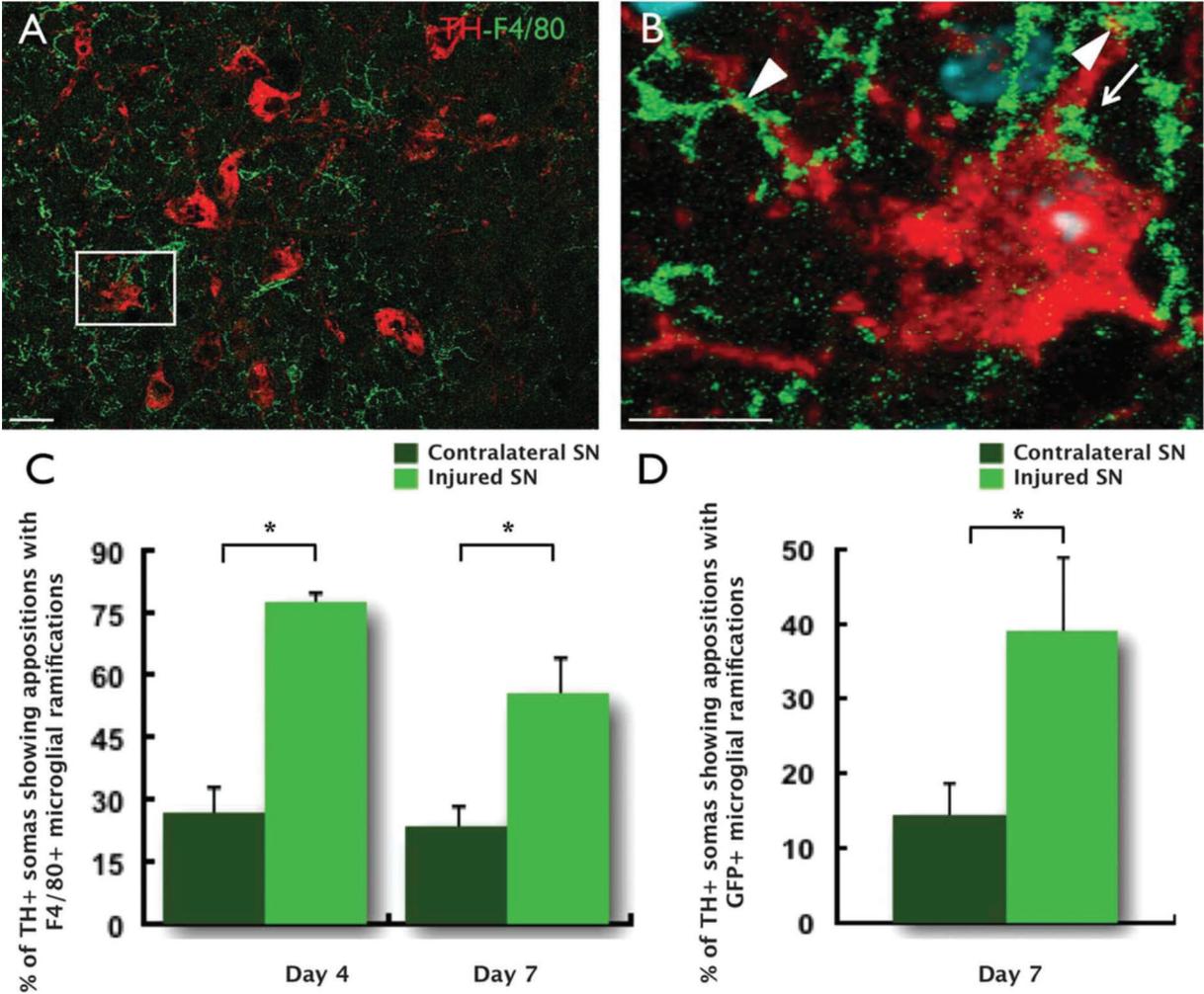


FIGURE 6

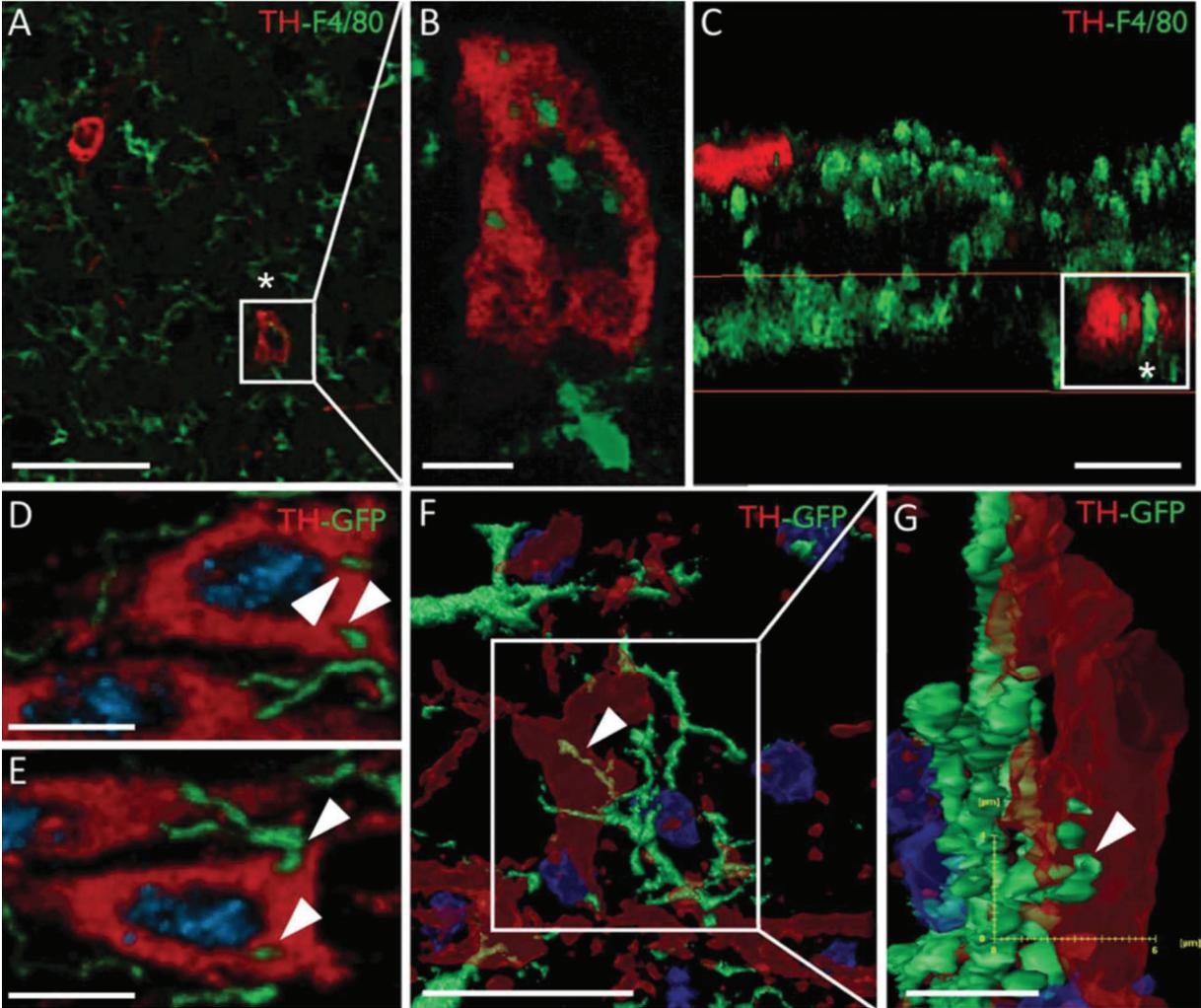


FIGURE 7

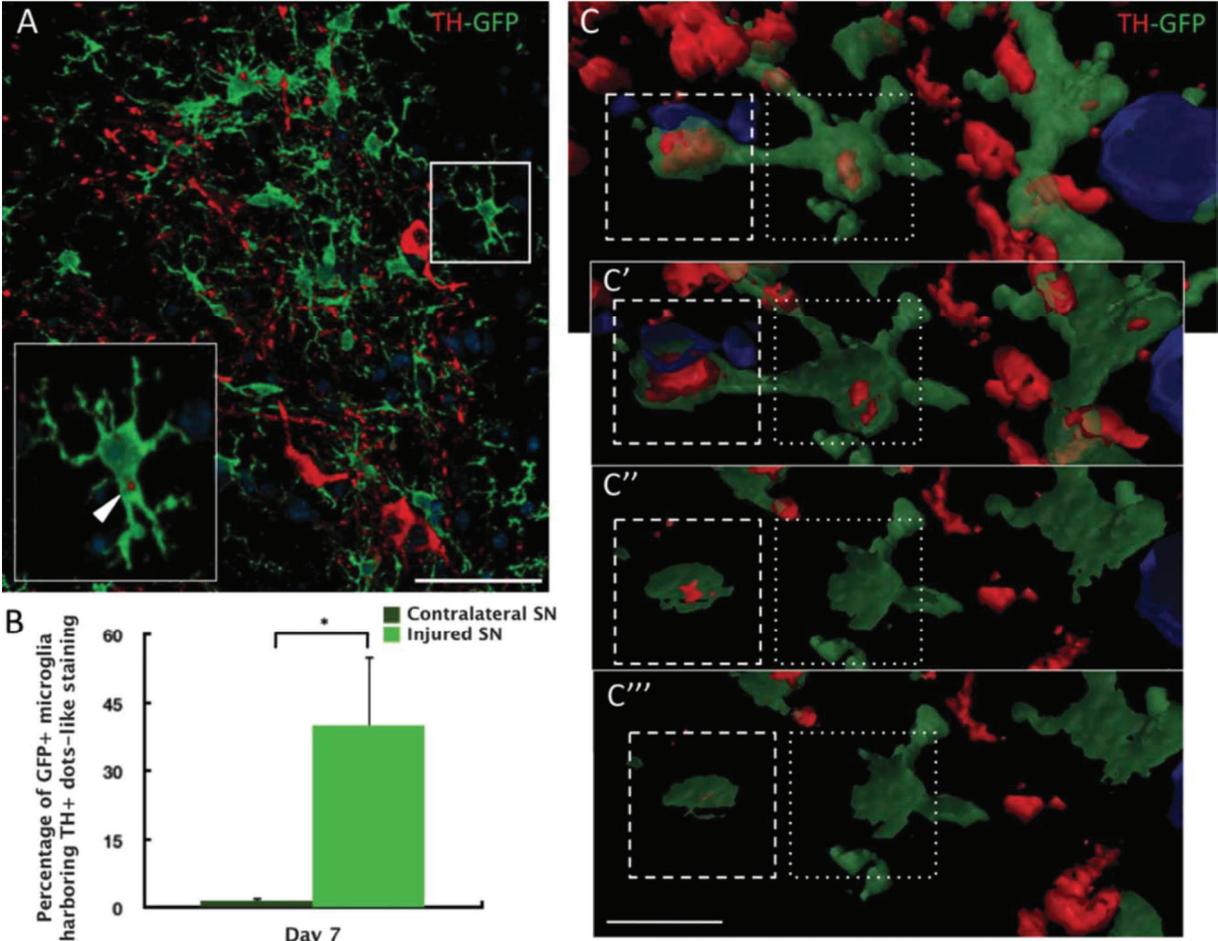
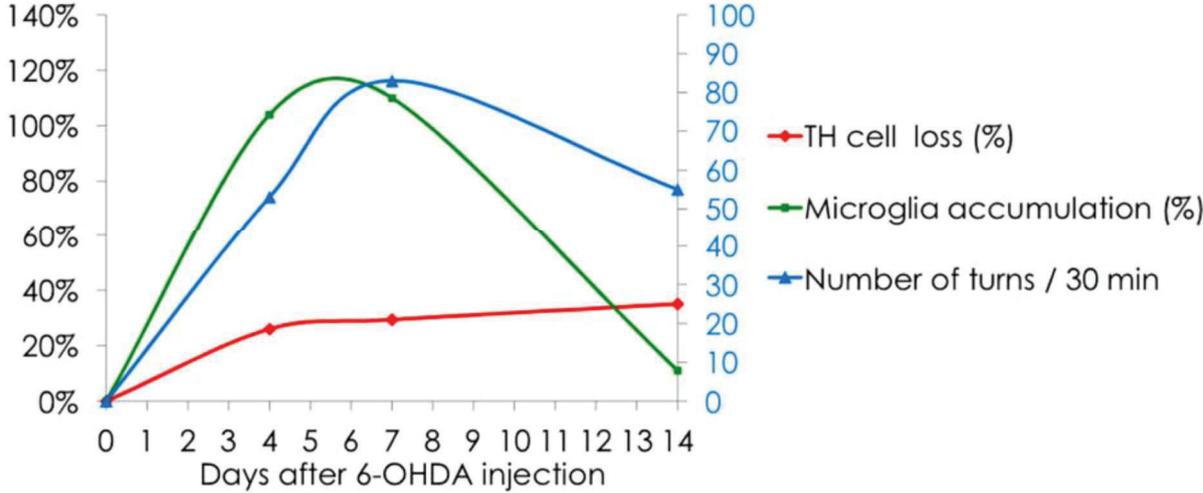
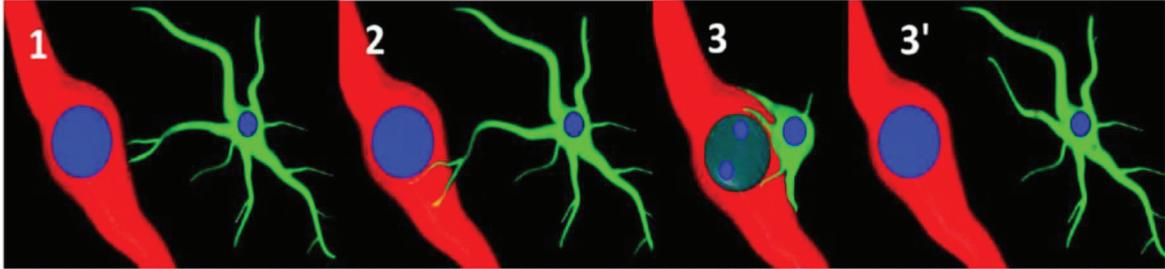


FIGURE 8

A



B



## **II.2. ARTICLE 2**



***T-cell deficient mice are highly susceptible to 6-OHDA-induced dopaminergic neurodegeneration***

**Josselin Uhlrich<sup>1,2</sup>, Yann Leverrier<sup>3</sup>, Chantal Watrin<sup>1</sup>, Gael Malleret<sup>1</sup>, Stéphane Hunot<sup>4,5,6,7</sup>, Laurent Pays<sup>1,2</sup>, Jacqueline Marvel<sup>3</sup>, Monique Touret<sup>\*1,2</sup> and Serge Nataf<sup>\*1,2,8</sup>**

<sup>1</sup> INSERM U1028; CNRS UMR 5292; Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, Lyon, France;

<sup>2</sup> University Lyon 1, Lyon, F-69000, France;

<sup>3</sup> Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U111, CNRS UMR5308, Université Lyon 1, ENS de Lyon, Lyon, F-690007, France

<sup>4</sup> ICM, Paris, France; Sorbonne Universités,

<sup>5</sup>UPMC Université Paris 06, UM 75, ICM, Paris, France;

<sup>6</sup>CNRS, UMR 7225, ICM, Paris, France;

<sup>7</sup>Inserm, U 1127, ICM, Paris, France;

<sup>8</sup> Banque de Cellules et de Tissus, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France ; \* : equal contribution

\*: SN and MT equally contributed to this work

*Corresponding author:* Serge Nataf, Inserm - U 1028 (Equipe Honnorat), Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, Faculté de Médecine RTH LAENNEC – rue Guillaume Paradin, 69372 LYON CEDEX 08. E-Mail : [serge.nataf@inserm.fr](mailto:serge.nataf@inserm.fr)

**Keywords:** Neurodegeneration, Inflammation, 6-OHDA, Microglia, Substantia Nigra, T-cells, IFNAR, Parkinson's disease



## Introduction

Parkinson's disease (PD) is a movement disorder caused by a progressive degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc). As observed in other neurodegenerative conditions, the incidence of PD increases with age, rendering this pathology a substantial burden for health systems and a primary cause of dependence among elderly people. Despite major research efforts developed in the last decades, uncertainties remain regarding the precise pathomechanisms involved in PD and several hypotheses, not necessarily exclusive to each other, are currently put forward to explain dopaminergic neuronal cell death. These include notably oxidative stress (1), mitochondrial dysfunction (2) and the accumulation of misfolded alpha-synuclein (3). Besides these cell-autonomous neuronal mechanisms, it was proposed that the immune environment of neurons could amplify neurodegeneration (4, 5). This process is thought to be essentially mediated by activated microglia and, possibly, by cells of the adaptive immune system, notably T cells (6). Thus, in PD patients, diverse alterations of T-cell populations and/or functions were observed in the peripheral blood (7, 8) and neuropathological analyses demonstrated a mild but significant T-cell infiltration of the SNpc (6, 9). Moreover, in the most widely used model of PD, induced by the systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), several key findings conferred pathogenicity to T cells. This model is characterized by a T-cell driven immune response against a nitrated alpha-synuclein neoantigen (10, 11) and by a robust intra-CNS infiltration by neurotoxic FasL-expressing CD4<sup>+</sup> T cells (6). Accordingly, T-cell deficient mice are partially protected from MPTP-induced neurodegeneration (6). Other studies provided evidence that exogenously-delivered regulatory T cells (Treg cells) could efficiently dampen the activity of

pathogenic T cells in the MPTP model (11, 12). However, in other models of central nervous system (CNS) neurodegeneration, T-cell deficiency was responsible for an amplification of neurodegeneration (13, 14).

In this context, our goal was to further evaluate the role of T cells in the pathophysiology of PD. We first assessed the presence of T-cells in the SNpc of PD patients at different stage of the disease. Then, we evaluated the impact of genetically-determined T-cell deficiency in the model of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced neurodegeneration, an alternative to the MPTP model that present the advantages of specifically targeting nigral dopaminergic neurons, being accompanied by measurable motor behavior alterations and bypassing the possible systemic effects linked to the intraperitoneal injection of MPTP.

## **Methods**

Experimental procedures are described in details in supplemental material and methods. Human samples: paraffin-embedded tissues were provided by the UK Parkinson's Disease Society Tissue Bank. Animals: all animals were acclimated to their environment one week prior to surgery and kept during the entire time of experiments under controlled temperature and humidity with food and water provided ad libitum, with a circadian cycle of light/ dark 12/12 h. Stereotaxy: after xylazine/ketamine (10 and 100 mg/kg, respectively) anesthesia, 2  $\mu$ L of 6-OHDA (4  $\mu$ g/ $\mu$ L, Tocris) were injected into the left striatum using a stereotaxic apparatus. The opposite side was free from injection. Apomorphine-induced rotation test: this test was performed on day 7 following injection of 6-OHDA. Briefly, apomorphine (0.4 mg/kg, Sigma) was injected intraperitoneally (i.p.) and the circling behavior of mice was assessed 20 min following i.p. injections. The number and laterality of rotations

were recorded manually over a period of 30 min. Immunohistochemistry: on day 1, 4 or 7 post-injection, intracardiac perfusion of mice was performed with paraformaldehyde 4% under deep anesthesia. Animals were then euthanized, brains were removed and free-floating sections were processed for immunohistochemistry. Quantitative analysis of T cells, macrophages/microglia and TH<sup>+</sup> neurons: following CD3, CD4, CD8, IBA-1 or TH immunostainings, digital photomicrographs of the SNs ipsilateral and contralateral to the injection site were performed on 15 to 20 immunostained sections covering the largest antero-posterior axis of the SNs. The ratio of TH<sup>+</sup> cells recorded in the SN ipsilateral to the injection site relative to the contralateral side was calculated allowing TH cell loss to be estimated. The surfaces covered by IBA-1 stainings and the numbers of manually-counted CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> cells were indexed to the surfaces of SNs analyzed, using the image analysis software Image J. Statistical analyses: all data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Comparisons between 2 groups or between the ipsi- and contralateral sides were performed with the non-parametric two-tailed Mann–Whitney U test. Comparisons between more than 2 groups were performed with the Wilcoxon signed-rank test followed by the post-hoc Dunn test. Study approval: approval from the Regional Committee for Animal Ethics of Rhone-Alpes was obtained for all animal experiments performed in this study.

## **Results and discussion**

As a first approach, we performed a neuropathological analysis of post-mortem CNS tissue derived from 20 PD patients at different stages of the disease and from 5 age-matched controls. A roughly 6-fold increase of T cell density was observed in the SNpc of PD patients as compared to controls (Figure 1 A and B). Interestingly, no

difference was found between stages III-IV and stages V-VI of the disease, on the basis of Braak classification (15)(Figure 1B). Moreover, although the hippocampus is targeted by the neurodegenerative process at late stages of the disease (15), we did not observe any significant T cell infiltration in this anatomical region (Figure 1C and Supplemental Figure 1). Finally it is worth noting that in the SNpc of PD patients, absolute values of T-cell density remained low (1 to 2 cells/mm<sup>2</sup>) and that close interactions between T cells and neurons were not found in our cases. These data confirm that a low-grade T-cell infiltration develops in the SNpc of PD patients and provide evidences that such a process is region-specific and stage-independent. Our findings suggest that recruitment of T cells might be dictated not only by the neurodegenerative process itself but also by region-specific cues determined by nigral dopaminergic neurons and/or their microenvironment (16, 17).

So far, to our knowledge, *in vivo* evidence for a direct role of T cells in the pathophysiology of PD is exclusively supported by experiments performed in the MPTP model (6, 7, 12, 18, 19). In the present paper, we opted for the 6-OHDA model which present the advantages of a progressive neurodegenerative process being easily quantifiable (by comparisons between injected and control sides) and accompanied by both a robust inflammatory reaction (20) and measurable alterations of motor behavior (21). On the other hand, it has to be noticed that 6-OHDA administration neither trigger the formation of alpha-synuclein aggregates nor the generation of nitrated alpha-synuclein (22). Interestingly, we found that, as observed in post-mortem tissues from PD patients, the intra-parenchymal T-cell infiltration in 6-OHDA mice was of low-grade (1 to 2 T cells/mm<sup>2</sup>; 5 mice/time point analyzed) and was mainly limited to the SNpc (Figure 1 C, D and Supplemental Figure 1). Besides the SNpc, T cells diffusely accumulated in the superficial and penetrating meninges

that associated with the hemisphere ipsilateral to the injection side (Figure 1, C, D). T-cell infiltrates were equally composed of CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells in both the injured SNpc and meninges (Figure 1 C and D). Finally, T-cell infiltration in the SNpc was found to peak on day 4 post-injection, a time point where microglial activation reaches its maximum level in this model (23). To assess the role of T cells in the 6-OHDA model, we used 4 different lines of transgenic or spontaneously mutated mice presenting either pure T-cell deficiencies (Foxn1<sup>nu/nu</sup> mice and CD3 KO mice; n = 11 and n = 3, respectively) or combined B- and T-cell deficiencies (NOD SCID mice and RAG1 KO mice; n = 8 and n = 7, respectively). Immunocompetent mice bearing *ad hoc* genetic backgrounds were used as controls and comprised Foxn1<sup>nu/+</sup> mice (i.e. Foxn1<sup>nu/nu</sup> immunocompetent mice; n = 7), C57BL/6 mice (controls for CD3 KO and RAG1 KO mice; n = 14) and BALB/c mice (controls for NOD SCID mice; n = 6). In all comparisons, we observed that immunodeficient mice consistently presented a significant increase of 6-OHDA induced dopaminergic cell loss (Figure 2 A-D), correlated to the magnitude of motor behavior alterations (Figure 2E, F, H). Thus, as compared to injected control mice, the loss of tyrosine hydroxylase-positive neurons (TH<sup>+</sup> neurons) increased by 209.7% in Foxn1<sup>nu/nu</sup> mice, 121.3% in CD3 KO mice, 86.9% in NOD SCID mice and 41.9% in RAG 1 KO mice (Table 1). Also, motor behavior alterations assessed with the apomorphine rotation test (24) were found to increase by 239.5% in Foxn1<sup>nu/nu</sup> mice, 78.3% in CD3 KO mice and 136% in NOD SCID mice as compared to injected immunocompetent mice (Table 1). The relatively mild increase of TH<sup>+</sup> cell loss observed in 6-OHDA RAG 1 KO mice did not translate into a significant aggravation of motor behavior alterations (Figure 2G). Finally, it is of note that in 6-OHDA Foxn1<sup>nu/nu</sup> mice, we could also demonstrate spontaneous motor behavior alterations using the rotarod test (Supplemental Figure 2). Interestingly, 6-

OHDA-induced neurodegeneration was more pronounced in immunocompromised mice harboring a pure T-cell deficiency (Foxn1<sup>nu/nu</sup> mice and CD3 KO mice) rather than a combined immunodeficiency (RAG1 KO and NOD SCID mice) (Table 1). This result points to a possible pathogenic role of B-cells in the 6-OHDA model and further underscores the complexity of the adaptive immune responses triggered by neurodegeneration. Since robust microglial activation was previously demonstrated and characterized in the murine 6-OHDA model (23), we assessed microglial density in distinct brain areas of immunodeficient *versus* immunocompetent 6-OHDA mice. Using IBA-1 as a pan-macrophages/microglia marker (25), we found that immunodeficient 6-OHDA mice consistently presented a significant increase of macrophages/microglia density in the SNpc (Figure 3 A-D and Supplemental Figure 3). As observed with the loss of TH<sup>+</sup> neurons, this effect was more pronounced in mice harboring a pure T-cell deficiency (Foxn1<sup>nu/nu</sup> mice and CD3 KO mice) than mice with combined immunodeficiency (RAG1 KO and NOD SCID mice) (Table 1). Thus, as compared to control 6-OHDA mice, increased densities of macrophages/microglia reached 143.5% in Foxn1<sup>nu/nu</sup> mice, 74.8% in CD3 KO mice, 28.9% in NOD SCID mice and 24.3% in RAG 1 KO (Table 1). In a majority of injected mice we could also observe, in specific areas of the ventral thalamus, an accumulation of macrophages/microglia that tended to be more pronounced in immunocompromised 6-OHDA mice. While the mechanisms and impact of such an immune reaction remain to be determined, it is worth noting that the ventral thalamus is functionally connected to the SNpc (26) and was previously involved in the pathophysiology of PD (27) .

Microglia-mediated neurotoxicity is a well-recognized process but there is yet no consensus on the precise mechanisms driving microglial activation under distinct

neurodegenerative conditions. Besides neuron-derived signals including fractalkine (4), CD200 (28) and others (29, 30), CNS-infiltrating T cells also instruct microglial cells to express a large array of immune functions that are either beneficial or detrimental to neurons (13, 31). In this view, the finely tuned intra-CNS recruitment of functionally-distinct T-cell populations, notably Tregs versus autoreactive CD4 T cells, is likely to be a major determinant of clinical and neuropathological heterogeneity in animal models of PD and other neurodegenerative diseases (32, 33). Similarly, in PD patients, we propose that inter-individual differences in the kinetics and extent of CNS infiltration by Tregs versus autoreactive CD4 T cells might translate into substantial clinical heterogeneity.

**Acknowledgements:** this work was supported by a grant from “Association France Parkinson” to SN. We thank the Parkinson’s UK brain bank for its continuous support to research.

## References

1. Jenner, P. 2003. Oxidative stress in Parkinson’s disease. *Ann Neurol.* **53** Suppl 3:S26–36; discussion S36–8.
2. Perfeito, R., Cunha-Oliveira, T. and Rego, A.C. 2013. Revisiting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson disease-resemblance to the effect of amphetamine drugs of abuse. *Free Radic Biol Med.* **62**:186–201.
3. Yu, J., Lyubchenko, Y.L. 2009. Early stages for Parkinson’s development: alpha-synuclein misfolding and aggregation. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **4**(1):10–6.

4. Cardona, A.E., et al. 2006. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci.* **9**(7):917–24.
5. Boillée, S., et al. 2006. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science.* **312**(5778):1389–92.
6. Brochard, V., et al. 2009. Infiltration of CD4 + lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J Clin Invest.* **119**(1):182–92.
7. Hutter Saunders, J.A., et al. 2012. CD4+ regulatory and effector/memory T cell subsets profile motor dysfunction in Parkinson's disease. *J Neuroimmune Pharmacol.* **7**(4):927–38.
8. Rosenkranz, D., et al. 2007. Higher frequency of regulatory T cells in the elderly and increased suppressive activity in neurodegeneration. *J Neuroimmunol.* **188**(1-2):117–27.
9. 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**(8):1285–91.
10. Benner, E.J., et al. 2008. Nitrated alpha-synuclein immunity accelerates degeneration of nigral dopaminergic neurons. *PLoS One.* **3**(1):e1376.
11. Reynolds, A.D., et al. 2010. Regulatory T cells attenuate Th17 cell-mediated nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in a model of Parkinson's disease. *J. Immunol.* **184**(5):2261–2271.
12. 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. *J Leukoc Biol.* **82**(5):1083–94.
13. Beers, D.R., Henkel, J.S., Zhao, W., Wang, J. and Appel, SH. 2008. CD4+ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**(40):15558–63.

14. Serpe, C.J., Coers, S., Sanders, V.M. and Jones, K.J. 2003. CD4+ T, but not CD8+ or B, lymphocytes mediate facial motoneuron survival after facial nerve transection. *Brain Behav Immun.* **17**(5):393–402.
15. Braak, H., et al. 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* **24**(2):197–211.
16. 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**(1):151–70.
17. 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 Immunol.* **31**(1):7–17.
18. Liu, J., et al. 2009. Neuromodulatory activities of CD4+CD25+ regulatory T cells in a murine model of HIV-1 associated neurodegeneration. **182**(6):3855–65.
19. Kosloski, L.M., Kosmacek, E.A., Olson, K.E., Mosley, R.L. and Gendelman, H.E. 2013. GM-CSF induces neuroprotective and anti-inflammatory responses in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxicated mice. *J Neuroimmunol.* **265**(1-2):1–10.
20. He, Y., Appel, S. and Le, W. 2001. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain Res.* **909**(1-2):187–93.
21. Heuer, A., Smith, G., Lelos, M.J., Lane, E.L. and Dunnett, S.B. 2012. Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice I: motor impairments identify extent of dopamine depletion at three different lesion sites. *Behav Brain Res.* **228**(1):30–43.
22. Decressac, M., Mattsson, B. and Björklund, A. 2012. Comparison of the behavioural and histological characteristics of the 6-OHDA and  $\alpha$ -synuclein rat models of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* **235**(1):306–15.

23. Virgone-Carlotta, A., et al. 2013. Mapping and kinetics of microglia/neuron cell-to-cell contacts in the 6-OHDA murine model of Parkinson's disease. *Glia*. **61**(10):1645–58.
24. Przedborski, S., et al. 1995. Dose-Dependant lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience*. **67**(3):631–47.
25. Ito, D., et al. 1998. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res*. **57**(1):1–9.
26. Carpenter, M.B., Nakano, K. and Kim, R. 1976. Nigrothalamic projections in the monkey demonstrated by autoradiographic technics. *J Comp Neurol*. **165**(4):401–15.
27. Pedrosa, D.J., et al. 2012. Essential tremor and tremor in Parkinson's disease are associated with distinct “tremor clusters” in the ventral thalamus. *Exp Neurol*. **237**(2):435–43.
28. Hoek, R.M., et al. 2000. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science*. **290**(5497):1768–71.
29. Neumann, H. 2001. Control of Glial Immune Function. *Glia*. **36**:191–199.
30. Linnartz, B. and Neumann, H. 2013. Microglial activatory (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)- and inhibitory (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif)-signaling receptors for recognition of the neuronal glycocalyx. *Glia*. **61**(1):37–46.
31. Kurkowska-Jastrzębska, I., et al. 2013. Neurodegeneration and inflammation in hippocampus in experimental autoimmune encephalomyelitis induced in rats by one-time administration of encephalitogenic T cells. *Neuroscience*. **248**:690–8.
32. Kipnis, J., et al. 2002. Neuroprotective autoimmunity: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells suppress the ability to withstand injury to the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**(24):15620–5.

33. Schwartz, M., Kipnis, J., Rivest, S. and Prat, A. 2013. How do immune cells support and shape the brain in health, disease, and aging? *J Neurosci.* **33**(45):17587–96.



## **Supplemental Methods.**

### ***Human samples.***

Autopsy paraffin-embedded tissue sections were obtained from the UK Parkinson's Disease Society Tissue Bank. Material consisted in sections obtained from the brainstem and the hippocampus of 5 control subjects and 20 Parkinson's disease patients at different neuropathological stages of the Braak classification (Braak *et al.*, 2003b) : 5 at stage III, 5 at stage IV, 5 at stage V and 5 at stage VI. PD patients and control subjects did not differ significantly in terms of their mean age at death or the mean interval from death to the freezing of tissue. The protocol using human postmortem material was examined by the local ethic committee of the "Rhône Alpes Region" and was considered as conform to the French ethic laws.

### ***Animals***

All animals used in this study were female mice aged 10 to 14 weeks old at the time of experiments. C57Bl/6 female mice were obtained from Roger Janvier (Le Genest Saint Isle, France). Forkhead box protein N1 homozygous and heterozygous (*Foxn1<sup>nu</sup>* and *Foxn1<sup>nu/+</sup>*) mice, as well as BALBc and NOD.CB17-*Prkdc<sup>scid</sup>/NCRHsd* (NOD SCID) mice were obtained from Harlan laboratories (Gannat, France). *CD3<sup>-/-</sup>* and recombinaise activating gene 1-deficient (*Rag1*-deficient were obtained from colonies bred at the "École Normale Supérieure de Lyon" (from the INSERM unit U851, team "Apoptosis and CD8 T cells memory" directed by Jacqueline Marvel). Mice were acclimated to their environment one week prior to surgery. During the entire time of experiments, animals were kept under controlled temperature and humidity with food and water provided ad libitum, with a circadian cycle of light/ dark 12/12h.

### ***Stereotaxy***

Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of xylazine/ketamine (10 and 100 mg/kg, respectively). Then, 2µL of 6-OHDA (Tocris) diluted at a concentration of

4µg/µL in 0.02% ascorbic acid were injected into the left striatum (1µL/min) using a stereotaxic apparatus, according to the following coordinates relative to bregma: 20.7 mm anteroposterior, 2 mm lateral, 22.4 mm deep (Meissner et al., 2005). The opposite side was free from injection and served as a negative control for histological analyses (Schober et al., 2004). Moreover, in each experimental group, some control animals received an unilateral intrastriatal injection of 2µL of vehicle solution (ascorbic acid 0.02%, Sigma) as a negative control.

### ***Apomorphine-induced rotation test***

An apomorphine-induced rotation test was performed to assess and quantify functional alterations of the nigrostriatal dopaminergic system in 6-OHDA injected mice, as previously described in 6-OHDA rats (Przedborski et al., 1995). This behavioral test was performed on days 7 following intrastriatal injection of 6-OHDA. Briefly, apomorphine (Sigma; 0.4 mg/kg) was injected intraperitoneally (i.p.) and the circling behavior of mice was then assessed. 20 min following i.p. injections, the number of rotations as well as their laterality (ipsilateral or contralateral to the intrastriatal injection side) was recorded manually over a period of 30 min,. For each group of 6-OHDA injected mice tested and control mice were assessed in parallel.

### ***Rotarod test***

Animals were first trained by progressively accelerating the rotarod velocities from 5 rpm to 44 rpm. over X sessions of 5 mns long. Then, control reference values were obtained by performing for 3 consecutive days 4 sessions separated by 1 hour inter-trial interval. Each session consisted in 7 consecutive 2 mns long trials at respective speeds of 5, 12, 18, 25, 31, 34 and 44 rpm. At each trial, the latency to fall during the observation period was recorded. On the fourth day, mice were injected with 6-OHDA and a new series of tests were performed on day 7 post-injection.

## ***Immunohistology***

For the analysis of human CNS tissue samples, sections deparaffinized by 3 X 5 mins baths in methylcyclohexane were re-hydrated in 100%, 95%, then 75% ethanol and rinsed in distilled water. For CD3 staining, antigen retrieval was performed by heating slides at 90°C–95°C for 30 minutes in citrate buffer, pH 6. Sections were then allowed to cool down for 20 minutes before being rinsed in phosphate buffer saline (PBS). Human sections were pretreated with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, followed by incubation with a blocking solution consisting in PBS–BSA 4% supplemented with 10% normal goat serum and 0.1% Triton. Sections were then incubated overnight at 4°C with anti-CD3 antibody (1:100; Serotec). Following incubation with a biotin-conjugated secondary antibody (1:1000; Molecular Probes), staining was visualized using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) as a peroxidase substrate and the ABC kit from Vector Laboratories. For the analysis of murine CNS tissue samples, 14-mm-thick brain coronal sections were performed and free-floating sections crossing the SNpc and the thalamus processed for immunohistochemistry. Briefly, following incubation in blocking solution for one hour at room temperature, slices were incubated overnight at 4°C with either an anti-TH (1:1000; Millipore) and/or IBA1 (1:500; Wako), CD4 (1:100; Pharmingen) or CD8 (1:100; Pharmingen) antibody. Slices were then rinsed in PBS and incubated for one hour at room temperature with Alexa fluor 555-conjugated goat anti-mouse antibody (1:1000; Molecular Probes), Alexa fluor 488-conjugated goat anti-rat antibody (1:1000; Molecular probes) or biotinylated goat anti-rabbit antibody (1:700; Molecular Probes). Slices treated by biotinylated antibody were rinsed in PBS and incubated for one hour at room temperature with Alexa fluor 488-conjugated streptavidin (1:700; Molecular Probes). Finally, coloration with DAPI (40,60-diamidino-2-phenylindole) was performed to visualize nuclei and slices were mounted on gelatinized slides before examination on an optical or confocal fluorescence microscope (Zeiss Axioplan II).

### ***Quantitative analysis of CD3<sup>+</sup> cell density in human CNS tissue sections***

CD3<sup>+</sup> cells were counted manually on digital micrographs of the SNpc or hippocampus obtained from 2 immunostained sections. Using the image analysis

software Image J®, the number of CD3<sup>+</sup> cells relative to the surface analyzed was then calculated in the SNpc and in the hippocampus of PD patients versus control subject. Results are expressed as the mean density/mm<sup>2</sup> +/- standard error of the mean (SEM).

### ***Quantitative analysis of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and TH<sup>+</sup> cell densities in the brain of 6-OHDA mice***

For each animal examined, TH<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> cells were counted manually on digital micrographs of 7 to 11 immunostained sections crossing the SNpc or the hippocampus. Sections covered the largest antero-posterior axis of the analyzed histological structures as determined by the atlas of Paxinos and Franklin. The ratio of TH<sup>+</sup> cells ipsilateral to the injection site, relative to the contralateral side was determined, allowing a % of cell loss to be established. Results are expressed as the mean % of TH<sup>+</sup> cell loss +/- SEM. Absolute numbers of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> cells were recorded in the meninges ipsilateral to the injection side and contralateral to the injection side. Results are expressed as the mean numbers of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> cells +/- SEM. Finally, using the image analysis software Image J®, the number of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> cells relative to the surface analyzed was calculated in the SNpc and in the hippocampus ipsilateral and contralateral to the injection side. Results are expressed as the mean density/mm<sup>2</sup> +/- standard error of the mean (SEM).

### ***Quantitative analysis of microglial density***

For the quantification of IBA1 microglial density, SNpc sections were double-labeled with anti-TH and anti-IBA1 antibodies and quantified using Image J® analysis software. For all sections analyzed, quantification was performed in nine fields covering distinct regions of the SNpc. A region of interest (ROI) was first defined and measured in each area analyzed (mean surface area 5 0.056 mm<sup>2</sup>), of the injured and opposite SNpc. Surfaces covered by IBA1 were then automatically detected after setting of a threshold. Finally, the area of IBA1 immunostaining was indexed to the total area covered by the ROI, allowing thus a IBA1 microglial density to be estimated.

### ***Statistical analysis***

All data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Comparisons were performed using a non-parametric two-tailed Mann–Whitney U test. or, for the rotarod test, with a Wilcoxon signed-rank test and a *post-hoc* Dunn test.

### ***Study approval***

Approval from the Regional Committee for Animal Ethics of Rhone-Alpes was obtained for all animal experiments performed in this study.



## Figure Legends

### Figure 1: Lymphocyte infiltration in the brains of Parkinson's disease patients and 6-OHDA mice.

(A) Representative SNpc sections showing neuromelanin-containing DNs and CD3-positive T lymphocytes (arrow and insert). Scale bars: 100  $\mu\text{m}$ ; 25  $\mu\text{m}$  (inset). (B) Density of infiltrated CD3-positive T cells in the SNpc (left panel) and hippocampus (right panel) of Parkinson's disease patients ( $n=20$ ) and age-matched control subjects ( $n=5$ ). Differences are significant when comparing Braak 3-4 Parkinson's disease patients ( $n=10$ ) versus controls ( $*P < 0.05$ ) or Braak 5-6 PD Parkinson's disease patients ( $n=10$ ) vs controls ( $\#P < 0.05$ ) but not Braak 3-4 vs Braak 5-6 Parkinson's disease patients. (C) Representative photomicrographs of CD4 (upper panels) or CD8 (lower panels) immunostainings observed in the SNpc (left panels) and meninges (right panels) ipsilateral to the injection side in 6-OHDA C57Bl/6 mice. Scale bars: 100  $\mu\text{m}$ ; 25  $\mu\text{m}$  (inserts). (D) Densities of infiltrating CD4+ (upper panels) or CD8+ T cells (lower panels) in the SNpc (left panels) and meninges (right panels) ipsilateral or controlateral to the injected side in 6-OHDA C57Bl/6 mice.  $*P < 0.05$  and  $***P < 0.001$  when comparing the injured SNpc versus the controlateral SNpc;  $\#P < 0.05$  and  $###P < 0.001$ , when comparing the meninges ipsilateral to the injection side vs controlateral side.

### Figure 2: Increased neuronal cell loss and motor behavioral alterations in T-cell deficient 6-OHDA mice.

(A-D), Representative photomicrographs of TH<sup>+</sup> neurons in the injured SNpc of control 6-OHDA mice (left panels) vs immunodeficient 6-OHDA mice (middle panels). Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ . Quantification of TH<sup>+</sup> cell loss in the SNpc of the corresponding 6-OHDA mice are shown in right panels.  $**P < 0.01$  and  $***P < 0.001$  when comparing 6-OHDA immunodeficient mice vs 6-OHDA immunocompetent mice. (E-H) Quantification of motor behavior alterations observed in immunodeficient vs

immunocompetent 6-OHDA mice as assessed using the Apomorphine-induced rotation test. \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$  when comparing 6-OHDA immunodeficient mice vs 6-OHDA immunocompetent mice.

**Figure 3: Increased accumulation of macrophages/microglia in the SNpc of T-cell deficient 6-OHDA mice.**

(A-D) Representative photomicrographs of Iba1+ macrophages/microglia in the injured SNpc of control 6-OHDA mice (left panels) vs immunodeficient 6-OHDA mice (middle panels). Scale bar: 100  $\mu\text{m}$  (25  $\mu\text{m}$  for inserts). Quantification of Iba1+ macrophages/microglia densities in the SNpc of the corresponding 6-OHDA mice are shown in right panels. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  when comparing 6-OHDA immunodeficient mice vs 6-OHDA immunocompetent mice.

**Table 1: Impact of distinct genetically-determined immunodeficiencies on dopaminergic cell loss, motor behavior alterations and macrophages/microglia accumulation in the 6-OHDA model.**

Results are expressed as increased % as compared to control mice consisting in *Foxn1<sup>nu/+</sup>* mice (n = 7) for nude mice, C57BL/6 wild type mice (n = 14) for CD3 KO or RAG1 KO mice and Balbc mice (n = 6) for NOD SCID mice.

**Supplemental Figure 1: Lack of significant T-cell infiltration in the hippocampus of 6-OHDA mice.**

In 6-OHDA C57Bl/6 mice, densities of infiltrating CD4+ (upper panel) or CD8+ (lower panel) T cells in the hippocampus ipsilateral to the injection side are equal or close to 0. Similar results are obtained when examining the controlateral side. \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$ , when comparing SNpc versus hippocampus in the hemispheres and brainstems ipsilateral to the injection side.

**Supplemental Figure 2: Spontaneous motor behavior alterations in 6-OHDA nude mice.**

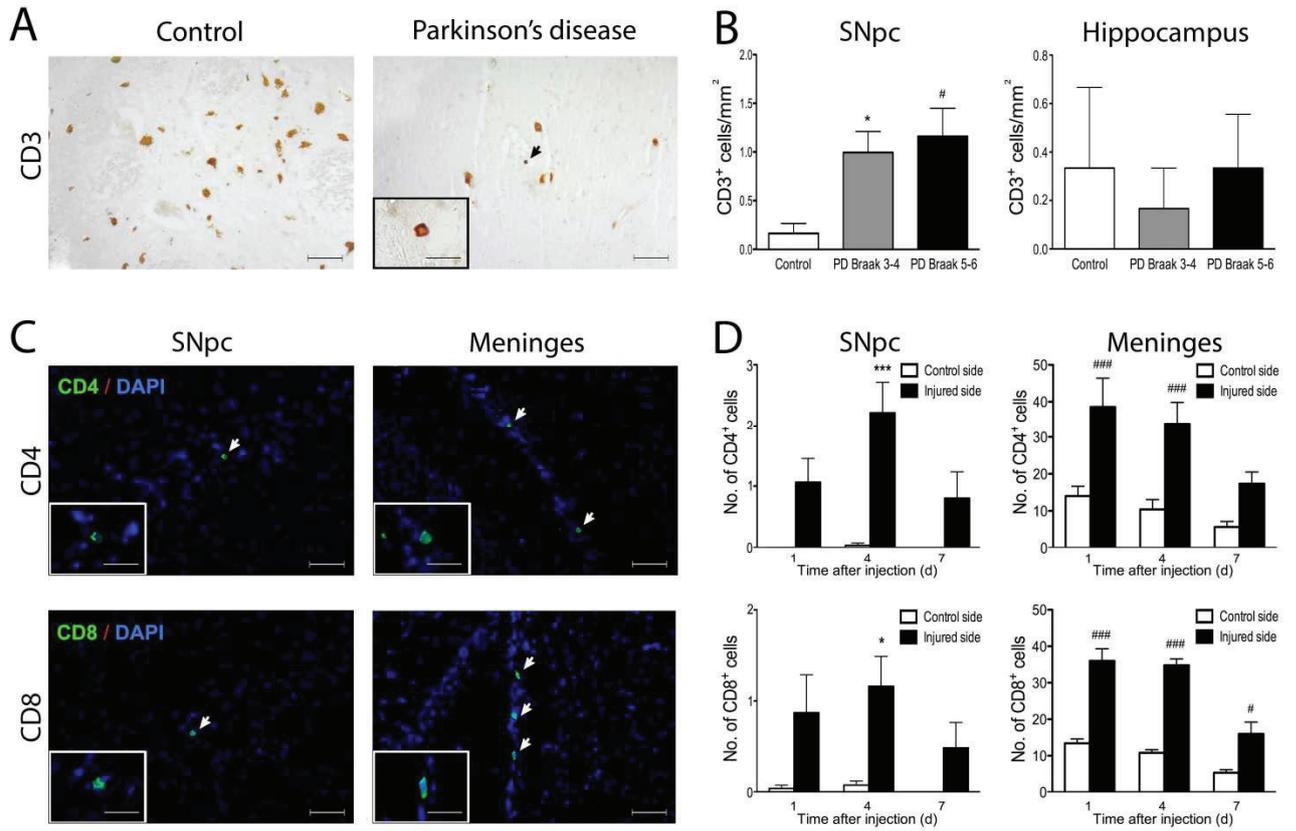
In the rotarod test, no difference in latencies to fall (expressed in seconds) was observed between 6-OHDA and control C57Bl/6 mice (left panel). In contrast, performances were significantly altered in 6-OHDA nude mice as compared to control immunocompetent 6-OHDA mice or nude non-injured mice. \*P < 0.05 when comparing 6-OHDA-*Foxn1*<sup>nu</sup> mice versus control *Foxn1*<sup>nu</sup> or 6-OHDA-*Foxn1*<sup>nu/+</sup> mice. #P < 0.05 when comparing 6-OHDA-*Foxn1*<sup>nu</sup> mice versus 6-OHDA-*Foxn1*<sup>nu/+</sup> mice.

**Supplemental Figure 3: Increased accumulation of macrophages/microglia in the thalamus of 6-OHDA immunodeficient mice.**

Representative mosaic views of Iba1-immunostained sections of the thalamus ipsilateral to the injection side in 6-OHDA immunodeficient or immunocompetent mice. Iba+ staining is represented by white dots.



**FIGURE 1**



**FIGURE 2**

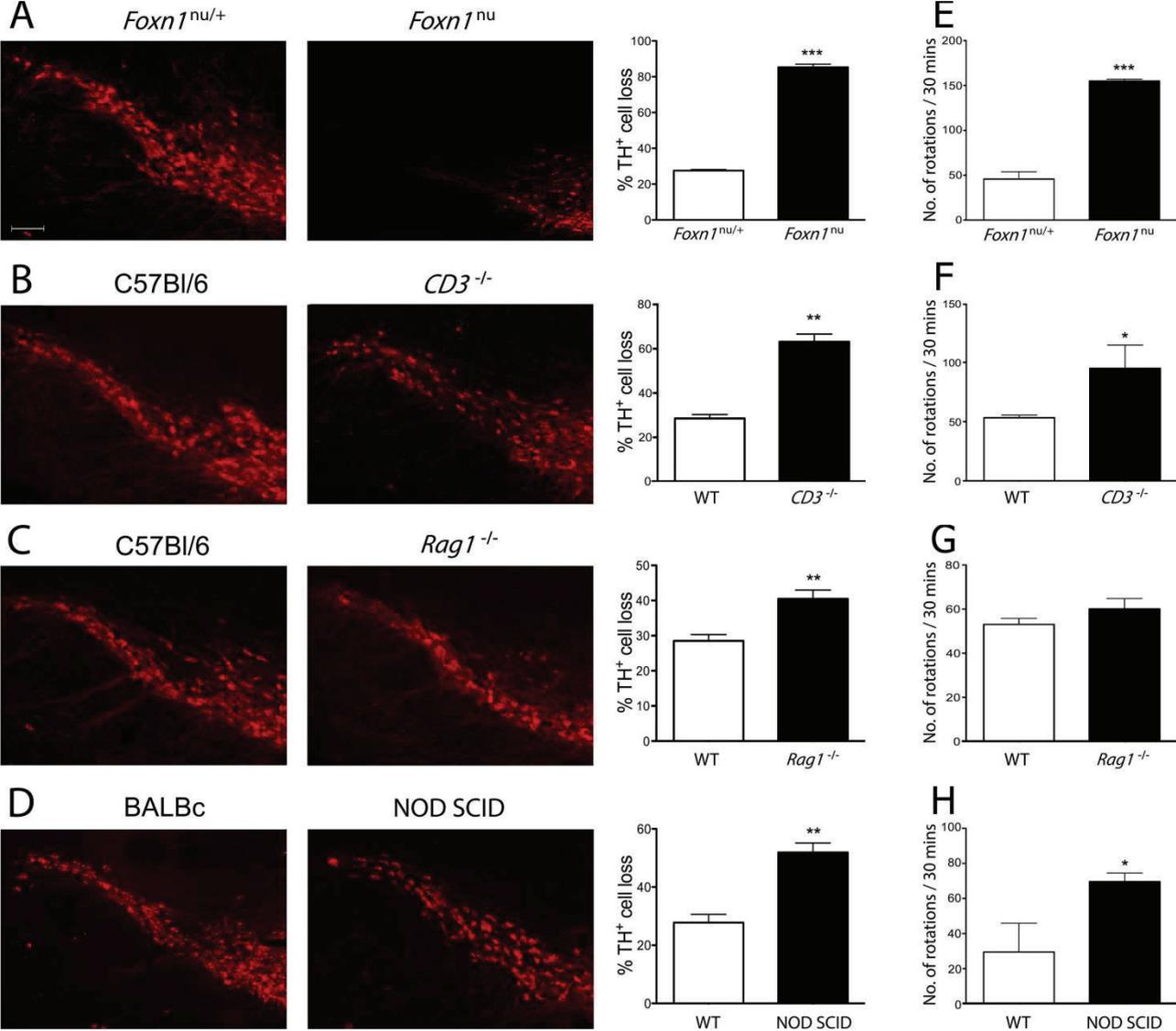
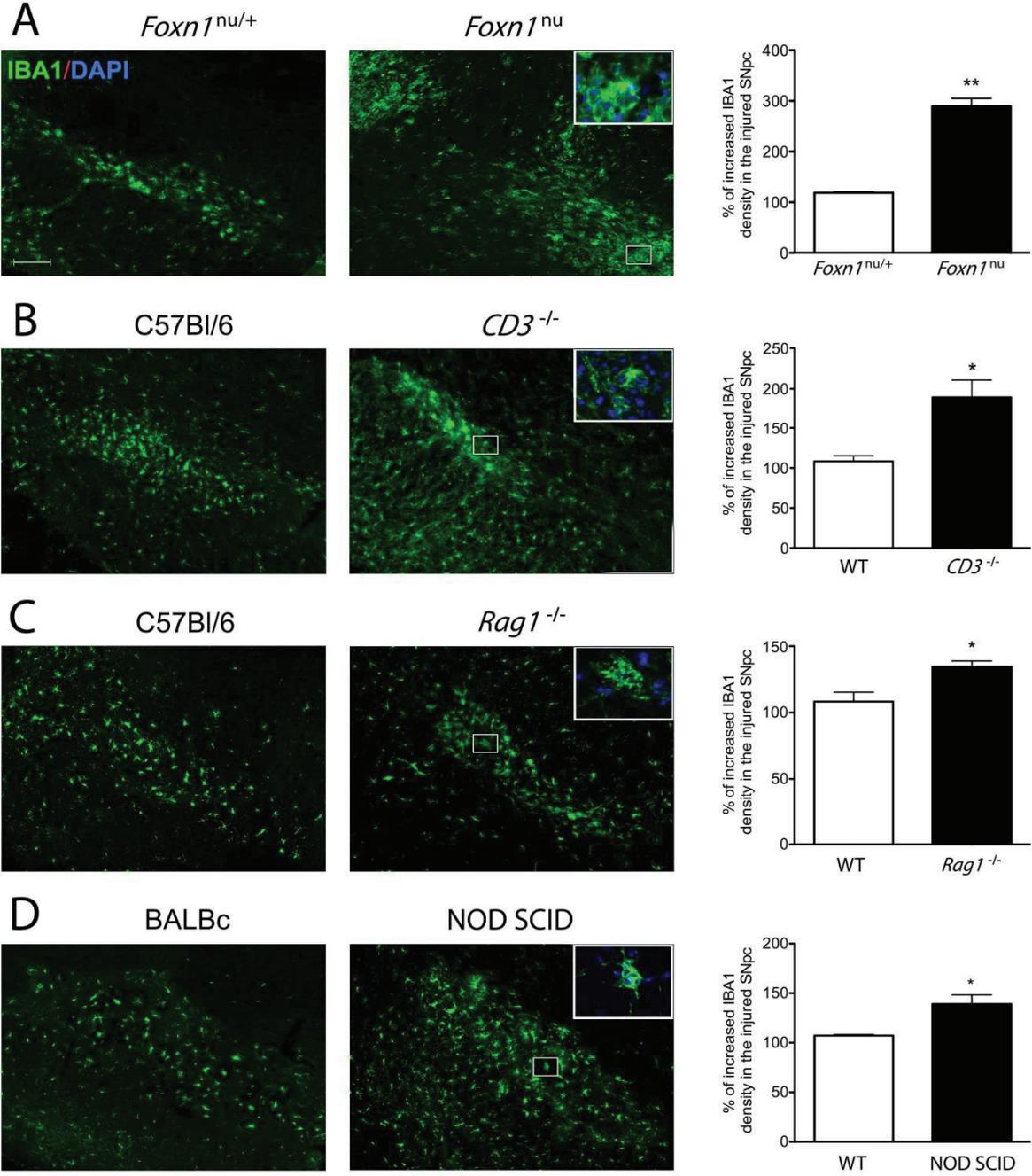


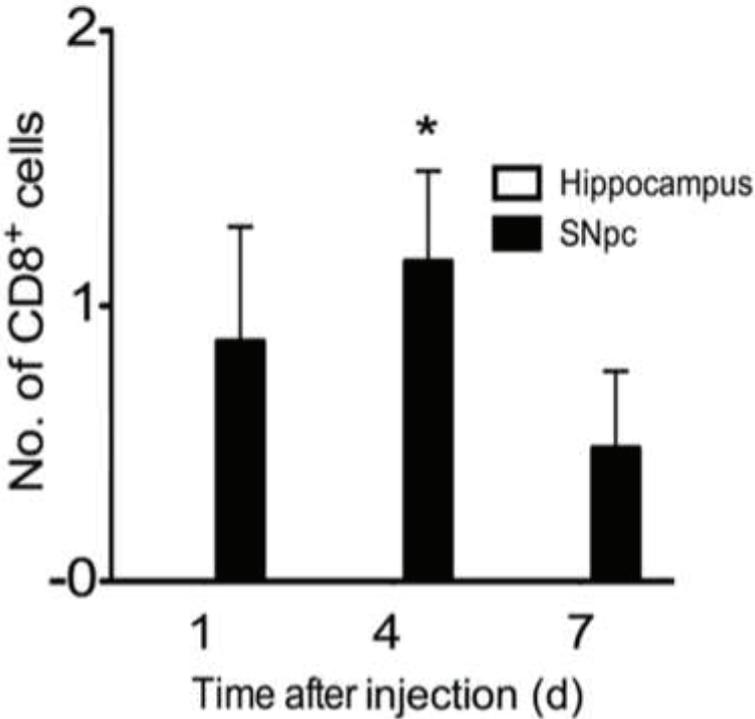
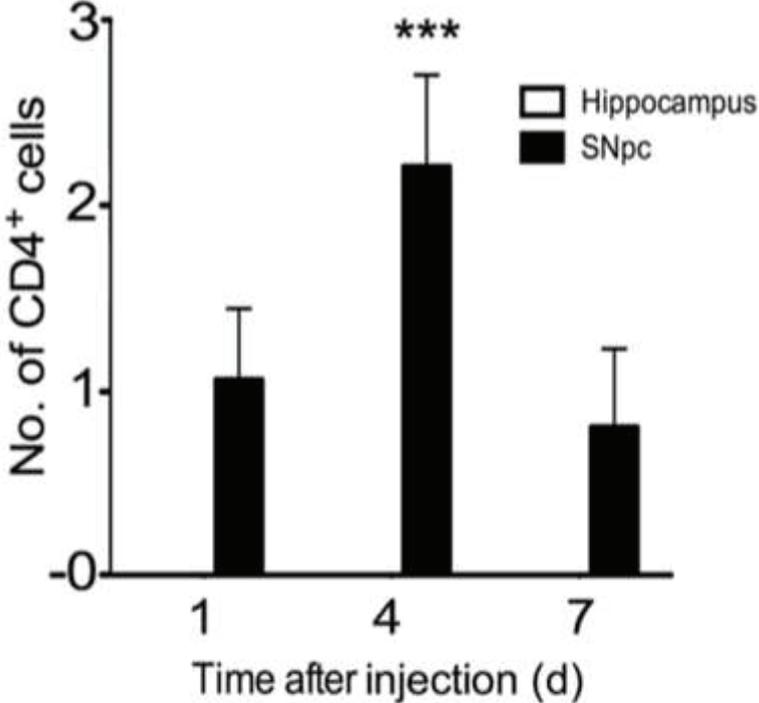
FIGURE 3



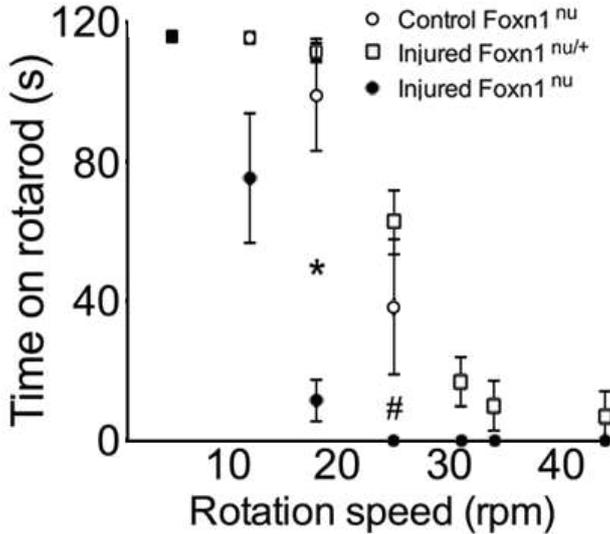
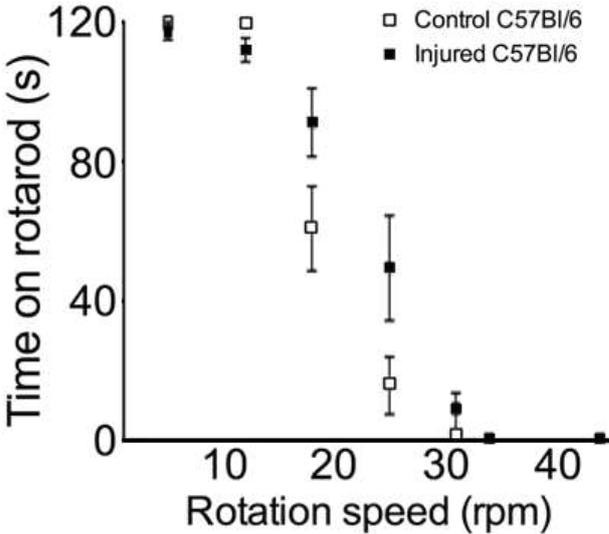
**TABLE 1**

	<b>Foxn1<sup>-/-</sup></b> <b>(n = 11)</b>	<b>CD3<sup>-/-</sup></b> <b>(n = 3)</b>	<b>Rag1<sup>-/-</sup></b> <b>(n = 10)</b>	<b>NOD SCID</b> <b>(n = 8)</b>
<b>Immunodeficiency</b>	T cells	T cells	T cells B cells	T cells B cells NK cells
<b>dopaminergic cell loss</b>	+209.7%	+121.3%	+41.9%	+86.9%
<b>motor behavior alterations</b>	+239.5%	+78.3%	+12.8%	+136%
<b>macrophages/microglia</b>	+143.5%	+74.8%	+24.3%	+28.9%

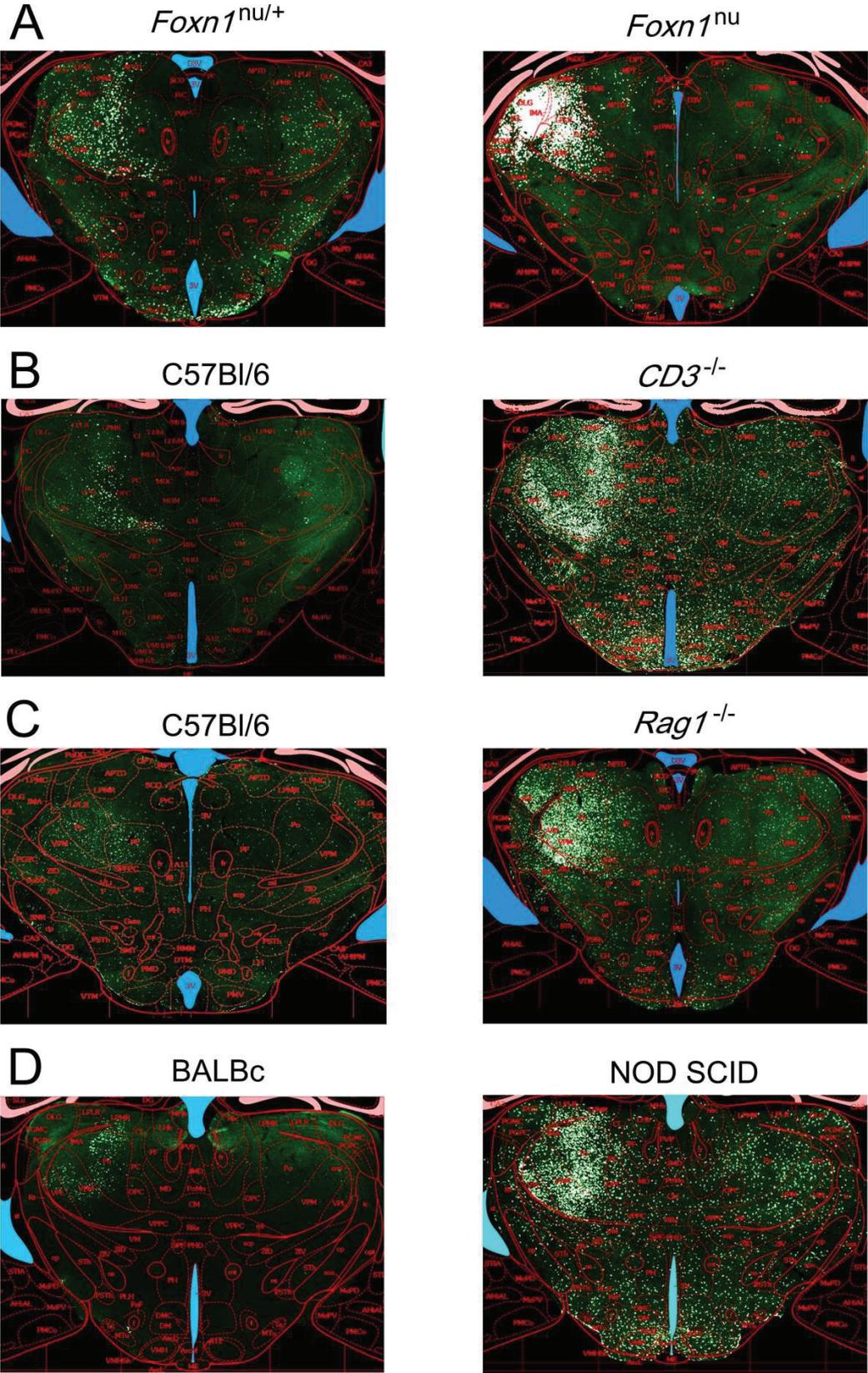
SUPPLEMENTAL FIGURE 1



SUPPLEMENTAL FIGURE 2



SUPPLEMENTAL FIGURE 3



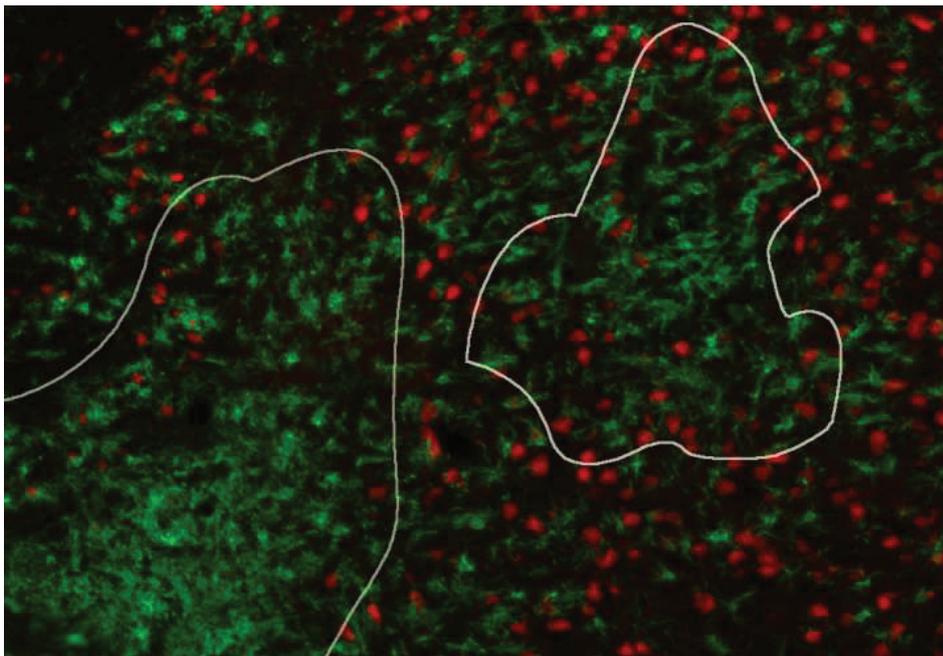


## II.3. Résultats complémentaires

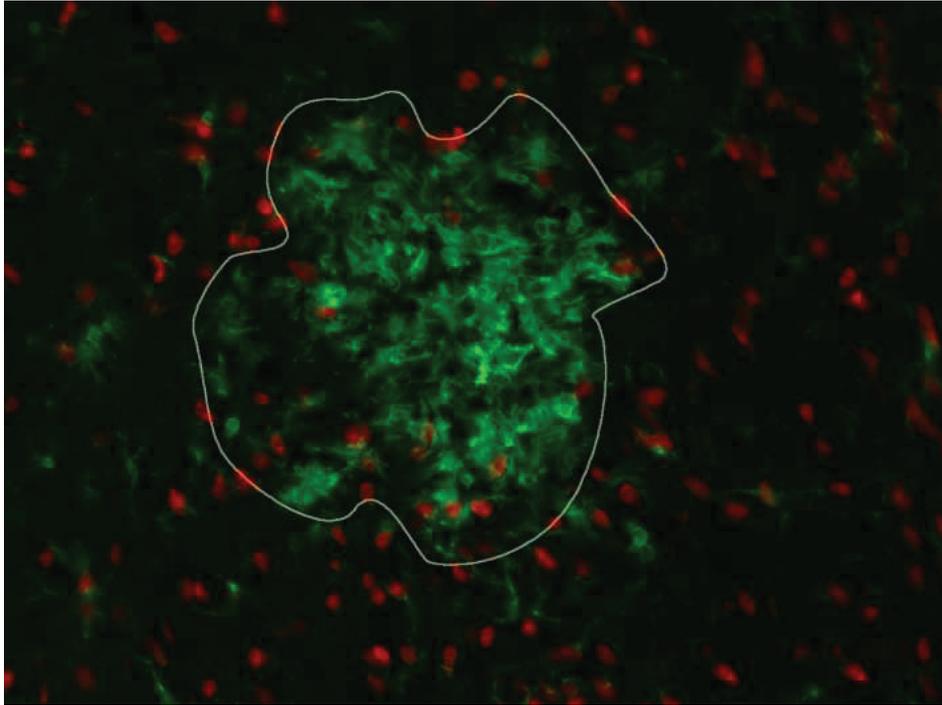
Afin de compléter nos données et de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le contrôle de l'activation microgliale, et ses conséquences, nous allons présenter quelques résultats complémentaires relatifs à la neurodégénérescence et l'inflammation dans notre modèle murin 6-OHDA.

Nous avons mis en évidence une densité microgliale plus élevée dans le thalamus des souris lésées par la 6-OHDA que dans celui des souris immunocompétentes. De ce fait nous avons voulu déterminer si une perte neuronale était associée/présente dans cette structure. Nous avons donc effectué, chez les souris immunodéficientes seulement, un double marquage, NeuN (Hexaribonucleotide Binding Protein-3, marqueur nucléaire des neurones) et IBA1, en immunohistochimie. Ainsi, nous avons observé une importante diminution de la densité de marquage NeuN dans le thalamus des animaux. De manière intéressante, cette diminution de densité était limitée aux zones de plus forte densité de marquage IBA1.

Ces données sont illustrées par les deux photographies suivantes, prises au microscope à fluorescence, dans le thalamus d'une souris *Rag1<sup>-/-</sup>* et *Foxn1<sup>-/-</sup>* respectivement. Les zones d'intérêt ont été délimitées par un trait blanc.



*Rag1<sup>-/-</sup>*

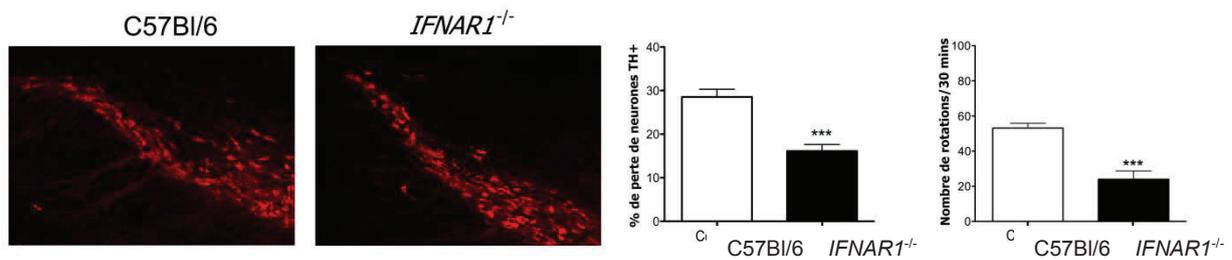


***Foxn1<sup>-/-</sup>***

Nous pouvons constater que la densité de marquage NeuN (en rouge) est moins importante dans les zones à plus forte densité de marquage IBA1 (en vert).

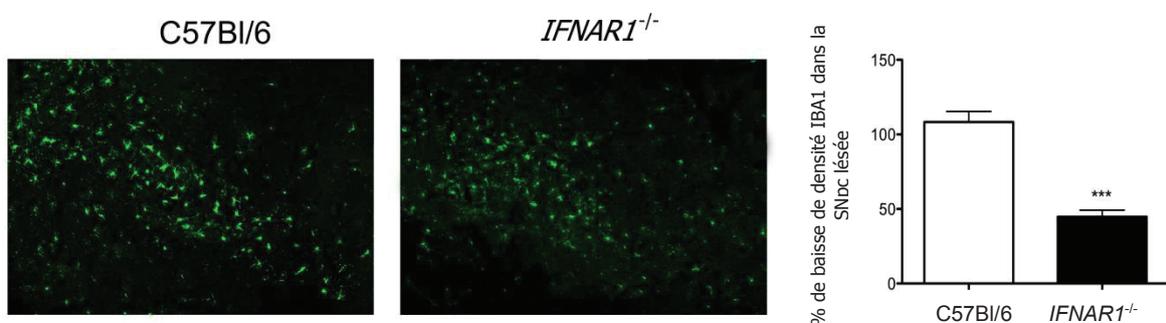
Du fait de l'apparition de syndromes parkinsoniens chez certains patients de l'hépatite B traités à l'IFN- $\alpha$ , et chez certaines personnes atteintes de lupus érythémateux produisant de plus grandes quantités de cette cytokines, nous avons voulu étudier le rôle joué par l'interaction entre le récepteur à l'interféron de classe I (*IFNAR*) avec son ligand sur les processus de neurodégénérescence dans notre modèle murin de MP chez 7 souris (10-12 semaines) Knock-Out pour le gène codant pour le récepteur *IFNAR* (souris *IFNAR<sup>-/-</sup>*) et 11 souris C57Bl/6 du même âge comme contrôles. De manière très intéressante, nous avons pu observer une diminution de sensibilité à la toxine de la part des souris 6-OHDA *IFNAR<sup>-/-</sup>*. En effet, la perte-des neurones dopaminergiques de la SNpc, révélés par un marquage immunohistochimique de la TH, est de  $16.1\% \pm 1.5\%$  chez les souris *IFNAR<sup>-/-</sup>* alors qu'elle est de  $28.5\% \pm 1.6\%$  chez les souris 6-OHDA C57Bl/6. De même, les troubles moteurs, après injection d'apomorphine montrent une diminution du nombre de rotations induites du côté opposé à la lésion soit  $24 \pm 3.7$  en 30 minutes pour les souris KO et  $53 \pm 3$  dans le même laps de temps chez les souris contrôles.

Ces résultats sont synthétisés dans la figure suivante :



Ces photographies prises en microscopie à fluorescence, révèlent la perte de neurones dopaminergiques TH<sup>+</sup> (en rouge). Sur le graphique de gauche, la quantification des neurones TH montre une diminution significative de la perte chez les souris *IFNAR1*<sup>-/-</sup>. De même, sur le graphique de droite, le nombre de rotations induites par injection d'apomorphine est diminué chez les souris *IFNAR1*<sup>-/-</sup>.

D'autre part, nous avons montré grâce au marquage immunohistochimique IBA1 que la densité correspondant à la microglie dans la SN est plus faible chez les souris *IFNAR1*<sup>-/-</sup> lésées (44.7% ± 4.5%), que chez les souris contrôles lésées (108.37% ± 5.6%). Ces résultats sont synthétisés dans la figure suivante.



Ces photographies prises en microscopie à fluorescence révèlent en vert la microglie grâce à un anticorps anti-IBA1, La densité du marquage est environ 2 fois moins importante chez les souris *IFNAR1*<sup>-/-</sup> que chez les souris C57Bl/6 (graphique).

Ces résultats complémentaires ouvrent deux questions nécessitant des travaux ultérieurs plus approfondis : quel est le rôle de l'activation microgliale dans la neurodégénérescence de notre modèle, et, est-ce qu'un tel rôle est médié par le signal de danger que constitue l'interaction de l'IFN de classe I avec son récepteur, IFNAR, et l'étude des mécanismes moléculaires qui pourraient en découler.



### **III. DISCUSSION GÉNÉRALE ET** **PERSPECTIVES**



Les maladies neurodégénératives sont caractérisées par une perte neuronale chronique et progressive touchant des populations neuronales spécifiques à chaque pathologie. L'ensemble de ces processus neurodégénératifs a longtemps été mis sur le compte de mécanismes intrinsèques au neurone conduisant à une mort cellulaire dite « autonome » c'est à dire sans lien avec l'environnement neuronal.

Cependant, la notion de mort cellulaire non autonome a par la suite émergé avec la mise en évidence du rôle majeur exercé par les cellules microgliales (Boillée, Vande Velde & Cleveland, 2006a; Boillée *et al.*, 2006b).

Au sein du SNC, comme nous l'avons vu, la cellule microgliale constitue la seule cellule gliale authentiquement immune et dont la réactivité à une grande variété de stimuli permet d'assurer les fonctions de sentinelle immunitaire pour les autres populations cellulaires du SNC et en particulier les neurones. Cette faculté unique de la microglie à réagir très rapidement à un large éventail de signaux est une difficulté à l'interprétation du rôle exercé par l'« activation microgliale » observée dans la quasi-totalité des pathologies du SNC. A la fin des années 80, la mise en évidence d'une activation microgliale morphologique et phénotypique dans les tissus dérivants de patients Alzheimer (McGeer *et al.*, 1987) puis, d'autres pathologies neurodégénératives (McGeer *et al.*, 1988a; McGeer, Itagaki & McGeer, 1988b) ont été le point de départ d'un long cheminement scientifique conduisant aujourd'hui à conférer un rôle majeur aux cellules microgliales dans les processus neurodégénératifs (Schwartz *et al.*, 2006).

Afin de clarifier le propos, et dans la mesure où la notion même d'activation en ce qui concerne la microglie est aujourd'hui source de débats (Napoli & Neumann, 2009; Tremblay & Majewska, 2011; Derecki, Cronk & Kipnis, 2013), nous utiliserons le terme « microglie activée » pour désigner tout type de cellule microgliale ayant engagé un processus d'activation conduisant à des changements morphologiques patents, sans préjuger du profil moléculaire de cette cellule.

Bien que la microglie s'« active » au cours du vieillissement normal, bien que certains auteurs proposent qu'elle dégénère (Miller & Streit, 2007), l'activation microgliale dans les pathologies neurodégénératives est un phénomène distinct qui néanmoins se surajoute et possiblement se potentialise avec l'activation liée à l'âge. De ce fait, la question de savoir si cette activation microgliale survient en amont ou

en aval de la mort des neurones reste d'un abord difficile au plan expérimental et est encore aujourd'hui débattue.

Dans notre étude, nous démontrons la présence de microglie activée au niveau de la SN des souris lésées par la 6-OHDA avec un pic précédant le pic de mort cellulaire (article1). Bien qu'aucune donnée ne soit disponible chez le patient parkinsonien sur la cinétique de l'activation microgliale, nos résultats chez l'animal attribuent un rôle physiopathologique à l'activation microgliale et aux interactions physiques entre microglie activée et neurones dopaminergiques. Chez les souris KO pour la molécule myéloïde DAP12, la diminution constitutive de la densité microgliale s'accompagne d'une diminution majeure de l'activation microgliale et de la perte neuronale d'environ 1/3 dans le modèle 6-OHDA. L'activation microgliale induirait donc une amplification de la perte neuronale de la même façon qu'au cours de pathologies primitivement neuro-inflammatoires, comme la SEP, l'activation microgliale est impliquée dans l'atteinte axono-myélinique, (Banati et al., 2000; Peterson, Bö, Mörk, Chang, & Trapp, 2001). Il apparaît toutefois qu'il est difficile d'attribuer à la microglie un rôle spécifique et univoque quelle que soit la pathologie neurodégénérative considérée. Les aspects qualitatifs, de localisation ou de timing s'avèrent déterminants dans les conséquences de l'« activation » microgliale sur le devenir des lésions neuronales. La grande plasticité fonctionnelle des cellules microgliales est actuellement reconnue et fait l'objet d'intenses recherches visant à identifier les signaux moléculaires régissant cette plasticité et constituant autant de cibles thérapeutiques adaptées à chaque pathologie neurodégénérative et, possiblement, chaque stade évolutif de ces pathologies (Schwartz *et al.*, 2006; Ransohoff & Perry, 2009; Gomez-Nicola & Perry, 2014). La notion de cinétique de l'activation microgliale mérite que l'on s'y attarde plus spécifiquement. Au vu des données de la littérature et de nos résultats, on peut émettre l'hypothèse que dans la modèle 6-OHDA, la microglie revêt un phénotype modulateur/protecteur au début de l'activation microgliale, et délétère par la suite. Ainsi, l'activation microgliale prend place à un moment où la perte des cellules neuronales au cours du processus de neurodégénérescence n'est pas encore significative, et où nous supposons que le plus de facteurs neurotrophiques sont produits par les neurones et par la microglie. Au cours du temps, probablement instruites par des molécules libérées par les neurones mourants ou morts, les cellules microgliales suivraient un tournant fonctionnel et exerceraient une activité

pro-inflammatoire visant à éliminer les débris cellulaires, ce qui augmenterait le phénomène de neurodégénérescence.

Cette hypothèse nécessite des analyses plus approfondies, notamment au plan moléculaire, afin de déterminer de manière plus précise la cinétique d'activation de la microglie, ainsi que les phénotypes pro- ou anti-inflammatoires qui y sont associés. Si cette hypothèse se confirmait, les résultats pourraient autoriser le design de thérapies visant à accroître l'activation microgliale aux temps précoces de la perte neuronale et à la freiner aux temps tardifs.

L'activation microgliale peut aussi influencer sur la fonction neuronale plus que la survie neuronale à proprement parler. Il a été montré chez l'homme et l'animal qu'une perturbation du métabolisme des astrocytes ou des neurones pouvait être induite par la microglie activée (Nicholas, Compston & Brown, 2001; Jurcovicova, 2014).

D'autre part, en condition pathologique, l'activation-microgliale jouerait un rôle tantôt bénéfique tantôt délétère sur la plasticité synaptique sans incidence sur la survie des neurones (Banati, 2002; Ho *et al.*, 2005; Stephan, Barres & Stevens, 2012). On peut donc émettre l'hypothèse que l'activation microgliale pourrait favoriser ou au contraire inhiber les phénomènes de compensation fonctionnelle liés à la création de nouvelles synapses. Ainsi, les neurones lésés, en constituant de nouveaux réseaux, pourraient rester ou non fonctionnellement actifs selon le niveau et la nature de l'activation microgliale.

En résumé, le rôle de la microglie activée en condition pathologique dans le SNC est encore loin d'être totalement connu. Qui plus est, l'hypothèse non-autonome des processus de neurodégénération amène logiquement à penser que la microglie est elle aussi influencée par son environnement extérieur.

Dans notre étude (article 2), nous avons montré la présence de LyT dans la SN des tissus autopsiques dérivant de patients atteints de MP. Il est intéressant de noter qu'une infiltration de LyT a été rapportée dans plusieurs pathologies neurodégénératives (la SLA, la MP et, dans une moindre mesure, la maladie d'Alzheimer ) mais que les aspects quantitatifs et qualitatifs de cette infiltration sont significativement différents selon la pathologie considérée (McGeer *et al.*, 1988a; Wucherpfennig & Strominger, 1995; Togo *et al.*, 2002; Holmøy, 2008; Brochard *et al.*, 2009). Ces données indiquent que l'infiltration de LyT dans le SNC n'est pas un phénomène induit par la neurodégénérescence en général mais seulement par des

mécanismes neurodégénératifs spécifiques et/ou par des signaux émis par des populations neuronales spécifiques ciblées par le processus neurodégénératif. En faveur de cette hypothèse, notons que nous avons observé la présence de LyT dans la SN des patients parkinsoniens et non pas dans l'hippocampe, indiquant une spécificité topographique du recrutement intracérébral de LyT. Ces données sont en adéquation avec le fait que la SN est une structure cible de la neurodégénérescence et l'une des premières atteintes lors de la phase symptomatique de la pathologie (Braak et al., 2003). Néanmoins, il faut rappeler que l'hippocampe, de même que d'autres structures, sont également ciblées par le processus neurodégénératif au cours de la MP aux stades III à VI que nous avons analysés (Braak et al., 2003). On peut proposer différentes explications à la spécificité topographique de la réaction immune dans la MP.

Il est possible que seul l'environnement tissulaire de la SN autorise le dépassement d'un seuil quantitatif (ou qualitatif) du stress oxydatif, suffisant pour induire une altération biochimique de l' $\alpha$ -synucléine la rendant immunogène (Esteves *et al.*, 2009; Xiang *et al.*, 2013), et ainsi entraîner une migration des cellules T dans cette région (Reynolds *et al.*, 2008, 2009). Allant dans ce sens, il a été rapporté une densité microgiale plus importante dans la SN (Lawson *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 2013), potentiellement responsable d'un stress oxydatif dans l'environnement tissulaire de la SN par la production d'espèces oxygénées réactives ou encore de monoxyde d'azote. De plus, il est connu que les neurones dopaminergiques de la SN sont plus sensibles au stress oxydatif que d'autres populations neuronales, notamment celles des autres structures dopaminergiques (Wang & Michaelis, 2010). De même, il a été montré que la microglie répondait spécifiquement à une stimulation par l' $\alpha$ -synucléine, molécule libérée dans le liquide interstitiel et présente entre autres au niveau de la SN, notamment en terme de synthèse de chimiokines pro-inflammatoires capables d'induire un recrutement de lymphocytes (Roodveldt *et al.*, 2013). Enfin, Biber et collaborateurs ont proposé que les neurones en souffrance pouvaient eux-mêmes libérer des molécules susceptibles d'augmenter le stress oxydatif via l'activation de la microglie (Biber *et al.*, 2007).

Ainsi donc, nous pouvons conclure que le stress oxydatif potentiellement plus élevé au niveau de la SN (du fait peut-être de la densité microgiale plus importante dans cette structure) pourrait provoquer la formation d'une  $\alpha$ -synucléine immunogène, l' $\alpha$ -

synucléine nitrosylée, et induire à la périphérie une réponse T dirigée contre l' $\alpha$ -synucléine nitrosylée. En parallèle, l'activation microgiale induite par l' $\alpha$ -synucléine native ou altérée permettrait la synthèse de chimiokines dirigeant le recrutement des LyT dans la SN.

Nous avons également mis en évidence la présence de LyT dans notre modèle animal de MP avec une spécificité de distribution dans la SN. Toutefois, il est à noter que l'infiltration précoce des LyT dans notre modèle suggère qu'une réaction auto-immune spécifique d'antigène n'a pas eu le temps de se développer. La cinétique d'infiltration des cellules T dans le modèle 6-OHDA n'est donc pas en faveur de l'hypothèse auto-immune, sauf à envisager la possibilité qu'il existe dans l'organisme en condition physiologique des LyT mémoires spécifiques d'auto-antigènes neuronaux, permettant ainsi une plus grande réactivité des LyT présents à la périphérie, et leur rapide extravasation au sein du parenchyme cérébral, de manière région-spécifique. Il a été montré chez le primate une plus grande phosphorylation et nitrosylation de l' $\alpha$ -synucléine dans la SN au cours du vieillissement (McCormack, Mak & Di Monte, 2012). Nous pouvons penser que des LyT mémoires ont été sensibilisés à cet antigène spécifique de la MP, permettant une réponse adaptative plus rapide lorsque la pathologie se déclare. Cette hypothèse permet à la fois d'expliquer la région-spécificité de l'infiltrat, mais aussi la cinétique d'infiltration très rapide des LyT. Néanmoins, il convient de rappeler que chez la souris ou le rat, aucune étude n'a jusqu'à présent rapporté la présence d'inclusions intraneuronales d' $\alpha$ -synucléine dans le modèle 6-OHDA. Quoi qu'il en soit, chez les patients parkinsoniens, les techniques d'imagerie ont mis en évidence une altération de la BHE *in vivo* dans la région du tronc cérébral ce qui pourrait également expliquer une distribution préférentielle des LyT dans la SN (Kortekaas *et al.*, 2005).

Nos résultats obtenus sur les tissus postmortem de patients Parkinsoniens ont permis d'analyser les différences quantitatives d'infiltration T en fonction du stade évolutif de la pathologie (Braak *et al.*, 2003). Nous avons pu ainsi déterminer que quel que soit le stade de la pathologie, une faible densité de cellules T est constamment dans la SN. Ainsi donc, la cinétique de neurodégénérescence progressive de la MP ne semble pas directement reliée à la cinétique d'infiltration lymphocytaire. Même si des LyT peuvent, à très faible densité, être observés dans le SNC de sujets âgés en condition physiologique (Gemechu & Bentivoglio, 2012), la

densité de l'infiltrat à laquelle s'ajoute le caractère région-spécifique de cette infiltration suggère que les LyT exercent bien un rôle physiopathologique dans la MP. Si la densité de LyT observée dans la SN est similaire à celle qui avait été rapportée dans une étude antérieure (Brochard *et al.*, 2009), le modèle 6-OHDA diffère singulièrement du modèle MPTP par une densité lymphocytaire considérablement plus faible (Brochard *et al.*, 2009). Outre l'absence de dépôts d' $\alpha$ -synucléine dans le modèle 6-OHDA, une explication possible à cette différence est la préservation relative de l'intégrité de la BHE, qui, malgré son ouverture de par le traumatisme de l'aiguille continue à réguler, au moins partiellement le processus de diapédèse.

*A contrario*, la toxine MPTP est le plus souvent administrée en plusieurs injections, intrapéritonéales (i.p.) et ce mode d'administration périphérique pourrait être responsables d'altérations diffuses de la BHE (Zhao *et al.*, 2007), d'effets systémiques sur les LyT de même que sur certaines structures nerveuses périphériques (Algeri *et al.*, 1987; Chi *et al.*, 1992; Cano-Jaimez *et al.*, 2010).

Notre étude montre de plus une importante infiltration de LyT dans les méninges des souris 6-OHDA, observation qui n'a pas été rapportée dans le modèle MPTP. Dans la SEP, maladie neuro-inflammatoire de référence, les méninges sont actuellement considérées comme un site privilégié de recrutement lymphocytaire et d'interactions entre LyT et CPA (Bartholomäus *et al.*, 2009; Androdias *et al.*, 2010; Magliozzi *et al.*, 2010; Lodygin *et al.*, 2013). Sur la base de ces données, nous pouvons émettre l'hypothèse que dans le modèle 6-OHDA, l'infiltration méningée et l'infiltration parenchymateuse au sein de la SN sont fonctionnellement reliées et que les 2 populations possiblement dialoguent sur un mode paracrine. Dans la mesure où dans les tissus postmortem de patients parkinsoniens, pour des raisons techniques (non préservation des méninges à l'extraction), aucune donnée n'est disponible sur la présence de LyT dans les méninges des patients, nous ne pouvons rien avancer sur ce point dans notre étude.

Un autre élément important concerne la distribution des LyT au sein de la SN et leurs interactions physiques avec les neurones. Dans notre modèle, nous n'avons pas observé de LyT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> en contact avec les corps cellulaires des neurones dopaminergiques, contrairement à ce qui a été montré par l'équipe de Brochard chez les animaux traités par le MPTP (Brochard *et al.*, 2009). Pour rappel, dans ce modèle, il a été montré que la toxicité exercée par les LyT était dépendante d'un

signal de mort Fas/FasL. Or, le signal Fas/FasL s'effectue par interaction directe de Fas avec son ligand (Zhang, Kaizuka & Hanagata, 2012), ce qui justifie la proximité directe des LyT avec les neurones dopaminergiques de la SNpc. Dans le modèle 6-OHDA, la prédominance de contacts LyT/microglie suggère qu'une cytotoxicité directe exercée par les LyT sur les neurones dopaminergique est peu probable dans le modèle 6-OHDA. En revanche, un impact indirect sur la survie neuronale via l'orientation du profil d'activation microgliale est à envisager. Il est intéressant de noter qu'en adéquation avec nos résultats, d'autres données obtenues dans le modèle murin MPTP ne montrent pas de contacts entre les LyT infiltrés et les neurones dopaminergiques, mais en revanche, une proximité avec les cellules microgliales activées exprimant le CMHII (Depboylu *et al.*, 2012).

Dans notre modèle, nous observons un ratio équilibré de CD4/CD8. Ces résultats sont une fois de plus différents de ceux obtenus dans le modèle MPTP (Brochard *et al.*, 2009) où le ratio CD4/CD8 est de 1 pour 3. Toutefois Brochard et collaborateurs montrent que dans le modèle MPTP les LyT CD8<sup>+</sup> ne jouent aucun rôle dans le processus de neurodégénérescence, résultat montrant que le critère de densité est finalement de faible valeur pour déterminer l'importance fonctionnelle des LyT infiltrant le SNC. Aucune donnée ne permet néanmoins de conclure qu'il en est de même chez l'homme dans la MP, même si le ratio CD4/CD8 est là encore déséquilibré en faveur des CD8 (Brochard *et al.*, 2009). Si l'on s'intéresse à la cinétique d'infiltration des LyT CD4 et CD8 dans notre modèle, on retient que l'infiltration est précoce, atteint son maximum plus rapidement que dans le modèle MPTP avant de légèrement diminuer par la suite. Nous n'avons pas étudié ce paramètre dans notre modèle au-delà d'une semaine après injection de la toxine, et ne pouvons de ce fait exclure la possibilité que le ratio CD4/CD8 se modifie aux phases plus tardives du modèle.

Un tableau récapitulant les différences immunopathologiques observées entre les modèles MPTP, 6-OHDA et la MP est présenté ci-dessous.

	MPTP	6-OHDA	MP
Localisation	Spécifique à la SNpc Méninges ?	Spécifique à la SNpc Méninges	Spécifique à la SNpc Méninges ?
Densité	≈ 6 à 300/mm <sup>2</sup>	≈ 1 à 3 cell/mm <sup>2</sup>	≈ 1 à 3 cell/mm <sup>2</sup>
Contacts LyT/neurones	+ (Brochard <i>et al.</i> , 2009)	-	+ (Brochard <i>et al.</i> , 2009)
Phénotype	CD8 > CD4	CD8 = CD4	CD8 > CD4
Cinétique infiltration T	- Début : J2 - Maximum : J7 - puis décroissance	- Début : J1 - Maximum : J4 - puis décroissance	- Début : précoce (avant apparition de la phase symptomatique)

Les différences qualitatives, quantitatives et de cinétiques observées au regard de l'infiltration T entre le modèle 6-OHDA et le modèle MPTP nous ont incités à explorer la fonction des LyT dans notre modèle en utilisant les mêmes approches que Brochard et coll. (Brochard *et al.*, 2009) Nous avons été surpris des résultats montrant que, contrairement au modèle MPTP, un déficit génétiquement déterminé en LyT avait pour conséquence une aggravation de la pathologie, avec perte neuronale augmentée, troubles comportementaux aggravés et activation microgliale accrue. Outre l'utilisation de souris Foxn1<sup>-/-</sup> et NOD SCID exclusivement dans nos travaux, des souris C57Bl/6 Rag1<sup>-/-</sup> et CD3<sup>-/-</sup> ont été employées dans les deux études. L'apport des souris Foxn1<sup>-/-</sup> et NOD SCID sur la validité de nos résultats est important car il permet d'aborder non seulement la question des différences de susceptibilité liées aux fonds génétiques mais aussi au degré et à la nature de l'immunodéficience.

Parmi les facteurs qui peuvent potentiellement expliquer ces divergences de résultats, nous en discuterons quatre qui paraissent importants : l'âge des animaux, leur genre, la nature des toxines utilisées et leur mode d'administration. Les données de la littérature montrent que le vieillissement est un facteur important sur la cinétique de neurodégénérescence et sur l'activation microgliale (Streit *et al.*, 2004; Miller & Streit, 2007; Gemechu & Bentivoglio, 2012). Or notre étude, comme celle de Brochard et collaborateurs, utilise des souris âgées de 10 à 12 semaines, ce qui est considéré comme un état d'adulte jeune chez la souris. Il s'agit là d'un défaut relatif qui est commun aux deux modèles et qui ne permet pas d'expliquer les divergences observées. En revanche, concernant le genre des animaux, nous utilisons des femelles, contrairement aux travaux de Brochard et collaborateurs qui réalisent leur modèle sur des mâles. Parmi la multitude de données qui démontrent l'impact des hormones sexuelles sur l'inflammation et/ou la susceptibilité à différents modèles de pathologies neurologiques, retenons qu'il a été montré en culture cellulaire que l'œstradiol, hormone femelle, pouvait diminuer la sensibilité neuronale à la toxicité induite par le MPTP et la 6-OHDA (Callier *et al.*, 2002). Ce résultat fait écho à l'incidence plus importante de la MP chez les hommes que chez les femmes (Shulman, 2007). Le problème lié au genre des souris n'interfère possiblement pas avec l'essence de nos résultats mais est néanmoins à prendre en considération et nécessiterait de reproduire nos résultats chez des souris mâles.

En ce qui concerne le mode d'injection et l'effet de la toxine, on note de grandes différences entre les deux modèles. La toxine 6-OHDA, analogue structural de la dopamine, utilisée en injection intrastriatale possède une grande spécificité. En effet, non seulement elle n'atteint que les neurones et fibres dopaminergiques, mais de plus, elle se limite à la lésion de la voie nigrostriée, tout en ne perturbant pas les autres systèmes dopaminergiques comme, par exemple, les réseaux neuronaux dopaminergiques au niveau des bulbes olfactifs ou dans le système limbique (circuit neuronal impliqué dans le système de récompense). La 6-OHDA n'entraîne pas de lésions dans toutes les autres structures normalement touchées dans la pathologie humaine (Betarbet, Sherer & Greenamyre, 2002), mais peut mimer chez le rat certains troubles non moteurs observés dans la MP, comme des troubles comportementaux et cognitifs (Tadaiesky *et al.*, 2008).

Par opposition, la toxine MPTP, injectée en plusieurs injections intrapéritonéales, cible les catécholamines (noradrénaline, dopamine, adrénaline) et, de ce fait, pas uniquement les neurones et fibres dopaminergiques (Ambrosio & Mahy, 1989; Luthman & Sundström, 1990). La perméabilité de la BHE a été décrite comme altérée 6h après intoxication, avant de redevenir normale 12h après (Brochard *et al.*, 2009). Une perméabilité à plus long terme de la BHE a été observée dans certaines études (Zhao *et al.*, 2007).

Dans ce qui suit, nous discuterons, au regard de nos propres résultats et des données de la littérature, les éventuelles sous-populations de LyT qui pourraient jouer un rôle dans la pathologie de la MP et expliquer les résultats obtenus chez des souris immunodéficientes où l'absence de LyT a une incidence délétère sur la perte de neurones dopaminergiques, l'activation microgliale, ainsi que les troubles moteurs associés, après lésion 6-OHDA.

L'une des questions soulevées par nos résultats est le rôle possible d'une infiltration de cellules myéloïdes périphériques au sein du SNC chez les souris 6-OHDA immunodéficientes. Différents travaux ont en effet montré une infiltration de macrophages au sein du SNC dans le modèle MPTP (Kokovay & Cunningham, 2005; Rodriguez *et al.*, 2007; Depboylu *et al.*, 2012). On sait toutefois que la rupture de la BHE induite par les procédures d'irradiation qui précèdent la reconstitution hématopoïétique conduit à surestimer considérablement le flux de cellules myéloïdes dérivant de la périphérie dans les modèles de neurodégénérescence (Ajami *et al.*, 2007; Mildner *et al.*, 2007; Shechter *et al.*, 2009; Cusick *et al.*, 2013). En l'absence de marqueur permettant de formellement discriminer les macrophages de la microglie, Il est techniquement très difficile d'évaluer la part réelle de l'apport périphérique à l'accumulation de cellules myéloïdes dans la SN de souris 6-OHDA. Seule l'approche complexe de parabiose permettrait de trancher définitivement (Mildner *et al.*, 2007). Notons toutefois que dans le modèle biaisé de l'irradiation/reconstitution, les LyT infiltrant la SN de souris MPTP établissent des contacts intercellulaires avec la microglie résidente mais ni avec les macrophages infiltrants, ni avec les neurones (Depboylu *et al.*, 2012). Extrapolés au modèle 6-OHDA, ces résultats suggèrent que le dialogue LyT/microglie pourrait non seulement déterminer l'étendue de la perte neuronale dans la SN mais également le niveau de

recrutement de macrophages dérivés du sang. En faveur de cette hypothèse, une récente étude montre que dans un modèle murin de SLA, l'activation précoce de la microglie résidente est responsable du recrutement secondaire de monocytes/macrophages via la chémokine CCL2 (Butovsky *et al.*, 2012).

On peut émettre l'hypothèse que la neuroprotection exercée par les LyT dans notre modèle pourrait être médiée par des cellules T cytotoxiques interagissant avec les cellules microgliales activées. Ainsi donc, dans le modèle 6-OHDA comme dans le modèle MPTP et peut-être aussi dans la MP (Brochard *et al.*, 2009), le phénotype des cellules et le rôle qu'elles jouent seraient les mêmes, mais les cibles de ces effets seraient différentes, entraînant dans un cas l'augmentation de la neurodégénérescence, et dans l'autre, sa diminution. Il a ainsi antérieurement démontré que l'activation microgliale par des cytokines Th1 augmentait leur sensibilité à l'apoptose (Spanaus, Schlapbach & Fontana, 1998).

Nos résultats conduisent également à discuter le rôle potentiel de sous-population T dont les effets neuroprotecteurs ont été précédemment démontrés dans différents modèles de neurodégénérescence ou de lésions neuronales aiguës : les Tregs et les Th2. Dans cette hypothèse, les Th2/Tregs exerceraient un effet protecteur en sécrétant diverses cytokines instructrices comme l'IL-4, l'IL-10 et le TGF $\beta$ , qui induiraient un programme d'activation neuroprotecteur. Plusieurs études étayant cette hypothèse ont montré l'importance des Tregs sur la survie neuronale, notamment dans le modèle MPTP (Liu *et al.*, 2009; Appel, Beers & Henkel, 2010; Gendelman & Appel, 2011). Ainsi donc, l'abondance de données en faveur de l'hypothèse d'un phénotype régulateur des LyT que nous observons dans la SNpc de nos souris traitées à la 6-OHDA tend à nous faire penser que ces cellules sont prépondérantes dans l'effet de neuroprotection observé. D'autre part, cette importance des Tregs pourrait soit dépendre de cascades moléculaires menant à l'extravasation préférentielle de ces phénotypes lymphocytaires au sein du SNC, soit être la conséquence d'une augmentation de la proportion de Tregs/Th2 par rapport aux autres sous-populations de LyT. Aucune donnée que ce soit dans le modèle 6-OHDA ou MPTP ne permet de statuer sur cette question.

Il est intéressant de revenir sur les résultats obtenus dans le modèle MPTP. En effet, on peut supposer que la diminution de noradrénaline induite par la toxine devrait entraîner une augmentation du nombre de Tregs, et ainsi, potentiellement moduler la

perte de neurones dopaminergiques, car il a été montré que la noradrénaline induisait l'apoptose des Tregs (Wirth *et al.*, 2014). Les résultats obtenus par Brochard et collaborateurs laissent de ce fait supposer, dans ce modèle, l'existence probable de mécanismes encore inconnus de sélection des populations de LyT recrutées sur le lieu de la mort des neurones dopaminergiques.

Il a été montré dans un modèle d'excitotoxicité au glutamate que les T CD4 effecteurs (désignant dans ce travail l'ensemble de la population T CD4 à l'exception des Tregs) pouvaient jouer un rôle de régulation, moduler l'activation microgliale et prévenir la mort neuronale (Kipnis *et al.*, 2004). Cette étude s'inscrit dans l'hypothèse de l'auto-immunité protectrice qui postule que des LyT auto-réactifs jouent un rôle protecteur dans les situations d'atteintes neuronales (Schwartz & Kipnis, 2011).

L'hypothèse d'un rôle majeur des Tregs dans la physiopathologie de la MP est étayée par la mise en évidence d'un défaut d'activité suppressive des Tregs chez les patients parkinsoniens (Saunders *et al.*, 2012). Il n'y a pas en revanche de données concordantes concernant le pourcentage de Tregs chez les patients (Rosenkranz *et al.*, 2007; Niwa *et al.*, 2012). Ces éléments pourraient expliquer que l'activation microgliale chez les patients parkinsoniens ne soit pas maîtrisée et soit l'un des facteurs impliqués dans la neurodégénérescence. Cependant, les données actuelles ne nous permettent pas de savoir si une baisse de l'activité des Tregs est l'une des causes de la mort neuronale observée dans la MP ou au contraire sa conséquence.

Dans notre étude, il apparaît également essentiel de discuter la cinétique d'infiltration T d'un point de vue phénotypique. En effet, l'activité neuroprotectrice des LyT infiltrés dans la SNpc s'exerce dans un environnement moléculaire et cellulaire complexe, évoluant au fil des cinétiques d'activation moléculaire de chaque type cellulaire.

Nous émettons l'hypothèse que les LyT infiltrant la SNpc au début de la MP auraient un phénotype régulateur (ce que nous observons dans notre modèle). Dans la phase précoce de l'inflammation, les cellules microgliales sécrétant des facteurs neurotrophiques induisent des réponses anti-inflammatoires de la part des LyT, et engendrent ainsi une régulation de l'état inflammatoire en ne recrutant sur le lieu de l'inflammation que des cellules T régulatrices. Au cours du temps, l'environnement moléculaire et cellulaire évoluant (libération de substances pro-inflammatoires, neurodégénérescence plus avancée...), le phénotype des LyT s'infiltrant change pour adopter un profil d'activation pro-inflammatoire, exacerbant d'autant plus le

processus de neuro-inflammation (ce qui est observé dans le modèle MPTP). Dans la phase aiguë de l'inflammation, les cellules microgliales activées induisent des réponses pro-inflammatoires de la part des cellules T, et peuvent, dans des conditions chroniques, perpétuer l'état inflammatoire en engageant et en activant les T effs pro-inflammatoires polarisés, ce qui induit leur infiltration au niveau des sites de neurodégénérescence. Les cellules microgliales précocement anti-inflammatoires pourraient à la fois limiter la neurodégénérescence et l'extravasation des cellules T cytotoxiques au profit des Tregs, au sein du parenchyme cérébral. Lorsqu'elles adoptent un profil d'activation pro-inflammatoire, la neurodégénérescence augmente et les cellules T cytotoxiques peuvent être recrutées depuis la périphérie.

Ceci est en accord avec les données montrant une diminution du phénotype des LyT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> par rapport à un phénotype Th17 au cours de la MP (Saunders *et al.*, 2012). Le phénotype des LyT et, de ce fait, leur rôle, sont soumis à des régulations moléculaires. Une production de TGFβ assortie d'une sécrétion d'IL-6 oriente l'activation des LyT naïfs vers un profil Th17 cytotoxique, tandis qu'une forte sécrétion de TGFβ seule entraîne l'activation des LyT naïfs vers un profil CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> régulateur. De plus, l'activation de Th17 inhibe celle des CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Chen *et al.*, 2003; Bettelli *et al.*, 2006; Kimura & Kishimoto, 2010). Nous proposons que l'hétérogénéité clinique de la MP au regard notamment de sa vitesse d'évolution est partiellement déterminée par la balance Tregs/Th17 qui dépend elle-même de modifications subtiles du microenvironnement cérébral. De la même façon, le passage d'une forme infra-clinique à une forme cliniquement parlante de la MP serait en partie lié à une différenciation préférentielle des T CD4 infiltrants vers un phénotype TH17 plutôt que Tregs. Quoi qu'il en soit, la théorie d'une infiltration de Ly Tregs aux stades initiaux puis de LyT cytotoxiques à des temps plus tardifs dans notre modèle fait écho à la théorie sur les propriétés neuroprotectrices puis neurotoxiques de la microglie évoquée plus tôt dans cette discussion. Ainsi, nous pouvons faire l'hypothèse que les profils d'activation de ces deux types cellulaires varient l'un en conséquence de l'autre, mais nous ne pouvons savoir de manière certaine si c'est le changement de profil d'activation de la microglie qui induit celui des LyT, ou bien si, au contraire, la mise en place d'un infiltrat lymphocytaire pro-inflammatoire entraîne une modification du profil d'activation de la microglie.

Si l'on considère que l'absence de LyT entraîne une modification des propriétés neurotrophiques de la microglie activée vers des propriétés neurotoxiques, cela signifie que, en amont de l'infiltration lymphocytaire au sein de la SNpc, la microglie activée adopterait « par défaut » un profil neurotoxique, contrebalancé par l'arrivée des Tregs, pour redevenir neurotoxique au cours de la cinétique d'activation microgliale. Les données disponibles à ce jour sont cependant obtenues à temps tardifs (*i.e.* quand les symptômes de la MP se sont déclarés) et ne permettent pas de vérifier cette hypothèse (McGeer *et al.*, 1988b; Hunot *et al.*, 1999).

D'autre part, les neurones, en influençant l'activation des LyT vers un phénotype régulateur, pourraient également jouer un rôle (Liu, Teige, Birnir, & Issazadeh-Navikas, 2006). Nous proposons donc la cinétique suivante : au début du processus de neurodégénération, les neurones dopaminergiques, encore nombreux, font incliner la balance d'activation des LyT en faveur d'un profil régulateur de la neuro-inflammation, ce qui permet de contrôler le processus de neurodégénérescence en orientant la microglie activée vers un phénotype neuroprotecteur, ce qui amplifie en retour le phénomène. Au cours de l'évolution de la maladie, les neurones dopaminergiques sont de moins en moins nombreux, et leur action régulatrice diminue. De là, le profil d'activation des LyT commence à basculer vers un profil cytotoxique, ce qui entraîne une augmentation du processus de neurodégénérescence en diminuant l'action régulatrice exercée par la microglie, qui, de ce fait, amplifie le phénomène. Lorsque la perte de neurones dopaminergiques atteint un certain stade, les symptômes moteurs apparaissent. Au moment où les études sont menées sur les tissus postmortem des patients parkinsoniens, la réaction immunitaire qui est observée serait neurotoxique.

Selon cette théorie, et si l'on rapporte cela à nos résultats, nous pouvons voir qu'une perte neuronale d'environ 30% est déjà trop importante pour qu'une action de régulation du processus de neurodégénérescence des neurones soit envisageable, et pour empêcher que la cascade de mécanismes pro-inflammatoires se mette en place.

Le lien pouvant unir spécifiquement les neurones dopaminergiques aux LyT n'a pas été établi dans les études se concentrant sur les neurones dopaminergiques. Cependant, il a été montré *ex vivo* que les cellules T CD4<sup>+</sup>, préférentiellement en état d'apoptose, expriment les récepteurs à dopamine D1 à D5 chez l'humain

(Kustrimovic *et al.*, 2014) et *in vivo* dans un modèle MPTP de MP que les LyT CD4<sup>+</sup> de souris exprimaient le récepteur à dopamine D3, bien que ceci ait été montré comme délétère pour la survie neuronale (González *et al.*, 2013). Ces résultats suggèrent que les neurones dopaminergiques pourraient moduler l'activité cytotoxique des LyT en induisant leur entrée en apoptose. Rappelons ici qu'il a été montré que la microglie en culture exprimait également les récepteurs à dopamine D1 à D4 (Mastroeni *et al.*, 2009). Nous pouvons penser que des mécanismes similaires unissent donc les neurones dopaminergiques et la microglie au sein de la SNpc, peut être en réaction au stress oxydatif produit par cette dernière dans un état activé.

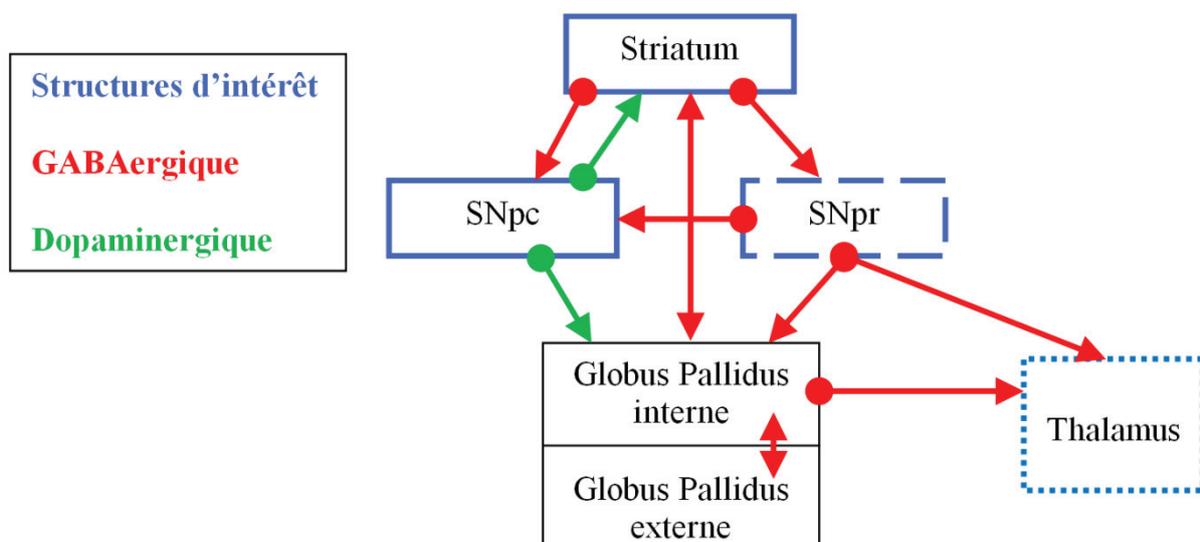
Sur le plan comportemental, un lien évident peut être établi entre l'apparition des troubles moteurs et la mort des neurones dopaminergiques. Nous avons montré que plus la neurodégénérescence était prononcée, plus les troubles induits du comportement moteur étaient importants. Ainsi, nous pouvons aisément faire le parallèle avec ce qui est observé dans la MP. Quoi qu'il en soit, le niveau de neurodégénérescence dans notre modèle ne semble pas suffisant pour que des troubles spontanés du contrôle moteur apparaissent. Si l'on se base sur nos résultats, nous voyons que seules les souris Foxn1<sup>-/-</sup> (déficientes en LyT) montrent des troubles spontanés du contrôle moteur. Or, la perte de neurones dopaminergiques chez ces animaux traités à la 6-OHDA dépasse les 60% et ce sont les souris montrant la différence de perte neuronale la plus importante avec les contrôles. Ainsi, nous pouvons nous poser la question de l'existence d'un effet de seuil de perte neuronale entraînant la survenue de troubles spontanés du contrôle moteur. Cette hypothèse semble cohérente avec les résultats obtenus dans la MP, où les premiers symptômes apparaissent globalement lorsque le seuil de 50-60% de perte neuronale est atteint (Fearnley & Lees, 1991). Cette notion de seuil à partir duquel la perte neuronale est suffisante pour voir l'apparition des déficits moteurs soulève la question de savoir quels mécanismes sont impliqués dans la détermination de ce seuil.

Au cours de notre étude, nous avons envisagé l'implication d'autres structures cérébrales que la SN dans la mise en place de la MP. En effet, chez l'homme, un ensemble de structures cérébrales est atteint au cours du temps (Braak *et al.*, 2003b). Nous avons montré une activation microgliale dans le thalamus de nos

souris lésées. Cette structure est atteinte chez toutes les souris, immunocompétentes ou immunodéficientes. Seule l'intensité de l'activation microgliale est plus importante chez les souris immunodéficientes que chez les souris contrôles. D'autre part, nous montrons dans cette même structure une perte neuronale importante. Nous pouvons en déduire que l'absence de LyT n'est pas la cause de cette atteinte thalamique, mais semblerait toutefois amplifier le phénomène. On peut donc faire la suggestion que les LyT pourraient jouer dans le thalamus le même rôle protecteur que dans la SNpc, par un mécanisme direct ou *via* les effets exercés au niveau de la SN. Des analyses sont en cours pour confirmer ou infirmer la présence de LyT dans le thalamus des souris 6-OHDA.

La démonstration d'une inflammation et d'une perte neuronale dans le thalamus des souris 6-OHDA appelle différents commentaires relatifs aux liens fonctionnels et anatomiques entre SN et thalamus. La SN fait partie d'un réseau de populations neuronales distribuées dans les noyaux gris centraux et plusieurs autres structures cérébrales qui interagissent, en stimulant ou inhibant chacune de ces structures. Les boucles de contrôle sont complexes et peuvent expliquer, par levée d'inhibition ou au contraire d'excitation, que d'autres structures que la SN se mettent à dysfonctionner.

Les connexions entre les principales structures de ce réseau sont représentées dans la figure suivante :



Dans la mesure où la SN subit une diminution d'activité, son action excitatrice sur certaines structures doit diminuer, et son inhibition aussi. Ainsi, nous voyons que certains noyaux moteurs du thalamus, structure ayant des connexions avec la SN et les régions motrices corticales (DeLong, 1990; Kwon & Jang, 2014), sont normalement inhibés par la SNpr. La levée d'inhibition due à la neurodégénérescence dans la SN entraîne logiquement une augmentation d'activité dans cette structure. Cette levée d'inhibition a donc naturellement des conséquences sur le fonctionnement normal du comportement moteur des patients atteints de la MP. Or, nous observons que cette structure est non seulement structurellement mais aussi fonctionnellement impliquée dans la MP (Pifl, Kish & Hornykiewicz, 2012), et que, fait intéressant, son volume est diminué (Geevarghese *et al.*, 2014). D'autre part, la stimulation électrique profonde de certains noyaux thalamiques améliore certains des symptômes moteurs rencontrés dans la pathologie (Kalia, Sankar & Lozano, 2013). Tous ces éléments sont en accord avec un rôle important joué par les structures thalamiques dans la MP.

Dans notre étude, les troubles du contrôle moteur les plus importants sont retrouvés chez les souris dont le thalamus est le plus touché, également associés à une perte importante de neurones dopaminergiques de la SNpc. Afin de mieux appréhender le rôle de ces populations neuronales thalamiques dans la mise en place de la pathologie, dans notre modèle appliqué sur des souris immunocompétentes, il serait utile d'analyser les conséquences d'une lésion de cette structure sur les troubles du contrôle moteur. À l'inverse, nous pourrions également étudier les troubles moteurs chez nos animaux 6-OHDA immunodéficients, auxquels une stimulation électrique profonde de cette structure serait appliquée. Cependant, ces protocoles sont assez lourds à mettre en place, et sortent du cadre de cette thèse.

Nos résultats sont en adéquation avec les données sur les patients atteints quant à l'implication de cette structure dans la pathologie. Cependant, à notre connaissance, aucune étude, que ce soit chez l'animal ou bien les patients parkinsoniens, n'a étudié l'inflammation ou la perte neuronale dans cette structure, ce qui apporte des données novatrices sur la question.

Dans ce contexte, nous ne pouvons pas omettre d'envisager l'implication et la régulation des acides aminés inhibiteurs et excitateurs en lien avec la pathologie. Le thalamus est composé en partie de neurones GABAergiques inhibiteurs (Long *et al.*,

2014). Si ces neurones thalamiques dégèrent, les autres types cellulaires excitateurs seront désinhibés, la libération de glutamate, neurotransmetteur excitateur antagoniste du GABA, augmentera et, en excès, induira la mort cellulaire par apoptose par un phénomène d'excitotoxicité (Olney, 1969).

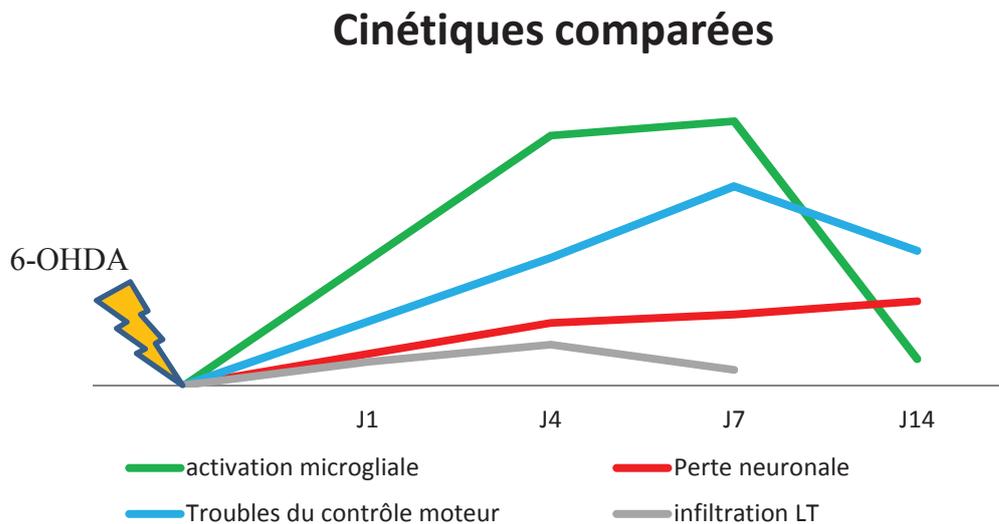
Nos résultats, du fait de la présence d'une activation microgliale, suggèrent que la mort des neurones thalamiques pourrait être la conséquence d'une phagocytose par les cellules microgliales. Il pourrait être intéressant de mener une étude sur d'éventuelles interactions microglie/neurones dans le thalamus, à l'instar de ce qui est présenté dans l'article 1 dans la SN. D'autres données obtenues dans notre étude nous suggèrent cependant une autre hypothèse.

Nous avons observé, au cours de nos travaux, une astrogliose chez certaines souris immunodéficientes. Nous pouvons donc penser que la neurodégénérescence dans le thalamus, initiée par l'activation microgliale, entraîne un déséquilibre du système activateur (glutamatergique)/inhibiteur (GABAergique). Ainsi donc, l'astrogliose, dans ce cas précis, pourrait se montrer délétère pour les neurones. Cependant, si l'on considère la situation sur un plan de modulation de l'inflammation, nous arrivons à la conclusion que les astrocytes se mettent à produire du glutamate, qui, en plus d'agir sur les neurones pourrait avoir un impact sur les cellules microgliales activées. Ceci est en accord avec des données montrant que les astrocytes étaient en mesure de réguler l'activité microgliale (Lee, Schwab & McGeer, 2011). Selon cette vision, la mort des neurones dans le thalamus peut être due à la forte activation microgliale (ce qui est suggéré par la relative colocalisation des zones de mort des neurones et de présence de la microglie activée), soit de manière collatérale par l'excitotoxicité entraînée par l'activation des astrocytes.

En conclusion à ces travaux sur le rôle des LyT dans notre modèle, il convient d'inscrire cette étude dans la continuité de celle préalablement menée par notre équipe et auxquels j'ai contribué. Ces précédents travaux ont apporté d'importantes données quant à la cinétique d'activation des cellules microgliales et du processus de neurodégénérescence des neurones dopaminergiques dans le modèle murin 6-OHDA. Les résultats présentés dans cette thèse permettent d'approfondir nos connaissances sur l'implication du système immunitaire dans la mise en place et

l'évolution de la maladie, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour la prise en charge et le suivi des patients.

Ces différentes cinétiques sont reprises dans le graphique ci-dessous, synthétisant l'ensemble des données de notre étude.



Nous pouvons dégager un schéma d'activation microgliale et de mort des neurones dopaminergiques dans la SN, semblant suggérer que le processus de neurodégénération serait le résultat d'une réaction en chaîne. Il a été observé que l'activation microgliale était en place dès 4 jours après l'induction du modèle, soit au moment d'infiltration maximale de cellules T. De ceci, nous pouvons faire l'hypothèse qu'à J4, les lymphocytes observés sont présents au sein de la SNpc afin de réguler l'inflammation, au moment où les neurones dopaminergiques sont déjà en train de dégénérer. Il est possible, en tenant compte des données de la littérature (Liu *et al.*, 2006), que ces derniers jouent un rôle sur les LyT en induisant leur phénotype régulateur agissant en retour sur la microglie, mais déjà insuffisant pour inverser le processus de neurodégénération. Puis, à J7, la densité de LyT diminue, alors que celle de la microglie activée est à son maximum. La mort neuronale est plus importante, ne permettant plus d'induire le phénotype régulateur des LyT, mais pas encore maximale. De par la diminution du phénotype régulateur des LyT dans la SNpc, l'activation microgliale devient délétère pour les neurones, qui continuent à mourir au moins jusqu'à J14, et produisent de plus en plus de signaux pro-

inflammatoires (Biber *et al.*, 2007; Ravichandran, 2010). En revanche, à cette période, l'activation microgliale est revenue à un état presque basal. Nous pouvons avancer l'hypothèse d'une mort importante des cellules microgliales activées (Fendrick, Xue & Streit, 2007; Streit & Xue, 2009), soit d'une baisse de production de facteurs pro-inflammatoires produits par les neurones eux-mêmes et/ou des cellules microgliales.

Nous discuterons ici rapidement les résultats préliminaires obtenus sur les souris IFNAR<sup>-/-</sup>. Pour rappel, nous montrons chez ces souris une baisse de la perte neuronale et de l'activation dans la SN, ainsi qu'une diminution des troubles moteurs. Il est connu que l'IFN de classe I est une cytokine pouvant agir sur le recrutement des LyT au sein du SNC (Takeuchi & Akira, 2010; Amin *et al.*, 2012). En prenant en compte cette donnée, nous pouvons faire l'hypothèse que dans la MP, l'interaction entre l'IFN de classe I avec son récepteur IFNAR pourrait engendrer une activation microgliale, entraînant la production de signaux anti- ou pro-inflammatoires par les cellules microgliales mais aussi par les neurones dopaminergiques. Cette interaction ligand/récepteur pourrait initier le recrutement des LyT dans le parenchyme des patients, dont le phénotype serait influencé par l'environnement moléculaire et cellulaire. Il a de plus été montré que l'IFN- $\alpha$  induisait la production d'IL-6 (Ito *et al.*, 1996), responsable, avec le TGF $\beta$ , de l'activation des Th17. Ainsi donc, l'IFN de type I pourrait être la cause du déséquilibre dans la balance Tregs/Th17, ce qui serait délétère et impliqué dans le processus de neurodégénération.

Cependant, nous pouvons nous demander quelle serait la cause de cette production anormale d'IFN de classe I dans la MP.

Un dysfonctionnement de la régulation de l'IFN- $\alpha$  semble associé à différentes pathologies. Concernant le lupus érythémateux, pathologie connue pour entraîner une surproduction d'IFN- $\alpha$ , certains patients développent des syndromes parkinsoniens (Shahar *et al.*, 1998; Tan, Chan & Auchus, 2001). D'autre part, cette cytokine est un traitement classique chez les personnes souffrant d'hépatite C. Or, des études rapportent que des patients souffrant de cette maladie peuvent développer des syndromes parkinsoniens (Kajihara *et al.*, 2010).

L'IFN- $\alpha$  est sécrété, comme nous l'avons vu, en réaction à un danger, et possède spécifiquement des propriétés antivirales et d'activation des macrophages comme la

microglie. Or, il a été montré que l'épidémie de grippe de 1918 avait entraîné une vague d'encéphalopathies de von Economo, ayant mené à l'apparition de syndromes parkinsoniens chez certaines personnes ayant contracté cette encéphalopathie (Jang *et al.*, 2009). Ces données ont donné lieu à la théorie de l'origine virale de la MP. Des données allant dans ce sens ont en outre été produites, en montrant que la perte de neurones et fibres dopaminergiques pouvait être due à un pathogène encore inconnu passant la muqueuse gastro-intestinale et pénétrant le SNC *via* les neurones entériques postganglioniques (Braak *et al.*, 2003a).

Nous voyons donc l'importance de l'IFN- $\alpha$  dans la MP, en lien non seulement avec la perte de neurones dopaminergiques, mais aussi l'activation de la microglie et le recrutement des LyT dans la SNpc. Nos résultats complémentaires sur les souris IFNAR KO pourraient ouvrir une piste en direction d'une potentielle cible thérapeutique qui permettrait de réguler une activation microgliale qui semble délétère dans notre modèle.

En conclusion de cette discussion, nous voyons que nos données peuvent s'inscrire dans un ensemble menant à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les processus de neurodégénérescence. Nous avons montré que le processus de neurodégénérescence associé à la MP était le fait de mécanismes autonomes de mort neuronale, auxquels s'ajoutent des mécanismes non-autonomes, médiés par le système immunitaire avec une coopération des mécanismes immuns innés et adaptatifs. Quoi qu'il en soit, nous nous trouvons dans le cadre de cette étude dans un modèle animal, qui, bien que mimant certains aspects de la MP, n'en reflète que de manière imparfaite les caractéristiques physiopathologiques et comportementales. Il subsiste beaucoup de questions concernant les mécanismes de recrutement des LyT dans la SNpc, en lien avec la cinétique d'activation microgliale et de mort neuronale. D'autre part, nous avons mis en avant l'importance du phénotype des LyT impliqués et le rôle joué par l'environnement cellulaire et l'homéostasie cérébrale. En conclusion, il apparaît que les nouvelles thérapeutiques pourraient cibler les acteurs de l'inflammation, afin d'optimiser les traitements de la MP.

À l'avenir, des études plus poussées nous permettraient d'identifier quelle(s) sous-population(s) de LyT sont mises en jeu dans notre modèle murin 6-OHDA. De plus, il faudrait pouvoir identifier, caractériser et analyser les mécanismes moléculaires et

cellulaires responsables du recrutement des LyT au sein de la SNpc. Dans cette optique, il serait utile d'approfondir les connaissances sur les différentes cinétiques des cellules/molécules impliquées dans le processus de neurodégénérescence.

## **IV. BIBLIOGRAPHIE**



- Aarsland, D., Brønnick, K., Ehrt, U., De Deyn, P.P., Tekin, S., Emre, M. & Cummings, J.L. (2007). Neuropsychiatric symptoms in patients with Parkinson's disease and dementia: frequency, profile and associated care giver stress. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **78**, 36–42.
- Aguzzi, A., Nuvolone, M. & Zhu, C. (2013). The immunobiology of prion diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 888–902.
- Ajami, B., Bennett, J.L., Krieger, C., Tetzlaff, W. & Rossi, F.M. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat. Neurosci.* **10**, 1538–43.
- Akiyama, H. & McGeer, P.L. (1989). Microglial response to 6-hydroxydopamine-induced substantia nigra lesions. *Brain Res.* **489**, 247–53.
- Alam, M. & Schmidt, W.J. (2002). Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. *Behav. Brain Res.* **136**, 317–24.
- Alberio, T., Pippione, A.C., Zibetti, M., Olgiati, S., Cecconi, D., Comi, C., Lopiano, L. & Fasano, M. (2012). Discovery and verification of panels of T-lymphocyte proteins as biomarkers of Parkinson's disease. *Sci. Rep.* **2**, 953.
- Algeri, S., Ambrosio, S., Garofalo, P. & Gerli, P. (1987). Peripheral effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and its main metabolite 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* **141**, 309–12.
- Aloisi, F. (2001). Immune Function of Microglia **179**, 165–79.
- Alvarez, J.I., Katayama, T. & Prat, A. (2013). Glial influence on the blood brain barrier. *Glia* **61**, 1939–58.

- Alvarez-Fischer, D., Henze, C., Strenzke, C., Westrich, J., Ferger, B., Höglinger, G.U., Oertel, W.H. & Hartmann, A. (2008). Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and alpha-synuclein-deleted mice. *Exp. Neurol.* **210**, 182–93.
- Ambrosio, S. & Mahy, N. (1989). Acute peripheral catecholaminergic changes in rat after MPTP and MPP<sup>+</sup> treatment. *Rev. española Fisiol.* **45**, 157–61.
- Amin, D.N., Vodnala, S.K., Masocha, W., Sun, B., Kristensson, K. & Rottenberg, M.E. (2012). Distinct Toll-like receptor signals regulate cerebral parasite load and interferon  $\alpha/\beta$  and tumor necrosis factor  $\alpha$ -dependent T-cell infiltration in the brains of *Trypanosoma brucei*-infected mice. *J. Infect. Dis.* **205**, 320–32.
- Andrew, R., Watson, D.G., Best, S.A., Midgley, J.M., Wenlong, H. & Petty, R.K. (1993). The determination of hydroxydopamines and other trace amines in the urine of parkinsonian patients and normal controls. *Neurochem. Res.* **18**, 1175–7.
- Androdias, G., Reynolds, R., Chanal, M., Ritleng, C., Confavreux, C. & Nataf, S. (2010). Meningeal T cells associate with diffuse axonal loss in multiple sclerosis spinal cords. *Ann. Neurol.* **68**, 465–76.
- Angiari, S. & Constantin, G. (2013). Selectins and their ligands as potential immunotherapeutic targets in neurological diseases. *Immunotherapy* **5**, 1207–20.
- Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlasci, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., Parente, E., Fili, L., Ferri, S., Frosali, F., Giudici, F., Romagnani, P., Parronchi, P., Tonelli, F., Maggi, E. & Romagnani, S. (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.* **204**, 1849–61.

- Appel, S.H., Beers, D.R. & Henkel, J.S. (2010). T cell-microglial dialogue in Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis: are we listening? *Trends Immunol.* **31**, 7–17.
- Arimoto, T., Choi, D.-Y., Lu, X., Liu, M., Nguyen, X. V, Zheng, N., Stewart, C.A., Kim, H.-C. & Bing, G. (2007). Interleukin-10 protects against inflammation-mediated degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra. *Neurobiol. Aging* **28**, 894–906.
- Ashkar, S. (2000). Eta-1 (Osteopontin): An Early Component of Type-1 (Cell-Mediated) Immunity. *Science (80-. )*. **287**, 860–864.
- Auffray, C., Sieweke, M.H. & Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 669–92.
- Baba, Y., Kuroiwa, A., Uitti, R.J., Wszolek, Z.K. & Yamada, T. (2005). Alterations of T-lymphocyte populations in Parkinson disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* **11**, 493–8.
- Balashov, K.E., Rottman, J.B., Weiner, H.L. & 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6873–8.
- Baldo, B. a, Pratt, W.E., Will, M.J., Hanlon, E.C., Bakshi, V.P. & Cador, M. (2013). Principles of motivation revealed by the diverse functions of neuropharmacological and neuroanatomical substrates underlying feeding behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1–14.
- Banati, R.B. (2002). Brain plasticity and microglia: is transsynaptic glial activation in the thalamus after limb denervation linked to cortical plasticity and central sensitisation? *J. Physiol. Paris* **96**, 289–99.

- Banati, R.B., Daniel, S.E. & Blunt, S.B. (1998). Glial pathology but absence of apoptotic nigral neurons in long-standing Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **13**, 221–7.
- Banati, R.B., Newcombe, J., Gunn, R.N., Cagnin, A., Turkheimer, F., Heppner, F., Price, G., Wegner, F., Giovannoni, G., Miller, D.H., Perkin, G.D., Smith, T., Hewson, A.K., Bydder, G., Kreutzberg, G.W., Jones, T., Cuzner, M.L. & Myers, R. (2000). The peripheral benzodiazepine binding site in the brain in multiple sclerosis: quantitative in vivo imaging of microglia as a measure of disease activity. *Brain* **123** ( Pt 1, 2321–37.
- Barbi, J., Pardoll, D. & Pan, F. (2013). Metabolic control of the Treg/Th17 axis. *Immunol. Rev.* **252**, 52–77.
- Barcia, C., Ros, C.M., Annese, V., Gómez, A., Ros-Bernal, F., Aguado-Yera, D., Martínez-Pagán, M.E., de Pablos, V., Fernandez-Villalba, E. & Herrero, M.T. (2011). IFN- $\gamma$  signaling, with the synergistic contribution of TNF- $\alpha$ , mediates cell specific microglial and astroglial activation in experimental models of Parkinson's disease. *Cell Death Dis.* **2**, e142.
- Barnett, M.H., Henderson, A.P.D. & Prineas, J.W. (2006). The macrophage in MS: just a scavenger after all? Pathology and pathogenesis of the acute MS lesion. *Mult. Scler.* **12**, 121–32.
- Bartholomäus, I., Kawakami, N., Odoardi, F., Schläger, C., Miljkovic, D., Ellwart, J.W., Klinkert, W.E.F., Flügel-Koch, C., Issekutz, T.B., Wekerle, H. & Flügel, A. (2009). Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature* **462**, 94–8.
- Bas, J., Calopa, M., Mestre, M., Mollevi, D.G., Cutillas, B., Ambrosio, S. & Buendia, E. (2001). Lymphocyte populations in Parkinson ' s disease and in rat models of parkinsonism **113**, 146–152.

- Beach, T.G., Adler, C.H., Sue, L.I., Vedders, L., Lue, L., White lli, C.L., Akiyama, H., Caviness, J.N., Shill, H.A., Sabbagh, M.N. & Walker, D.G. (2010). Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol.* **119**, 689–702.
- Beaulieu, J. & Gainetdinov, R.R. (2011). The Physiology , Signaling , and Pharmacology of Dopamine Receptors **63**, 182–217.
- Bechmann, I., Galea, I. & Perry, V.H. (2007). What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol.* **28**, 5–11.
- Bednarczyk, J. & Lukasiuk, K. (2011). Tight junctions in neurological diseases. *Acta Neurobiol. Exp.* **71**, 393–408.
- Beers, D.R., Henkel, J.S., Zhao, W., Wang, J. & Appel, S.H. (2008). CD4+ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 15558–63.
- Benner, E.J., Banerjee, R., Reynolds, A.D., Sherman, S., Pisarev, V.M., Tsiperson, V., Nemachek, C., Ciborowski, P., Przedborski, S., Mosley, R.L. & 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. & Gendelman, H.E. (2004). Therapeutic immunization protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 9435–40.
- Benoit, M., Desnues, B. & Mege, J.-L. (2008). Macrophage polarization in bacterial infections. *J. Immunol.* **181**, 3733–9.

- Berardelli, A., Rothwell, J.C., Thompson, P.D. & Hallett, M. (2001). Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson ' s disease 2131–2146.
- Betarbet, R., Sherer, T.B. & Greenamyre, J.T. (2002). Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays* **24**, 308–18.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L. & Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235–8.
- Bezard, E., Gross, C.E., Fournier, M.C., Dovero, S., Bloch, B. & Jaber, M. (1999). Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter. *Exp. Neurol.* **155**, 268–73.
- Biber, K., Neumann, H., Inoue, K. & Boddeke, H.W. (2007). Neuronal “On” and “Off” signals control microglia. *Trends Neurosci.* **30**, 596–602.
- Bilen, J. & Bonini, N.M. (2005). Drosophila as a model for human neurodegenerative disease. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 153–71.
- Björklund, A. & Dunnett, S.B. (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.* **30**, 194–202.
- Blandini, F. & Armentero, M.-T. (2012). Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J.* **279**, 1156–66.
- Blandini, F., Mangiagalli, A., Cosentino, M., Marino, F., Samuele, A., Rasini, E., Fancellu, R., Martignoni, E., Riboldazzi, G., Calandrella, D., Frigo, G.M. & Nappi, G. (2003). Peripheral markers of apoptosis in Parkinson's disease: the effect of dopaminergic drugs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1010**, 675–8.
- Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M.-F., Benabid, A.L., Sadoul, R., Verna, J., Michallon, C.H.U., Pa, B. & Cedex, G. (2001). Molecular pathways involved in

- the neurotoxicity of 6-OHDA , dopamine and MPTP : contribution to the apoptotic theory in Parkinson ' s disease. *Prog. neurobiol.* **65**, 135–72.
- Von Boehmer, H., Aifantis, I., Gounari, F., Azogui, O., Haughn, L., Apostolou, I., Jaeckel, E., Grassi, F. & Klein, L. (2003). Thymic selection revisited: how essential is it? *Immunol. Rev.* **191**, 62–78.
- Boillée, S., Vande Velde, C. & Cleveland, D.W. (2006a). ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* **52**, 39–59.
- Boillée, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C.S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kassiotis, G., Kollias, G. & Cleveland, D.W. (2006b). Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* **312**, 1389–92.
- Borra, E., Gerbella, M., Rozzi, S. & Luppino, G. (2013). Projections from Caudal Ventrolateral Prefrontal Areas to Brainstem Preoculomotor Structures and to Basal Ganglia and Cerebellar Oculomotor Loops in the Macaque. *Cereb. Cortex.*
- Braak, H., Rüb, U., Gai, W.P. & Del Tredici, K. (2003a). Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J. Neural Transm.* **110**, 517–36.
- Braak, H. & Del Tredici, K. (2008). Cortico-basal ganglia-cortical circuitry in Parkinson's disease reconsidered. *Exp. Neurol.* **212**, 226–9.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R.A., Jansen Steur, E.N. & Braak, E. (2003b). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson ' s disease. *Neurobiol. Aging* **24**, 197–211.
- Braungart, E., Gerlach, M., Riederer, P., Baumeister, R. & Hoener, M.C. (2004). Caenorhabditis elegans MPP+ model of Parkinson's disease for high-throughput drug screenings. *Neurodegener. Dis.* **1**, 175–83.

- Brochard, V., Combadière, B., Prigent, A., Laouar, Y., Perrin, A., Beray-berthet, V., Bonduelle, O., Alvarez-fischer, D., Callebert, J., Launay, J., Duyckaerts, C., Flavell, R.A., Hirsch, E.C. & Hunot, S. (2009). Infiltration of CD4 + lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J. Clin. Invest.* **119**, 182–92.
- Bronte-stewart, H.M., Minn, A.Y., Rodrigues, K., Buckley, E.L. & Nashner, L.M. (2002). Postural instability in idiopathic Parkinson ' s disease: the role of medication and unilateral pallidotomy. *Brain* **125**, 2100–14.
- Brown, G.C. & Neher, J.J. (2012). Eaten alive! Cell death by primary phagocytosis: “phagoptosis”. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 325–32.
- Bruin, V.M.S., Bittencourt, L.R.A. & Tufik, S. (2012). Sleep-wake disturbances in Parkinson's disease: current evidence regarding diagnostic and therapeutic decisions. *Eur. Neurol.* **67**, 257–67.
- Bundgaard, M. & Abbott, N.J. (2008). All vertebrates started out with a glial blood-brain barrier 4-500 million years ago. *Glia* **56**, 699–708.
- Butovsky, O., Siddiqui, S., Gabriely, G., Lanser, A.J., Dake, B., Murugaiyan, G., Doykan, C.E., Wu, P.M., Gali, R.R., Iyer, L.K., Lawson, R., Berry, J., Krichevsky, A.M., Cudkowicz, M.E. & Weiner, H.L. (2012). Modulating inflammatory monocytes with a unique microRNA gene signature ameliorates murine ALS. *J. Clin. Invest.* **122**, 3063–87.
- Cahill, R.N., Frost, H. & Trnka, Z. (1976). The effects of antigen on the migration of recirculating lymphocytes through single lymph nodes. *J. Exp. Med.* **143**, 870–88.
- Callier, S., Le Saux, M., Lhiaubet, A.-M., Di Paolo, T., Rostène, W. & Pelaprat, D. (2002). Evaluation of the protective effect of oestradiol against toxicity induced by 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (Mpp+) towards

- dopaminergic mesencephalic neurones in primary culture. *J. Neurochem.* **80**, 307–16.
- Calopa, M., Bas, J., Callén, A. & Mestre, M. (2010). Apoptosis of peripheral blood lymphocytes in Parkinson patients. *Neurobiol. Dis.* **38**, 1–7.
- Cano-Jaimez, M., Pérez-Sánchez, F., Milán, M., Buendía, P., Ambrosio, S. & Fariñas, I. (2010). Vulnerability of peripheral catecholaminergic neurons to MPTP is not regulated by alpha-synuclein. *Neurobiol. Dis.* **38**, 92–103.
- Cardona, A.E., Piro, E.P., Sasse, M.E., Kostenko, V., Cardona, S.M., Dijkstra, I.M., Huang, D., Kidd, G., Dombrowski, S., Dutta, R., Lee, J.-C., Cook, D.N., Jung, S., Lira, S. a, Littman, D.R. & Ransohoff, R.M. (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat. Neurosci.* **9**, 917–24.
- Carman, C. V & Springer, T.A. (2004). A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J. Cell Biol.* **167**, 377–88.
- Carpintero, R., Brandt, K.J., Gruaz, L., Molnarfi, N., Lalive, P.H. & Burger, D. (2010). Glatiramer acetate triggers PI3K $\delta$ /Akt and MEK/ERK pathways to induce IL-1 receptor antagonist in human monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 17692–7.
- Carson, M.J., Thrash, J.C. & Walter, B. (2006). The cellular response in neuroinflammation: The role of leukocytes, microglia and astrocytes in neuronal death and survival. *Clin. Neurosci. Res.* **6**, 237–245.
- Cayrol, R., Wosik, K., Berard, J.L., Dodelet-Devillers, A., Ifergan, I., Kebir, H., Haqqani, A.S., Kreymborg, K., Krug, S., Moumdjian, R., Bouthillier, A., Becher, B., Arbour, N., David, S., Stanimirovic, D. & Prat, A. (2008). Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat. Immunol.* **9**, 137–45.

- Cebrián, C. & Prensa, L. (2010). Basal ganglia and thalamic input from neurons located within the ventral tier cell cluster region of the substantia nigra pars compacta in the rat. *J. Comp. Neurol.* **518**, 1283–300.
- Cebrián, C., Zucca, F.A., Mauri, P., Steinbeck, J.A., Studer, L., Scherzer, C.R., Kanter, E., Budhu, S., Mandelbaum, J., Vonsattel, J.P., Zecca, L., Loike, J.D. & Sulzer, D. (2014). MHC-I expression renders catecholaminergic neurons susceptible to T-cell-mediated degeneration. *Nat. Commun.* **5**, 3633.
- Chakrabarty, P., Ceballos-Diaz, C., Lin, W.-L., Beccard, A., Jansen-West, K., McFarland, N.R., Janus, C., Dickson, D., Das, P. & Golde, T.E. (2011). Interferon- $\gamma$  induces progressive nigrostriatal degeneration and basal ganglia calcification. *Nat. Neurosci.* **14**, 694–6.
- Chen, C., Liu, X., Wan, B. & Zhang, J.Z. (2009). Regulatory properties of copolymer I in Th17 differentiation by altering STAT3 phosphorylation. *J. Immunol.* **183**, 246–53.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G. & Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF- $\beta$  induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* **198**, 1875–86.
- Cherwinski, H.M., Schumacher, J.H., Brown, K.D. & Mosmann, T.R. (1987). Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* **166**, 1229–44.
- Chi, D.S., Gong, L., Daigneault, E.A. & Kostrzewa, R.M. (1992). Effects of MPTP and vitamin E treatments on immune function in mice. *Int. J. Immunopharmacol.* **14**, 739–46.

- Chiang, E.Y., Kolumam, G.A., Yu, X., Francesco, M., Ivelja, S., Peng, I., Gribling, P., Shu, J., Lee, W.P., Refino, C.J., Balazs, M., Paler-Martinez, A., Nguyen, A., Young, J., Barck, K.H., Carano, R.A.D., Ferrando, R., Diehl, L., Chatterjea, D. & Grogan, J.L. (2009). Targeted depletion of lymphotoxin-alpha-expressing TH1 and TH17 cells inhibits autoimmune disease. *Nat. Med.* **15**, 766–73.
- Chiu, I.M., Chen, A., Zheng, Y., Kosaras, B., Tsiftoglou, S.A., Vartanian, T.K., Brown, R.H. & Carroll, M.C. (2008). T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 17913–8.
- Cho, B.P., Song, D.Y., Sugama, S., Shin, D.H., Shimizu, Y., Kim, S.S., Kim, Y.S. & Joh, T.H. (2006). Pathological dynamics of activated microglia following medial forebrain bundle transection. *Glia* **53**, 92–102.
- Choi, E.Y., Park, W.S., Jung, K.C., Kim, S.H., Kim, Y.Y., Lee, W.J. & Park, S.H. (1998). Engagement of CD99 induces up-regulation of TCR and MHC class I and II molecules on the surface of human thymocytes. *J. Immunol.* **161**, 749–54.
- Chung, E.S., Kim, H., Lee, G., Park, S., Kim, H. & Bae, H. (2012). Neuro-protective effects of bee venom by suppression of neuroinflammatory responses in a mouse model of Parkinson's disease: role of regulatory T cells. *Brain. Behav. Immun.* **26**, 1322–30.
- Chung, S.J., Armasu, S.M., Anderson, K.J., Biernacka, J.M., Lesnick, T.G., Rider, D.N., Cunningham, J.M., Ahlskog, J.E., Frigerio, R. & Maraganore, D.M. (2013). Genetic susceptibility loci, environmental exposures, and Parkinson's disease: A case–control study of gene–environment interactions. *Parkinsonism Relat. Disord.* **19**, 595–99.

- Codarri, L., Greter, M. & Becher, B. (2013). Communication between pathogenic T cells and myeloid cells in neuroinflammatory disease. *Trends Immunol.* **34**, 114–9.
- Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S. & Vignali, D.A.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* **450**, 566–9.
- Combes, V., Guillemin, G.J., Chan-Ling, T., Hunt, N.H. & Grau, G.E.R. (2012). The crossroads of neuroinflammation in infectious diseases: endothelial cells and astrocytes. *Trends Parasitol.* **28**, 311–9.
- Cornetta, T., Palma, S., Aprile, I., Padua, L., Tonali, P., Testa, A. & Cozzi, R. (2009). Levodopa therapy reduces DNA damage in peripheral blood cells of patients with Parkinson's disease. *Cell Biol. Toxicol.* **25**, 321–30.
- Coscia, M., Quaglino, E., Iezzi, M., Curcio, C., Pantaleoni, F., Riganti, C., Holen, I., Mönkkönen, H., Boccadoro, M., Forni, G., Musiani, P., Bosia, A., Cavallo, F. & Massaia, M. (2010). Zoledronic acid repolarizes tumour-associated macrophages and inhibits mammary carcinogenesis by targeting the mevalonate pathway. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 2803–15.
- Cramer, S.P., Simonsen, H., Frederiksen, J.L., Rostrup, E. & Larsson, H.B. (2013). Abnormal blood-brain barrier permeability in normal appearing white matter in multiple sclerosis investigated by MRI. *NeuroImage. Clin.* **4**, 182–9.
- Croisier, E., Moran, L.B., Dexter, D.T., Pearce, R.K.B. & Graeber, M.B. (2005). Microglial inflammation in the parkinsonian substantia nigra: relationship to alpha-synuclein deposition. *J. Neuroinflammation* **2**, 14.
- Crucian, B., Dunne, P., Friedman, H., Ragsdale, R., Pross, S. & Widen, R. (1995). Alterations in levels of CD28-/CD8+ suppressor cell precursor and

- CD45RO+/CD4+ memory T lymphocytes in the peripheral blood of multiple sclerosis patients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2**, 249–52.
- Cunningham, C., Wilcockson, D.C., Campion, S., Lunnon, K. & Perry, V.H. (2005). Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. *J. Neurosci.* **25**, 9275–84.
- Curotto de Lafaille, M.A. & Lafaille, J.J. (2002). CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 771–8.
- Cusick, M.F., Libbey, J.E., Patel, D.C., Doty, D.J. & Fujinami, R.S. (2013). Infiltrating macrophages are key to the development of seizures following virus infection. *J. Virol.* **87**, 1849–60.
- Daher, J.P., Ying, M., Banerjee, R., McDonald, R.S., Hahn, M.D., Yang, L., Flint Beal, M., Thomas, B., Dawson, V.L., Dawson, T.M. & Moore, D.J. (2009). Conditional transgenic mice expressing C-terminally truncated human alpha-synuclein (alphaSyn119) exhibit reduced striatal dopamine without loss of nigrostriatal pathway dopaminergic neurons. *Mol. Neurodegener.* **4**, 34.
- Dahlström, A. & Fuxe, K. (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* **20**, 398–9.
- Damier, P., Hirsch, E.C., Agid, Y. & Graybiel, A.M. (1999). The substantia nigra of the human brain. I. Nigrosomes and the nigral matrix, a compartmental organization based on calbindin D(28K) immunohistochemistry. *Brain* **122** ( Pt 8, 1421–36.
- Daubner, S.C., Le, T. & Wang, S. (2011). Tyrosine Hydroxylase and Regulation of Dopamine Synthesis **508**, 1–12.

- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V, Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L. & Gan, W.-B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* **8**, 752–8.
- DelleDonne, A., Klos, K.J., Fujishiro, H., Ahmed, Z., Parisi, J.E., Josephs, K.A., Frigerio, R., Burnett, M., Wszolek, Z.K., Uitti, R.J., Ahlskog, J.E. & Dickson, D.W. (2008). Incidental Lewy body disease and preclinical Parkinson disease. *Arch. Neurol.* **65**, 1074–80.
- DeLong, M.R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* **13**, 281–5.
- Depboylu, C., Stricker, S., Ghobril, J.-P., Oertel, W.H., Priller, J. & Höglinger, G.U. (2012). Brain-resident microglia predominate over infiltrating myeloid cells in activation, phagocytosis and interaction with T-lymphocytes in the MPTP mouse model of Parkinson disease. *Exp. Neurol.* **238**, 183–91.
- Derecki, N.C., Cronk, J.C. & Kipnis, J. (2013). The role of microglia in brain maintenance: implications for Rett syndrome. *Trends Immunol.* **34**, 144–50.
- Díaz-Gandarilla, J. a, Osorio-Trujillo, C., Hernández-Ramírez, V.I. & Talamás-Rohana, P. (2013). PPAR activation induces M1 macrophage polarization via cPLA<sub>2</sub>-COX-2 inhibition, activating ROS production against *Leishmania mexicana*. *Biomed Res. Int.* **2013**, 215283.
- Djuretic, I.M., Levanon, D., Negreanu, V., Groner, Y., Rao, A. & Ansel, K.M. (2007). Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence IL4 in T helper type 1 cells. *Nat. Immunol.* **8**, 145–53.
- Dobbs, R.J., Charlett, A., Purkiss, A.G., Dobbs, S.M., Weller, C. & Peterson, D.W. (1999). Association of circulating TNF-alpha and IL-6 with ageing and parkinsonism. *Acta Neurol. Scand.* **100**, 34–41.

- Du, G., Liu, X., Chen, X., Song, M., Yan, Y., Jiao, R. & Wang, C.-C. (2010). *Drosophila* Histone Deacetylase 6 Protects Dopaminergic Neurons against  $\alpha$ -Synuclein Toxicity by Promoting Inclusion Formation **21**, 2128–2137.
- Duda, J.E., Giasson, B.I., Mabon, M.E., Miller, D.C., Golbe, L.I., Lee, V.M.-Y. & Trojanowski, J.Q. (2002). Concurrence of alpha-synuclein and tau brain pathology in the Contursi kindred. *Acta Neuropathol.* **104**, 7–11.
- Duda, P.W., Schmied, M.C., Cook, S.L., Krieger, J.I. & Hafler, D.A. (2000). Th2-polarized immune responses in patients with multiple sclerosis **105**, 967–76.
- Ebner, F., Brandt, C., Thiele, P., Richter, D., Schliesser, U., Siffrin, V., Schueler, J., Stubbe, T., Ellinghaus, A., Meisel, C., Sawitzki, B. & Nitsch, R. (2013). Microglial activation milieu controls regulatory T cell responses. *J. Immunol.* **191**, 5594–602.
- Edwards, L.L., Quigley, E.M. & Pfeiffer, R.F. (1992). Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease: frequency and pathophysiology. *Neurology* **42**, 726–32.
- Edwards, R.H. (2007). The neurotransmitter cycle and quantal size. *Neuron* **55**, 835–58.
- Elkabes, S., DiCicco-Bloom, E.M. & Black, I.B. (1996). Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function **76**, 2508–2521.
- Emmrich, J. V, Hornik, T.C., Neher, J.J. & Brown, G.C. (2013). Rotenone induces neuronal death by microglial phagocytosis of neurons. *FEBS J.* **280**, 5030–8.
- Ena, S., de Kerchove d'Exaerde, A. & Schiffmann, S.N. (2011). Unraveling the differential functions and regulation of striatal neuron sub-populations in motor control, reward, and motivational processes. *Front. Behav. Neurosci.* **5**, 47.

- Engelhardt, B. & Ransohoff, R.M. (2005). The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol.* **26**, 485–95.
- Esteves, A.R., Arduíno, D.M., Swerdlow, R.H., Oliveira, C.R. & Cardoso, S.M. (2009). Oxidative stress involvement in alpha-synuclein oligomerization in Parkinson's disease cybrids. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 439–48.
- Fearnley, J.M. & Lees, A.J. (1991). Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* **114** ( Pt 5, 2283–301.
- Fendrick, S.E., Xue, Q.-S. & Streit, W.J. (2007). Formation of multinucleated giant cells and microglial degeneration in rats expressing a mutant Cu/Zn superoxide dismutase gene. *J. Neuroinflammation* **4**, 9.
- Ferrante, C.J. & Leibovich, S.J. (2012). Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. *Adv. wound care* **1**, 10–16.
- Finberg, R.W. & Wang, J.P. (2009). Antiviral responses: different roles for different tolls. *Immunity* **30**, 173–5.
- Fiszer, U., Mix, E., Fredrikson, S., Kostulas, V. & Link, H. (1994). Parkinson's disease and immunological abnormalities: increase of HLA-DR expression on monocytes in cerebrospinal fluid and of CD45RO<sup>+</sup> T cells in peripheral blood. *Acta Neurol. Scand.* **90**, 160–6.
- Fleming, S.M., Salgado, J., Hutson, C.B., Rockenstein, E., Masliah, E., Levine, M.S. & Chesselet, M.-F. (2006). Behavioral effects of dopaminergic agonists in transgenic mice overexpressing human wildtype  $\alpha$ -synuclein. *Neuroscience* **142**, 1245–53.
- Flügel, A., Berkowicz, T., Ritter, T., Labeur, M., Jenne, D.E., Li, Z., Ellwart, J.W., Willem, M., Lassmann, H. & Wekerle, H. (2001). Migratory activity and functional

changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* **14**, 547–60.

Di Fonzo, A., Rohé, C.F., Ferreira, J., Chien, H.F., Vacca, L., Stocchi, F., Guedes, L., Fabrizio, E., Manfredi, M., Vanacore, N., Goldwurm, S., Breedveld, G., Sampaio, C., Meco, G., Barbosa, E., Oostra, B.A. & Bonifati, V. (2005). A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson ' s disease. *Lancet* **365**, 412–5.

Fornai, F., Schlüter, O.M., Lenzi, P., Gesi, M., Ruffoli, R., Ferrucci, M., Lazzeri, G., Busceti, C.L., Pontarelli, F., Battaglia, G., Pellegrini, A., Nicoletti, F., Ruggieri, S., Paparelli, A. & Südhof, T.C. (2005). Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 3413–8.

Frade, J.M. & Barde, Y.A. (1998). Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. *Neuron* **20**, 35–41.

Frugier, T., Morganti-Kossmann, M.C., O'Reilly, D. & McLean, C.A. (2010). In situ detection of inflammatory mediators in post mortem human brain tissue after traumatic injury. *J. Neurotrauma* **27**, 497–507.

Fujinami, R.S. & Oldstone, M.B. (1985). Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* **230**, 1043–5.

Gaffen, S.L. (2009). Structure and signalling in the IL-17 receptor superfamily **9**, 1–24.

Galea, I., Bechmann, I. & Perry, V.H. (2007). What is immune privilege (not)? *Trends Immunol.* **28**, 12–8.

- Gandhi, S., Vaarmann, A., Yao, Z., Duchon, M.R., Wood, N.W. & Abramov, A.Y. (2012). Dopamine induced neurodegeneration in a PINK1 model of Parkinson's disease. *PLoS One* **7**, e37564.
- Gautier, E.L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Helft, J., Chow, A., Elpek, K.G., Gordonov, S., Mazloom, A.R., Ma'ayan, A., Chua, W.-J., Hansen, T.H., Turley, S.J., Merad, M. & Randolph, G.J. (2012). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat. Immunol.* **13**, 1118–28.
- Geevarghese, R., Lumsden, D.E., Hulse, N., Samuel, M. & Ashkan, K. (2014). Subcortical Structure Volumes and Correlation to Clinical Variables in Parkinson's Disease. *J. Neuroimaging*.
- Geissmann, F., Gordon, S., Hume, D.A., Mowat, A.M. & Randolph, G.J. (2010). Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 453–60.
- Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71–82.
- Gemechu, J.M. & Bentivoglio, M. (2012). T Cell Recruitment in the Brain during Normal Aging. *Front. Cell. Neurosci.* **6**, 38.
- Gendelman, H.E. & Appel, S.H. (2011). Neuroprotective activities of regulatory T cells. *Trends Mol. Med.* **17**, 687–8.
- Gerhard, A., Pavese, N., Hotton, G., Turkheimer, F., Es, M., Hammers, A., Eggert, K., Oertel, W., Banati, R.B. & Brooks, D.J. (2006). In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **21**, 404–12.

- Ghafouri, M., Amini, S., Khalili, K. & Sawaya, B.E. (2006). HIV-1 associated dementia: symptoms and causes. *Retrovirology* **3**, 28.
- Giasson, B.I., Duda, J.E., Quinn, S.M., Zhang, B., Trojanowski, J.Q. & Lee, V.M.-Y. (2002). Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron* **34**, 521–33.
- Gilfoy, F.D. & Mason, P.W. (2007). West Nile virus-induced interferon production is mediated by the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *J. Virol.* **81**, 11148–58.
- Gilman, S., Wenning, G.K., Low, P.A., Brooks, D.J., Mathias, C.J., Trojanowski, J.Q., Wood, N.W., Colosimo, C., Dürr, A., Fowler, C.J., Kaufmann, H., Klockgether, T., Lees, A., Poewe, W., Quinn, N., Revesz, T., Robertson, D., Sandroni, P., Seppi, K. & Vidailhet, M. (2008). Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology* **71**, 670–6.
- Gimsa, U., Mitchison, N.A. & Brunner-Weinzierl, M.C. (2013). Immune privilege as an intrinsic CNS property: astrocytes protect the CNS against T-cell-mediated neuroinflammation. *Mediators Inflamm.* **2013**, 320519.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., Samokhvalov, I.M. & Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* **330**, 841–5.
- Giuliani, F., Goodyer, C.G., Antel, J.P. & Yong, V.W. (2003). Vulnerability of human neurons to T cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* **171**, 368–79.
- Glasl, L., Kloos, K., Giesert, F., Roethig, A., Di Benedetto, B., Kühn, R., Zhang, J., Hafen, U., Zerle, J., Hofmann, A., de Angelis, M.H., Winklhofer, K.F., Höltter, S.M., Vogt Weisenhorn, D.M. & Wurst, W. (2012). Pink1-deficiency in mice

- impairs gait, olfaction and serotonergic innervation of the olfactory bulb. *Exp. Neurol.* **235**, 214–27.
- Glass, W.G., Lim, J.K., Cholera, R., Pletnev, A.G., Gao, J.-L. & Murphy, P.M. (2005). Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection. *J. Exp. Med.* **202**, 1087–98.
- Glinka, Y.Y. & Youdim, M.B. (1995). Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *Eur. J. Pharmacol.* **292**, 329–32.
- Goedert, M. (1999). Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases: tauopathies and alpha-synucleinopathies. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **354**, 1101–18.
- Gomez-Nicola, D. & Perry, V.H. (2014). Microglial Dynamics and Role in the Healthy and Diseased Brain: A Paradigm of Functional Plasticity. *Neuroscientist*.
- González, H., Contreras, F., Prado, C., Elgueta, D., Franz, D., Bernales, S. & Pacheco, R. (2013). Dopamine receptor D3 expressed on CD4+ T cells favors neurodegeneration of dopaminergic neurons during Parkinson's disease. *J. Immunol.* **190**, 5048–56.
- González-Scarano, F. & Martín-García, J. (2005). The neuropathogenesis of AIDS. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 69–81.
- Gouider-Khouja, N., Larnaout, A., Amouri, R., Sfar, S., Belal, S., Ben Hamida, C., Ben Hamida, M., Hattori, N., Mizuno, Y. & Hentati, F. (2003). Autosomal recessive parkinsonism linked to parkin gene in a Tunisian family. Clinical, genetic and pathological study. *Parkinsonism Relat. Disord.* **9**, 247–251.
- Grammas, P., Martinez, J. & Miller, B. (2011). Cerebral microvascular endothelium and the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Expert Rev. Mol. Med.* **13**, e19.

- Greenwood, J., Amos, C.L., Walters, C.E., Couraud, P. & Lyck, R. (2003). Europe PMC Funders Group Intracellular domain of brain endothelial ICAM-1 is essential for T-lymphocyte-mediated signalling and migration1 **171**, 2099–2108.
- Greenwood, J., Heasman, S.J., Alvarez, J.I., Prat, A., Lyck, R. & Engelhardt, B. (2011). Review: leucocyte-endothelial cell crosstalk at the blood-brain barrier: a prerequisite for successful immune cell entry to the brain. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **37**, 24–39.
- Greter, M., Heppner, F.L., Lemos, M.P., Odermatt, B.M., Goebels, N., Laufer, T., Noelle, R.J. & Becher, B. (2005). Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat. Med.* **11**, 328–34.
- Guan, J., Pavlovic, D., Dalkie, N., Waldvogel, H.J., O'Carroll, S.J., Green, C.R. & Nicholson, L.F.B. (2013). Vascular degeneration in Parkinson's disease. *Brain Pathol.* **23**, 154–64.
- Guo, M. (2012). Drosophila as a model to study mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**.
- Hanisch, U.-K. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* **40**, 140–55.
- Hanisch, U.-K. (2013). Proteins in microglial activation--inputs and outputs by subsets. *Curr. Protein Pept. Sci.* **14**, 3–15.
- Hao, F., Zhang, N.-N., Zhang, D.-M., Bai, H.-Y., Piao, H., Yuan, B., Zhu, H.-Y., Yu, H., Xiao, C.-S. & Li, A.-P. (2013). Chemokine fractalkine attenuates overactivation and apoptosis of BV-2 microglial cells induced by extracellular ATP. *Neurochem. Res.* **38**, 1002–12.

- Haque, M.E., Mount, M.P., Safarpour, F., Abdel-Messih, E., Callaghan, S., Mazerolle, C., Kitada, T., Slack, R.S., Wallace, V., Shen, J., Anisman, H. & Park, D.S. (2012). Inactivation of Pink1 gene in vivo sensitizes dopamine-producing neurons to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and can be rescued by autosomal recessive Parkinson disease genes, Parkin or DJ-1. *J. Biol. Chem.* **287**, 23162–70.
- Harms, A.S., Cao, S., Rowse, A.L., Thome, A.D., Li, X., Mangieri, L.R., Cron, R.Q., Shacka, J.J., Raman, C. & Standaert, D.G. (2013). MHCII is required for  $\alpha$ -synuclein-induced activation of microglia, CD4 T cell proliferation, and dopaminergic neurodegeneration. *J. Neurosci.* **33**, 9592–600.
- Harvey, B.K., Wang, Y. & Hoffer, B.J. (2008). Transgenic rodent models of Parkinson's disease. *Acta neurochir. Suppl* **101**, 89–92.
- Hayashi, S., Wakabayashi, K., Ishikawa, a, Nagai, H., Saito, M., Maruyama, M., Takahashi, T., Ozawa, T., Tsuji, S. & Takahashi, H. (2000). An autopsy case of autosomal-recessive juvenile parkinsonism with a homozygous exon 4 deletion in the parkin gene. *Mov. Disord.* **15**, 884–8.
- Haynes, B.F., Markert, M.L., Sempowski, G.D., Patel, D.D. & Hale, L.P. (2000). The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 529–60.
- He, F. & Balling, R. (2012). The role of regulatory T cells in neurodegenerative diseases. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **5**, 153–80.
- Hedrich, K., Eskelson, C., Wilmot, B., Marder, K., Harris, J., Garrels, J., Meija-Santana, H., Vieregge, P., Jacobs, H., Bressman, S.B., Lang, A.E., Kann, M., Abbruzzese, G., Martinelli, P., Schwinger, E., Ozelius, L.J., Pramstaller, P.P., Klein, C. & Kramer, P. (2004). Distribution, type, and origin of Parkin mutations: review and case studies. *Mov. Disord.* **19**, 1146–57.

- Helmich, R.C., Janssen, M.J.R., Oyen, W.J., Bloem, B.R. & Toni, I. (2011). Pallidal dysfunction drives a cerebellothalamic circuit into Parkinson tremor. *Ann. Neurol.* **69**, 269–81.
- Henry, V., Paillé, V., Lelan, F., Brachet, P. & Damier, P. (2009). Kinetics of microglial activation and degeneration of dopamine-containing neurons in a rat model of Parkinson disease induced by 6-hydroxydopamine. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **68**, 1092–102.
- Heppner, F.L., Greter, M., Marino, D., Falsig, J., Raivich, G., Hövelmeyer, N., Waisman, A., Rüllicke, T., Prinz, M., Priller, J., Becher, B. & Aguzzi, A. (2005). Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat. Med.* **11**, 146–52.
- Hickey, W.F. (1999). Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Semin. Immunol.* **11**, 125–37.
- Hinojosa, A.E., Garcia-Bueno, B., Leza, J.C. & Madrigal, J.L. (2011). CCL2/MCP-1 modulation of microglial activation and proliferation. *J. Neuroinflammation* **8**, 77.
- Hinterberger, M., Aichinger, M., Prazeres da Costa, O., Voehringer, D., Hoffmann, R. & Klein, L. (2010). Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4(+) T cell tolerance. *Nat. Immunol.* **11**, 512–9.
- Hirsch, E., Graybiel, A.M. & Agid, Y.A. (1988). Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* **334**, 345–8.
- Hirsch, E.C., Hunot, S., Damier, P. & Faucheux, B. (1998). Glial cells and inflammation in Parkinson's disease: a role in neurodegeneration? *Ann. Neurol.* **44**, S115–20.

- Hisanaga, K., Asagi, M., Itoyama, Y. & Iwasaki, Y. (2001). Increase in peripheral CD4 bright+ CD8 dull+ T cells in Parkinson disease. *Arch. Neurol.* **58**, 1580–3.
- Ho, G.J., Drego, R., Hakimian, E. & Masliah, E. (2005). Mechanisms of cell signaling and inflammation in Alzheimer's disease. *Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy* **4**, 247–56.
- Hohlfeld, R. (2009). Multiple sclerosis: human model for EAE? *Eur. J. Immunol.* **39**, 2036–9.
- Holmøy, T. (2008). T cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurol.* **15**, 360–6.
- Hume, D.A. (2006). The mononuclear phagocyte system. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 49–53.
- Humphrey, D.M., Parsons, R.B., Ludlow, Z.N., Riemensperger, T., Esposito, G., Verstreken, P., Jacobs, H.T., Birman, S. & Hirth, F. (2012). Alternative oxidase rescues mitochondria-mediated dopaminergic cell loss in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 2698–712.
- Hunot, S., Boissière, F., Faucheux, B., Brugg, B., Mouatt-Prigent, A., Agid, Y. & Hirsch, E.C. (1996). Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience* **72**, 355–63.
- Hunot, S., Dugas, N., Faucheux, B., Hartmann, A., Tardieu, M., Debré, P., Agid, Y., Dugas, B. & 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. *J. Neurosci.* **19**, 3440–7.
- Imamura, K., Hishikawa, N., Sawada, M., Nagatsu, T., Yoshida, M. & Hashizume, Y. (2003). Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol.* **106**, 518–26.

- Ito, N., Kawata, S., Tamura, S., Kiso, S., Tsushima, H., Maeda, Y., Yamasaki, E., Igura, T. & Matsuzawa, Y. (1996). Induction of interleukin-6 by interferon alfa and its abrogation by a serine protease inhibitor in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **23**, 669–75.
- Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J. & Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells. *Cell* **126**, 1121–33.
- Jafari, S., Etminan, M., Aminzadeh, F. & Samii, A. (2013). Head injury and risk of Parkinson disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov. Disord.* **28**, 1222–9.
- Jang, H., Boltz, D.A., Webster, R.G. & Smeyne, R.J. (2009). Viral parkinsonism. *Biochim. Biophys. Acta* **1792**, 714–21.
- Jenkins, M.K., Khoruts, A., Ingulli, E., Mueller, D.L., McSorley, S.J., Reinhardt, R.L., Itano, A. & Pape, K.A. (2001). In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 23–45.
- Jeon, B.S., Jackson-Lewis, V. & Burke, R.E. (1995). 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration* **4**, 131–7.
- Jones, T.B., Hart, R.P. & Popovich, P.G. (2005). Molecular control of physiological and pathological T-cell recruitment after mouse spinal cord injury. *J. Neurosci.* **25**, 6576–83.
- Jurcovicova, J. (2014). Glucose transport in brain - effect of inflammation. *Endocr. Regul.* **48**, 35–48.

- Kajihara, M., Montagnese, S., Khanna, P., Amodio, P., Schapira, A.H., Dusheiko, G.M. & Morgan, M.Y. (2010). Parkinsonism in patients with chronic hepatitis C treated with interferon-alpha2b: a report of two cases. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **22**, 628–31.
- Kalia, L. V, Kalia, S.K., McLean, P.J., Lozano, A.M. & Lang, A.E. (2013a).  $\alpha$ -Synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease. *Ann. Neurol.* **73**, 155–69.
- Kalia, S.K., Sankar, T. & Lozano, A.M. (2013b). Deep brain stimulation for Parkinson's disease and other movement disorders. *Curr. Opin. Neurol.* **26**, 374–80.
- Kamel, F. (2013). Etiology. Paths from Pesticides to Parkinson's. *Science (80-. )*. **341**, 722–723.
- Kavitha, M., Nataraj, J., Essa, M.M., Memon, M.A. & Manivasagam, T. (2013). Mangiferin attenuates MPTP induced dopaminergic neurodegeneration and improves motor impairment, redox balance and Bcl-2/Bax expression in experimental Parkinson's disease mice. *Chem. Biol. Interact.* **206**, 239–247.
- Kawamata, T., Akiyama, H., Yamada, T. & McGeer, P.L. (1992). Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am. J. Pathol.* **140**, 691–707.
- Kazantsev, A.G. & Kolchinsky, A.M. (2008). Central role of alpha-synuclein oligomers in neurodegeneration in Parkinson disease. *Arch. Neurol.* **65**, 1577–81.
- Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B. & Prat, A. (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.* **13**, 1173–5.

- Kehagia, A.A., Barker, R.A. & Robbins, T.W. (2010). Neuropsychological and clinical heterogeneity of cognitive impairment and dementia in patients with Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* **9**, 1200–13.
- Kettenmann, H., Hanisch, U.K., Noda, M. & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of Microglia. *Physiol. Rev.* **91**, 461–553.
- Khandelwal, P.J., Herman, A.M. & Moussa, C.E.-H. (2011). Inflammation in the early stages of neurodegenerative pathology. *J. Neuroimmunol.* **238**, 1–11.
- Kierdorf, K., Erny, D., Goldmann, T., Sander, V., Schulz, C., Perdiguero, E.G., Wieghofer, P., Heinrich, A., Riemke, P., Hölscher, C., Müller, D.N., Luckow, B., Brouwer, T., Debowski, K., Fritz, G., Opdenakker, G., Diefenbach, A., Biber, K., Heikenwalder, M., Geissmann, F., Rosenbauer, F. & Prinz, M. (2013). Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat. Neurosci.* **16**, 273–80.
- Kim, C., Cho, E.-D., Kim, H.-K., You, S., Lee, H.-J., Hwang, D. & Lee, S.-J. (2014).  $\beta$ 1-integrin-dependent migration of microglia in response to neuron-released  $\alpha$ -synuclein. *Exp. Mol. Med.* **46**, e91.
- Kim, C., Ho, D.-H., Suk, J.-E., You, S., Michael, S., Kang, J., Joong Lee, S., Masliah, E., Hwang, D., Lee, H.-J. & Lee, S.-J. (2013). Neuron-released oligomeric  $\alpha$ -synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. *Nat. Commun.* **4**, 1562.
- Kim, S.U. & de Vellis, J. (2005). Microglia in health and disease. *J. Neurosci. Res.* **81**, 302–13.
- Kimura, A. & Kishimoto, T. (2010). IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur. J. Immunol.* **40**, 1830–5.

- Kipnis, J., Avidan, H., Caspi, R.R. & Schwartz, M. (2004). Dual effect of CD4+CD25+ regulatory T cells in neurodegeneration: a dialogue with microglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101 Suppl** , 14663–9.
- Kitano, H., Tanibuchi, I. & Jinnai, K. (1998). The distribution of neurons in the substantia nigra pars reticulata with input from the motor, premotor and prefrontal areas of the cerebral cortex in monkeys. *Brain Res.* **784**, 228–38.
- Kitic, M., Hochmeister, S., Wimmer, I., Bauer, J., Misu, T., Mader, S., Reindl, M., Fujihara, K., Lassmann, H. & Bratl, M. (2013). Intrastratial injection of interleukin-1 beta triggers the formation of neuromyelitis optica-like lesions in NMO-IgG seropositive rats. *Acta Neuropathol. Commun.* **1**, 5.
- Klein, C. & Westenberger, A. (2012). Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a008888.
- Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G. & Kyewski, B. (2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 833–44.
- Kleinewietfeld, M. & Hafler, D.A. (2013). The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin. Immunol.* **25**, 305–12.
- Knott, C., Stern, G. & Wilkin, G.P. (2000). Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol. Cell. Neurosci.* **16**, 724–39.
- Koh, D.R., Fung-Leung, W.P., Ho, a, Gray, D., Acha-Orbea, H. & Mak, T.W. (1992). Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8<sup>-/-</sup> mice. *Science* **256**, 1210–3.

- Kokovay, E. & Cunningham, L.A. (2005). Bone marrow-derived microglia contribute to the neuroinflammatory response and express iNOS in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **19**, 471–8.
- Kortekaas, R., Eshuis, S.A., Andringa, G., Cools, A.R. & Leenders, K.L. (2013). Motor behavior correlates with striatal [18F]-DOPA uptake in MPTP-lesioned primates. *Neurochem. Int.* **62**, 349–53.
- Kortekaas, R., Leenders, K.L., van Oostrom, J.C., Vaalburg, W., Bart, J., Willemsen, A.T. & Hendrikse, N.H. (2005). Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. *Ann. Neurol.* **57**, 176–9.
- Kosloski, L.M., Kosmacek, E.A., Olson, K.E., Mosley, R.L. & Gendelman, H.E. (2013). GM-CSF induces neuroprotective and anti-inflammatory responses in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxicated mice. *J. Neuroimmunol.* **265**, 1–10.
- Kowall, N.W., Hantraye, P., Brouillet, E., Beal, M.F., Mckee, A.C. & Ferrante, R.J. (2000). MPTP induces alpha-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons **11**, 211–13.
- Kremlev, S.G., Roberts, R.L. & Palmer, C. (2004). Differential expression of chemokines and chemokine receptors during microglial activation and inhibition. *J. Neuroimmunol.* **149**, 1–9.
- Kreutzberg, G.W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* **19**, 312–8.
- Kustrimovic, N., Rasini, E., Legnaro, M., Marino, F. & Cosentino, M. (2014). Expression of Dopaminergic Receptors on Human CD4+ T Lymphocytes: Flow Cytometric Analysis of Naive and Memory Subsets and Relevance for the Neuroimmunology of Neurodegenerative Disease. *J. Neuroimmune Pharmacol.*

- Kuwahara, T., Tonegawa, R., Ito, G., Mitani, S. & Iwatsubo, T. (2012). Phosphorylation of  $\alpha$ -synuclein protein at Ser-129 reduces neuronal dysfunction by lowering its membrane binding property in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **287**, 7098–109.
- Kwon, H.G. & Jang, S.H. (2014). Differences in neural connectivity between the substantia nigra and ventral tegmental area in the human brain. *Front. Hum. Neurosci.* **8**, 41.
- Ladeby, R., Wirenfeldt, M., Garcia-Ovejero, D., Fenger, C., Dissing-Olesen, L., Dalmau, I. & Finsen, B. (2005). Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **48**, 196–206.
- Lamacchia, C., Palmer, G., Seemayer, C.A., Talabot-Ayer, D. & Gabay, C. (2010). Enhanced Th1 and Th17 responses and arthritis severity in mice with a deficiency of myeloid cell-specific interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum.* **62**, 452–62.
- Lampson, L.A., Kushner, P.D. & Sobel, R.A. (1990). Major histocompatibility complex antigen expression in the affected tissues in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **28**, 365–72.
- Langston, J.W. & Ballard, P.A. (1983). Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N. Engl. J. Med.* **309**, 310.
- Laouar, Y., Town, T., Jeng, D., Tran, E., Wan, Y., Kuchroo, V.K. & Flavell, R.A. (2008). TGF-beta signaling in dendritic cells is a prerequisite for the control of autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10865–70.
- Larochelle, C., Alvarez, J.I. & Prat, A. (2011). How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS Lett.* **585**, 3770–80.

- De Lau, L.M.L. & Breteler, M.M. (2006). Epidemiology of Parkinson disease. *Lancet Neurol.* **5**, 525–535.
- Lavin, Y. & Merad, M. (2013). Macrophages: gatekeepers of tissue integrity. *Cancer Immunol. Res.* **1**, 201–9.
- Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P. & Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* **39**, 151–70.
- Lazarevic, V., Chen, X., Shim, J.-H., Hwang, E.-S., Jang, E., Bolm, A.N., Oukka, M., Kuchroo, V.K. & Glimcher, L.H. (2011). T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR $\gamma$ t. *Nat. Immunol.* **12**, 96–104.
- Lee, H.-J., Bae, E.-J. & Lee, S.-J. (2014). Extracellular  $\alpha$ -synuclein-a novel and crucial factor in Lewy body diseases. *Nat. Rev. Neurol.* **10**, 92–98.
- Lee, M., Schwab, C. & McGeer, P.L. (2011). Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity. *Glia* **59**, 152–65.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I. & Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 678–89.
- Li, J. & Le, W. (2013). Modeling neurodegenerative diseases in *Caenorhabditis elegans*. *Exp. Neurol.* **250**, 94–103.
- Lindenbach, D. & Bishop, C. (2013). Critical involvement of the motor cortex in the pathophysiology and treatment of Parkinson's disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1–14.

- Lindqvist, D., Kaufman, E., Brundin, L., Hall, S., Surova, Y. & Hansson, O. (2012). Non-motor symptoms in patients with Parkinson's disease - correlations with inflammatory cytokines in serum. *PLoS One* **7**, e47387.
- Liou, H.H., Tsai, M.C., Chen, C.J., Jeng, J.S., Chang, Y.C., Chen, S.Y. & Chen, R.C. (1997). Environmental risk factors and Parkinson's disease: A case-control study in Taiwan. *Neurology* **48**, 1583–8.
- Litteljohn, D., Mangano, E., Shukla, N. & Hayley, S. (2009). Interferon-gamma deficiency modifies the motor and co-morbid behavioral pathology and neurochemical changes provoked by the pesticide paraquat. *Neuroscience* **164**, 1894–906.
- Liu, B., Wang, K., Gao, H.M., Mandavilli, B., Wang, J.Y. & Hong, J.S. (2001). Molecular consequences of activated microglia in the brain: overactivation induces apoptosis. *J. Neurochem.* **77**, 182–9.
- Liu, J., Gong, N., Huang, X., Reynolds, A.D., Mosley, R.L. & Gendelman, H.E. (2009). Neuromodulatory activities of CD4+CD25+ regulatory T cells in a murine model of HIV-1 associated neurodegeneration **182**, 3855–65.
- Liu, Y., Teige, I., Birnir, B. & Issazadeh-Navikas, S. (2006). Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE. *Nat. Med.* **12**, 518–25.
- Lo, K.C., Geddes, J.F., Daniels, R.S. & Oxford, J.S. (2003). Lack of detection of influenza genes in archived formalin-fixed, paraffin wax-embedded brain samples of encephalitis lethargica patients from 1916 to 1920. *Virchows Arch.* **442**, 591–6.
- Lodygin, D., Odoardi, F., Schläger, C., Körner, H., Kitz, A., Nosov, M., van den Brandt, J., Reichardt, H.M., Haberl, M. & Flügel, A. (2013). A combination of

- fluorescent NFAT and H2B sensors uncovers dynamics of T cell activation in real time during CNS autoimmunity. *Nat. Med.* **19**, 784–90.
- Lolekha, P., Phanthumchinda, K. & Bhidayasiri, R. (2010). Prevalence and risk factors of Parkinson's disease in retired Thai traditional boxers. *Mov. Disord.* **25**, 1895–901.
- Long, Z., Li, X.-R., Xu, J., Edden, R.A., Qin, W.-P., Long, L.-L., Murdoch, J.B., Zheng, W., Jiang, Y.-M. & Dydak, U. (2014). Thalamic GABA predicts fine motor performance in manganese-exposed smelter workers. *PLoS One* **9**, e88220.
- Luthman, J. & Sundström, E. (1990). No apparent difference in the effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on the sympathetic system in NMRI and C57 BL/6 mice. *Toxicol. Lett.* **54**, 83–92.
- Maass, A. & Reichmann, H. (2013). Sleep and non-motor symptoms in Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* **120**, 565–9.
- Magliozzi, R., Howell, O.W., Reeves, C., Roncaroli, F., Nicholas, R., Serafini, B., Aloisi, F. & Reynolds, R. (2010). A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **68**, 477–93.
- Mahad, D., Callahan, M.K., Williams, K. a, Ubogu, E.E., Kivisäkk, P., Tucky, B., Kidd, G., Kingsbury, G.A., Chang, A., Fox, R.J., Mack, M., Sniderman, M.B., Ravid, R., Staugaitis, S.M., Stins, M.F. & Ransohoff, R.M. (2006). Modulating CCR2 and CCL2 at the blood-brain barrier: relevance for multiple sclerosis pathogenesis. *Brain* **129**, 212–23.
- Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R. & Weaver, C.T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* **441**, 231–4.

- Mangano, E.N., Litteljohn, D., So, R., Nelson, E., Peters, S., Bethune, C., Bobyn, J. & Hayley, S. (2012). Interferon- $\gamma$  plays a role in paraquat-induced neurodegeneration involving oxidative and proinflammatory pathways. *Neurobiol. Aging* **33**, 1411–26.
- Mantovani, A., Sica, A. & Locati, M. (2005). Macrophage polarization comes of age. *Immunity* **23**, 344–6.
- Marinova-Mutafchieva, L., Sadeghian, M., Broom, L., Davis, J.B., Medhurst, A.D. & Dexter, D.T. (2009). Relationship between microglial activation and dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra: a time course study in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **110**, 966–75.
- Mastroeni, D., Grover, A., Leonard, B., Joyce, J.N., Coleman, P.D., Kozik, B., Bellinger, D.L. & Rogers, J. (2009). Microglial responses to dopamine in a cell culture model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* **30**, 1805–17.
- Matsuda, S., Kitagishi, Y. & Kobayashi, M. (2013). Function and characteristics of PINK1 in mitochondria. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 601587.
- Matsui, H., Gavinio, R. & Takahashi, R. (2012). Medaka Fish Parkinson ' s Disease Model **21**, 94–100.
- Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* **296**, 301–5.
- McCormack, A.L., Atienza, J.G., Johnston, L.C., Andersen, J.K., Vu, S. & Di Monte, D.A. (2005). Role of oxidative stress in paraquat-induced dopaminergic cell degeneration. *J. Neurochem.* **93**, 1030–7.
- McCormack, A.L., Mak, S.K. & Di Monte, D.A. (2012). Increased  $\alpha$ -synuclein phosphorylation and nitration in the aging primate substantia nigra. *Cell Death Dis.* **3**, e315.

- McGeer, P.L., Itagaki, S., Boyes, B.E. & McGeer, E.G. (1988a). Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* **38**, 1285–91.
- McGeer, P.L., Itagaki, S. & McGeer, E.G. (1988b). Expression of the histocompatibility glycoprotein HLA-DR in neurological disease. *Acta Neuropathol.* **76**, 550–7.
- McGeer, P.L., Itagaki, S., Tago, H. & McGeer, E.G. (1987). Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR. *Neurosci. Lett.* **79**, 195–200.
- McGeer, P.L. & McGeer, E.G. (2002). Innate immunity, local inflammation, and degenerative disease. *Sci. Aging Knowledge Environ.* **2002**, re3.
- Menza, M., Dobkin, R.D., Marin, H., Mark, M.H., Gara, M., Bienfait, K., Dicke, A. & Kusnekov, A. (2010). The role of inflammatory cytokines in cognition and other non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Psychosomatics* **51**, 474–9.
- Migliore, L., Petrozzi, L., Lucetti, C., Gambaccini, G., Bernardini, S., Scarpato, R., Trippi, F., Barale, R., Frenzilli, G., Rodilla, V. & Bonuccelli, U. (2002). Oxidative damage and cytogenetic analysis in leukocytes of Parkinson's disease patients. *Neurology* **58**, 1809–15.
- Mihara, T., Nakashima, M., Kuroiwa, A., Akitake, Y., Ono, K., Hosokawa, M., Yamada, T. & Takahashi, M. (2008). Natural killer cells of Parkinson's disease patients are set up for activation: a possible role for innate immunity in the pathogenesis of this disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* **14**, 46–51.
- Mildner, A., Schmidt, H., Nitsche, M., Merkler, D., Hanisch, U.-K., Mack, M., Heikenwalder, M., Brück, W., Priller, J. & Prinz, M. (2007). Microglia in the adult

- brain arise from Ly-6ChiCCR2<sup>+</sup> monocytes only under defined host conditions. *Nat. Neurosci.* **10**, 1544–53.
- Miller, K.R. & Streit, W.J. (2007). The effects of aging, injury and disease on microglial function: a case for cellular senescence. *Neuron Glia Biol.* **3**, 245–53.
- Mocko, J.B., Kern, A., Moosmann, B., Behl, C. & Hajjeva, P. (2010). Phenothiazines interfere with dopaminergic neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans* models of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **40**, 120–9.
- Mogi, M., Harada, M., Narabayashi, H., Inagaki, H., Minami, M. & Nagatsu, T. (1996). Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **211**, 13–6.
- Moisan, F., Spinosi, J., Dupupet, J.-L., Delabre, L., Mazurie, J.-L., Goldberg, M., Imbernon, E., Tzourio, C. & Elbaz, A. (2011). The relation between type of farming and prevalence of Parkinson's disease among agricultural workers in five French districts. *Mov. Disord.* **26**, 271–9.
- Mori, H., Kondo, T., Yokochi, M., Matsumine, H., Nakagawa-Hattori, Y., Miyake, T., Suda, K. & Mizuno, Y. (1998). Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q. *Neurology* **51**, 890–2.
- Moseley, T. a., Haudenschild, D.R., Rose, L. & Reddi, a. H. (2003). Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14**, 155–174.
- Mosmann, T.R. & Sad, S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* **17**, 138–46.
- Mount, M.P., Lira, A., Grimes, D., Smith, P.D., Faucher, S., Slack, R., Anisman, H., Hayley, S. & Park, D.S. (2007). Involvement of interferon-gamma in microglial-mediated loss of dopaminergic neurons. *J. Neurosci.* **27**, 3328–37.

- Murphy, A.C., Lalor, S.J., Lynch, M.A. & Mills, K.H.G. (2010). Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain. Behav. Immun.* **24**, 641–51.
- Nadeau, S. & Rivest, S. (2000). Role of microglial-derived tumor necrosis factor in mediating CD14 transcription and nuclear factor kappa B activity in the brain during endotoxemia. *J. Neurosci.* **20**, 3456–68.
- Nagatsu, T., Mogi, M., Ichinose, H. & Togari, A. (2000). Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Suppl.* 277–90.
- Napoli, I. & Neumann, H. (2009). Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience* **158**, 1030–8.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F. & Youle, R.J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* **183**, 795–803.
- Narendra, D.P., Jin, S.M., Tanaka, A., Suen, D.-F., Gautier, C.A., Shen, J., Cookson, M.R. & Youle, R.J. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol.* **8**, e1000298.
- Neher, J.J., Emrich, J. V, Fricker, M., Mander, P.K., Théry, C. & Brown, G.C. (2013). Phagocytosis executes delayed neuronal death after focal brain ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E4098–107.
- Nelson, E.L., Liang, C.L., Sinton, C.M. & German, D.C. (1996). Midbrain dopaminergic neurons in the mouse: computer-assisted mapping. *J. Comp. Neurol.* **369**, 361–71.
- Neumann, H. (2001). Control of glial immune function by neurons. *Glia* **36**, 191–9.

- Nicholas, R.S., Compston, A. & Brown, D.R. (2001). Inhibition of tumour necrosis factor-alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB p52 converts the metabolic effects of microglial-derived TNFalpha on mouse cerebellar neurones to neurotoxicity. *J. Neurochem.* **76**, 1431–8.
- Nichols, W.C., Pankratz, N., Hernandez, D., Paisán-Ruíz, C., Jain, S., Halter, C.A., Michaels, V.E., Reed, T., Rudolph, A., Shults, C.W., Singleton, A. & Foroud, T. (2005). Genetic screening for a single common LRRK2 mutation in familial Parkinson ' s disease. *Lancet* **365**, 410–2.
- Nie, K., Zhang, Y., Gan, R., Wang, L.L., Zhao, J., Huang, Z. & Tang, H. (2013). Polymorphisms in immune/inflammatory cytokine genes are related to Parkinson's disease with cognitive impairment in the Han Chinese population. *Neurosci. Lett.* **541**, 111–5.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* **308**, 1314–8.
- Nishi, T., Maier, C.M., Hayashi, T., Saito, A. & Chan, P.H. (2005). Superoxide dismutase 1 overexpression reduces MCP-1 and MIP-1 alpha expression after transient focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **25**, 1312–24.
- Niwa, F., Kuriyama, N., Nakagawa, M. & Imanishi, J. (2012). Effects of peripheral lymphocyte subpopulations and the clinical correlation with Parkinson's disease. *Geriatr. Gerontol. Int.* **12**, 102–7.
- Noack, M. & Miossec, P. (2014). Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun. Rev.* **13**, 668–677.
- Noelker, C., Morel, L., Lescot, T., Osterloh, A., Alvarez-Fischer, D., Breloer, M., Henze, C., Depboylu, C., Skrzydelski, D., Michel, P.P., Dodel, R.C., Lu, L., Hirsch, E.C., Hunot, S. & Hartmann, A. (2013). Toll like receptor 4 mediates cell death in a mouse MPTP model of Parkinson disease. *Sci. Rep.* **3**, 1393.

- Oaks, A.W., Frankfurt, M., Finkelstein, D.I. & Sidhu, A. (2013). Age-dependent effects of A53T alpha-synuclein on behavior and dopaminergic function. *PLoS One* **8**, e60378.
- Obeso, J. a, Marin, C., Rodriguez-Oroz, C., Blesa, J., Benitez-Temiño, B., Mena-Segovia, J., Rodríguez, M. & Olanow, C.W. (2008). The basal ganglia in Parkinson's disease: current concepts and unexplained observations. *Ann. Neurol.* **64 Suppl 2**, S30–46.
- Ohtsuki, S. (2004). New aspects of the blood – brain barrier transporters; its physiological roles in the central nervous system. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 1489–96.
- Olney, J.W. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* **164**, 719–21.
- Oppenheimer-Marks, N., Davis, L.S., Bogue, D.T., Ramberg, J. & Lipsky, P.E. (1991). Differential utilization of ICAM-1 and VCAM-1 during the adhesion and transendothelial migration of human T lymphocytes. *J. Immunol.* **147**, 2913–21.
- Orr, C.F., Rowe, D.B., Mizuno, Y., Mori, H. & Halliday, G.M. (2005). A possible role for humoral immunity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Brain* **128**, 2665–74.
- Ossowska, K., Smiałowska, M., Kuter, K., Wierońska, J., Zieba, B., Wardas, J., Nowak, P., Dabrowska, J., Bortel, a, Biedka, I., Schulze, G. & Rommelspacher, H. (2006). Degeneration of dopaminergic mesocortical neurons and activation of compensatory processes induced by a long-term paraquat administration in rats: implications for Parkinson's disease. *Neuroscience* **141**, 2155–65.

- Ossowska, K., Wardas, J., Kuter, K., Nowak, P., Dabrowska, J., Bortel, A., Labus, Ł., Kwieciński, A., Krygowska-Wajs, A. & Wolfarth, S. (2005). Influence of paraquat on dopaminergic transporter in the rat brain. *Pharmacol. reports* **57**, 330–5.
- Oswald, I.P., Caspar, P., Jankovic, D., Wynn, T.A., Pearce, E.J. & Sher, A. (1994). IL-12 inhibits Th2 cytokine responses induced by eggs of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* **153**, 1707–13.
- Ouchi, Y., Yoshikawa, E., Sekine, Y., Futatsubashi, M., Kanno, T., Ogosu, T. & Torizuka, T. (2005). Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **57**, 168–75.
- Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D. & Gross, C.T. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* **333**, 1456–8.
- Papachroni, K.K., Ninkina, N., Papapanagiotou, A., Hadjigeorgiou, G.M., Xiromerisiou, G., Papadimitriou, A., Kalofoutis, A. & Buchman, V.L. (2007). Autoantibodies to alpha-synuclein in inherited Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **101**, 749–56.
- Parent, A. & Hazrati, L.-N. (1995). Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop **20**, 91–127.
- Parr-Brownlie, L.C. & Hyland, B.I. (2005). Bradykinesia induced by dopamine D2 receptor blockade is associated with reduced motor cortex activity in the rat. *J. Neurosci.* **25**, 5700–9.
- Pechkovsky, D. V, Prasse, A., Kollert, F., Engel, K.M.Y., Dentler, J., Luttmann, W., Friedrich, K., Müller-Quernheim, J. & Zissel, G. (2010). Alternatively activated alveolar macrophages in pulmonary fibrosis-mediator production and intracellular signal transduction. *Clin. Immunol.* **137**, 89–101.

- Perry, V.H., Cunningham, C. & Holmes, C. (2007). Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 161–7.
- Peterson, J.W., Bö, L., Mörk, S., Chang, A. & Trapp, B.D. (2001). Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.* **50**, 389–400.
- Petito, C.K., Adkins, B., McCarthy, M., Roberts, B. & Khamis, I. (2003). CD4+ and CD8+ cells accumulate in the brains of acquired immunodeficiency syndrome patients with human immunodeficiency virus encephalitis. *J. Neurovirol.* **9**, 36–44.
- Petito, C.K., Torres-Muñoz, J.E., Zielger, F. & McCarthy, M. (2006). Brain CD8+ and cytotoxic T lymphocytes are associated with, and may be specific for, human immunodeficiency virus type 1 encephalitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J. Neurovirol.* **12**, 272–83.
- Pezzoli, G. & Cereda, E. (2013). Exposure to pesticides or solvents and risk of Parkinson disease. *Neurology* **80**, 2035–41.
- Pifl, C., Kish, S.J. & Hornykiewicz, O. (2012). Thalamic noradrenaline in Parkinson's disease: deficits suggest role in motor and non-motor symptoms. *Mov. Disord.* **27**, 1618–24.
- Plowman, E.K. & Kleim, J. a. (2011). Behavioral and neurophysiological correlates of striatal dopamine depletion: a rodent model of Parkinson's disease. *J. Commun. Disord.* **44**, 549–56.
- Polymeropoulos, M.H. (1997). Mutation in the -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science (80-. )*. **276**, 2045–2047.

- Pramstaller, P.P., Schlossmacher, M.G., Jacques, T.S., Scaravilli, F., Eskelson, C., Pepivani, I., Hedrich, K., Adel, S., Gonzales-McNeal, M., Hilker, R., Kramer, P.L. & Klein, C. (2005). Lewy body Parkinson's disease in a large pedigree with 77 Parkin mutation carriers. *Ann. Neurol.* **58**, 411–22.
- Del Prete, G. (1992). Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy* **47**, 450–5.
- Qian, B.-Z. & Pollard, J.W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**, 39–51.
- Qian, L., Block, M.L., Wei, S.-J., Lin, C.-F., Reece, J., Pang, H., Wilson, B., Hong, J.-S. & Flood, P.M. (2006a). Interleukin-10 protects lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in primary midbrain cultures by inhibiting the function of NADPH oxidase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **319**, 44–52.
- Qian, L., Hong, J.S. & Flood, P.M. (2006b). Role of microglia in inflammation-mediated degeneration of dopaminergic neurons: neuroprotective effect of interleukin 10. *J. Neural Transm. Suppl.* 367–71.
- Quintin, J., Cheng, S.-C., van der Meer, J.W. & Netea, M.G. (2014). Innate immune memory: towards a better understanding of host defense mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* **29C**, 1–7.
- Raivich, G. (2005). Like cops on the beat: the active role of resting microglia. *Trends Neurosci.* **28**, 571–3.
- Ransohoff, R.M. & Cardona, A.E. (2010). The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature* **468**, 253–62.
- Ransohoff, R.M. & Perry, V.H. (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 119–45.

- Rappold, P.M., Cui, M., Chesser, A.S., Tibbett, J., Grima, J.C., Duan, L., Sen, N., Javitch, J.A. & Tieu, K. (2011). Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 20766–71.
- Ravichandran, K.S. (2010). Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *J. Exp. Med.* **207**, 1807–17.
- Reale, M., Iarlori, C., Thomas, a, Gambi, D., Perfetti, B., Di Nicola, M. & Onofri, M. (2009). Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. *Brain. Behav. Immun.* **23**, 55–63.
- Ren, J., Zhao, Y. & Sun, X. (2009). Toxic influence of chronic oral administration of paraquat on nigrostriatal dopaminergic neurons in C57BL/6 mice. *Chin. Med. J. (Engl)*. **122**, 2366–71.
- Reynolds, A.D., Banerjee, R., Liu, J., Gendelman, H.E. & Mosley, R.L. (2007). Neuroprotective activities of CD4+CD25+ regulatory T cells in an animal model of Parkinson's disease. *J. Leukoc. Biol.* **82**, 1083–94.
- Reynolds, A.D., Kadiu, I., Garg, S.K., Glanzer, J.G., Nordgren, T., Ciborowski, P., Banerjee, R. & Gendelman, H.E. (2008). Nitrated alpha-synuclein and microglial neuroregulatory activities. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **3**, 59–74.
- Reynolds, A.D., Stone, D.K., Hutter, J.A.L., Benner, E.J., Lee, R. & Gendelman, H.E. (2010). Regulatory T cells attenuate Th17 cell-mediated nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in a model of Parkinson's disease **184**, 2261–2271.
- Reynolds, A.D., Stone, D.K., Mosley, R.L. & Gendelman, H.E. (2009a). Proteomic Studies of Nitrated Alpha-Synuclein Microglia Regulation by CD4+CD25+ T Cells. *J. Proteome Res.* **8**, 3497–511.

- Reynolds, A.D., Stone, D.K., Mosley, R.L. & Gendelman, H.E. (2009b). Nitrated {alpha}-synuclein-induced alterations in microglial immunity are regulated by CD4+ T cell subsets. *J. Immunol.* **182**, 4137–49.
- Risau, W., Engelhardt, B. & Wekerle, H. (1990). Immune function of the blood-brain barrier: incomplete presentation of protein (auto-)antigens by rat brain microvascular endothelium in vitro. *J. Cell Biol.* **110**, 1757–66.
- Rodriguez, M., Alvarez-Erviti, L., Blesa, F.J., Rodríguez-Oroz, M.C., Arina, A., Melero, I., Ramos, L.I. & Obeso, J.A. (2007). Bone-marrow-derived cell differentiation into microglia: a study in a progressive mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **28**, 316–25.
- Roeling, T.A., Docter, G.J., Voorn, P., Melchers, B.P., Wolters, E.C. & Groenewegen, H.J. (1995). Effects of unilateral 6-hydroxydopamine lesions on neuropeptide immunoreactivity in the basal ganglia of the common marmoset, *Callithrix jacchus*, a quantitative immunohistochemical analysis. *J. Chem. Neuroanat.* **9**, 155–64.
- Rogers, J., Strohmeyer, R., Kovelowski, C.J. & Li, R. (2002). Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia* **40**, 260–9.
- Rogers, T.L. & Holen, I. (2011). Tumour macrophages as potential targets of bisphosphonates. *J. Transl. Med.* **9**, 177.
- Roodveldt, C., Labrador-Garrido, A., Gonzalez-Rey, E., Lachaud, C.C., Guilliams, T., Fernandez-Montesinos, R., Benitez-Rondan, A., Robledo, G., Hmadcha, A., Delgado, M., Dobson, C.M. & Pozo, D. (2013). Preconditioning of microglia by  $\alpha$ -synuclein strongly affects the response induced by toll-like receptor (TLR) stimulation. *PLoS One* **8**, e79160.

- Rosenkranz, D., Weyer, S., Tolosa, E., Gaenslen, A., Berg, D., Leyhe, T., Gasser, T. & Stoltze, L. (2007). Higher frequency of regulatory T cells in the elderly and increased suppressive activity in neurodegeneration. *J. Neuroimmunol.* **188**, 117–27.
- S, P. & M, V. (n.d.). The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease.
- Sachs, C. & Jonsson, G. (1975). Effects of 6-hydroxydopamine on central noradrenaline neurons during ontogeny. *Brain Res.* **99**, 277–91.
- Salamone, J.D. & Correa, M. (2012). The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine. *Neuron* **76**, 470–85.
- Samaranch, L., Lorenzo-Betancor, O., Arbelo, J.M., Ferrer, I., Lorenzo, E., Irigoyen, J., Pastor, M. a, Marrero, C., Isla, C., Herrera-Henriquez, J. & Pastor, P. (2010). PINK1-linked parkinsonism is associated with Lewy body pathology. *Brain* **133**, 1128–42.
- Sanchez-Guajardo, V., Febbraro, F., Kirik, D. & 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.
- Sang, T.-K., Chang, H.-Y., Lawless, G.M., Ratnaparkhi, A., Mee, L., Ackerson, L.C., Maidment, N.T., Krantz, D.E. & Jackson, G.R. (2007). A Drosophila model of mutant human parkin-induced toxicity demonstrates selective loss of dopaminergic neurons and dependence on cellular dopamine. *J. Neurosci.* **27**, 981–92.
- Sanjabi, S., Zenewicz, L.A., Kamanaka, M. & Flavell, R.A. (2009). Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr. Opin. Pharmacol.* **9**, 447–53.

- Saunders, J.A., Estes, K.A., Kosloski, L.M., Allen, H.E., Dempsey, K.M., Torres-Russotto, D.R., Meza, J.L., Santamaria, P.M., Bertoni, J.M., Murman, D.L., Ali, H.H., Standaert, D.G., Mosley, R.L. & Gendelman, H.E. (2012). CD4+ regulatory and effector/memory T cell subsets profile motor dysfunction in Parkinson's disease. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **7**, 927–38.
- Scherzer, C.R., Jensen, R. V, Gullans, S.R. & Feany, M.B. (2003). Gene expression changes presage neurodegeneration in a Drosophila model of Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 2457–66.
- Schluesener, H.J. & Wekerle, H. (1985). Autoaggressive T lymphocyte lines recognizing the encephalitogenic region of myelin basic protein: in vitro selection from unprimed rat T lymphocyte populations. *J. Immunol.* **135**, 3128–33.
- Schmid, A.W., Fauvet, B., Moniatte, M. & Lashuel, H.A. (2013). Alpha-synuclein Post-translational Modifications as Potential Biomarkers for Parkinson Disease and Other Synucleinopathies. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 3543–58.
- Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E.W., Pollard, J.W., Frampton, J., Liu, K.J. & Geissmann, F. (2012). A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* **336**, 86–90.
- Schumm, S., Sebban, C., Cohen-Salmon, C., Callebert, J., Launay, J.-M., Golmard, J.-L., Boussicault, L., Petropoulos, I., Hild, A., Rousselet, E., Prigent, A., Friguet, B., Mariani, J. & Hirsch, E.C. (2012). Aging of the dopaminergic system and motor behavior in mice intoxicated with the parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J. Neurochem.* **122**, 1032–46.
- Schwartz, M., Butovsky, O., Brück, W. & Hanisch, U.-K. (2006). Microglial phenotype: is the commitment reversible? *Trends Neurosci.* **29**, 68–74.

- Schwartz, M. & Kipnis, J. (2005). Protective autoimmunity and neuroprotection in inflammatory and noninflammatory neurodegenerative diseases. *J. Neurol. Sci.* **233**, 163–6.
- Schwartz, M. & Kipnis, J. (2011). A conceptual revolution in the relationships between the brain and immunity. *Brain. Behav. Immun.* **25**, 817–9.
- Schwarz, B. a & Bhandoola, A. (2006). Trafficking from the bone marrow to the thymus: a prerequisite for thymopoiesis. *Immunol. Rev.* **209**, 47–57.
- Selenica, M.-L., Alvarez, J.A., Nash, K.R., Lee, D.C., Cao, C., Lin, X., Reid, P., Mouton, P.R., Morgan, D. & Gordon, M.N. (2013). Diverse activation of microglia by chemokine (C-C motif) ligand 2 overexpression in brain. *J. Neuroinflammation* **10**, 86.
- Selvaraj, R.K. & Geiger, T.L. (2007). A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF-beta. *J. Immunol.* **178**, 7667–77.
- Shahar, E., Goshen, E., Tauber, Z. & Lahat, E. (1998). Parkinsonian syndrome complicating systemic lupus erythematosus. *Pediatr. Neurol.* **18**, 456–8.
- Shahed, J. & Jankovic, J. (2007). Exploring the relationship between essential tremor and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* **13**, 67–76.
- Shavali, S., Combs, C.K. & Ebadi, M. (2006). Reactive macrophages increase oxidative stress and alpha-synuclein nitration during death of dopaminergic neuronal cells in co-culture: relevance to Parkinson's disease. *Neurochem. Res.* **31**, 85–94.
- Shechter, R., London, A., Varol, C., Raposo, C., Cusimano, M., Yovel, G., Rolls, A., Mack, M., Pluchino, S., Martino, G., Jung, S. & Schwartz, M. (2009). Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS Med.* **6**, e1000113.

- Sherer, T.B., Kim, J.-H., Betarbet, R. & Greenamyre, J.T. (2003). Subcutaneous Rotenone Exposure Causes Highly Selective Dopaminergic Degeneration and  $\alpha$ -Synuclein Aggregation. *Exp. Neurol.* **179**, 9–16.
- Sherer, T.B., Richardson, J.R., Testa, C.M., Seo, B.B., Panov, A. V, Yagi, T., Matsuno-Yagi, A., Miller, G.W. & Greenamyre, J.T. (2007). Mechanism of toxicity of pesticides acting at complex I: relevance to environmental etiologies of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **100**, 1469–79.
- Shimoji, M., Zhang, L., Mandir, A.S., Dawson, V.L. & Dawson, T.M. (2005). Absence of inclusion body formation in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **134**, 103–8.
- Shulman, L.M. (2007). Gender differences in Parkinson's disease. *Gend. Med.* **4**, 8–18.
- Sica, A. & Mantovani, A. (2012). Science in medicine Macrophage plasticity and polarization : in vivo veritas **122**, 787–795.
- Siddique, Y.H., Mujtaba, S.F., Jyoti, S. & Naz, F. (2013). GC-MS analysis of Eucalyptus citriodora leaf extract and its role on the dietary supplementation in transgenic Drosophila model of Parkinson's disease. *Food Chem. Toxicol.* **55**, 29–35.
- Sixt, M., Kanazawa, N., Selg, M., Samson, T., Roos, G., Reinhardt, D.P., Pabst, R., Lutz, M.B. & Sorokin, L. (2005). The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. *Immunity* **22**, 19–29.
- Sokol, C.L., Chu, N.-Q., Yu, S., Nish, S. a, Laufer, T.M. & Medzhitov, R. (2009). Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nat. Immunol.* **10**, 713–20.

- Spanaus, K.S., Schlapbach, R. & Fontana, A. (1998). TNF-alpha and IFN-gamma render microglia sensitive to Fas ligand-induced apoptosis by induction of Fas expression and down-regulation of Bcl-2 and Bcl-xL. *Eur. J. Immunol.* **28**, 4398–408.
- Springer, T.A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**, 301–14.
- Sriram, K., Miller, D.B. & O’Callaghan, J.P. (2006). Minocycline attenuates microglial activation but fails to mitigate striatal dopaminergic neurotoxicity: role of tumor necrosis factor-alpha. *J. Neurochem.* **96**, 706–18.
- St Laurent, R., O’Brien, L.M. & Ahmad, S.T. (2013). Sodium butyrate improves locomotor impairment and early mortality in a rotenone-induced *Drosophila* model of Parkinson’s disease. *Neuroscience* **246**, 382–90.
- Stephan, A.H., Barres, B.A. & Stevens, B. (2012). The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. *Annu. Rev. Neurosci.* **35**, 369–89.
- Streit, W.J., Sammons, N.W., Kuhns, A.J. & Sparks, D.L. (2004). Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia* **45**, 208–12.
- Streit, W.J. & Xue, Q.-S. (2009). Life and death of microglia. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **4**, 371–9.
- Streit, W.J. & Xue, Q.-S. (2012). Alzheimer’s disease, neuroprotection, and CNS immunosenescence. *Front. Pharmacol.* **3**, 138.
- Suen, W.E., Bergman, C.M., Hjelmström, P. & Ruddle, N.H. (1997). A critical role for lymphotoxin in experimental allergic encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* **186**, 1233–40.

- Sun, D., Ben-Nun, A. & Wekerle, H. (1988). Regulatory circuits in autoimmunity: recruitment of counter-regulatory CD8<sup>+</sup> T cells by encephalitogenic CD4<sup>+</sup> T line cells. *Eur. J. Immunol.* **18**, 1993–9.
- Swanson, L.W. (1982). The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res. Bull.* **9**, 321–53.
- Tadaiesky, M.T., Dombrowski, P.A., Figueiredo, C.P., Cargnin-Ferreira, E., Da Cunha, C. & Takahashi, R.N. (2008). Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience* **156**, 830–40.
- Takahashi, K., Prinz, M., Stagi, M., Chechneva, O. & Neumann, H. (2007). TREM2-transduced myeloid precursors mediate nervous tissue debris clearance and facilitate recovery in an animal model of multiple sclerosis. *PLoS Med.* **4**, e124.
- Takeuchi, O. & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805–20.
- Tan, E.K., Chan, L.L. & Auchus, A.P. (2001). Reversible parkinsonism in systemic lupus erythematosus. *J. Neurol. Sci.* **193**, 53–7.
- Tan, J., Town, T., Paris, D., Placzek, a, Parker, T., Crawford, F., Yu, H., Humphrey, J. & Mullan, M. (1999). Activation of microglial cells by the CD40 pathway: relevance to multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **97**, 77–85.
- Tanner, C.M., Kamel, F., Ross, G.W., Hoppin, J.A., Goldman, S.M., Korell, M., Marras, C., Bhudhikanok, G.S., Kasten, M., Chade, A.R., Comyns, K., Richards, M.B., Meng, C., Priestley, B., Fernandez, H.H., Cambi, F., Umbach, D.M., Blair, A., Sandler, D.P. & Langston, J.W. (2011). Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ. Health Perspect.* **119**, 866–72.

- Tansey, M.G. & Goldberg, M.S. (2010). Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol. Dis.* **37**, 510–8.
- Tao, X., Constant, S., Jorritsma, P. & Bottomly, K. (1997). Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> T cell differentiation. *J. Immunol.* **159**, 5956–63.
- Tauzin, S., Debure, L., Moreau, J.-F. & Legembre, P. (2012). CD95-mediated cell signaling in cancer: mutations and post-translational modulations. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 1261–77.
- Teismann, P., Tieu, K., Cohen, O., Choi, D.-K., Wu, D.C., Marks, D., Vila, M., Jackson-Lewis, V. & Przedborski, S. (2003). Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **18**, 121–9.
- Tepper, J.M., Abercrombie, E.D. & Bolam, J.P. (2007). Basal ganglia macrocircuits. *Prog. Brain Res.* **160**, 3–7.
- Thomas, B. & Beal, M.F. (2007). Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* **16**, R183–94.
- Togo, T., Akiyama, H., Iseki, E., Kondo, H., Ikeda, K., Kato, M., Oda, T., Tsuchiya, K. & Kosaka, K. (2002). Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *J. Neuroimmunol.* **124**, 83–92.
- Tolosa, E., Marti, M.J., Valldeoriola, F. & Molinuevo, J.L. (1998). History of levodopa and dopamine agonists in Parkinson's disease treatment. *Neurology* **50**, S2–S10.
- Town, T., Bai, F., Wang, T., Kaplan, A.T., Qian, F., Montgomery, R., Anderson, J.F., Flavell, R.A. & Fikrig, E. (2009). Toll-like receptor 7 Mitigates lethal west nile

- encephalitis via interleukin 23-dependent immune cell infiltration and homing **30**, 242–53.
- Trapani, J. a & Smyth, M.J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 735–47.
- Tremblay, M.-È. & Majewska, A.K. (2011). A role for microglia in synaptic plasticity? *Commun. Integr. Biol.* **4**, 220–2.
- Trinchieri, G., Pflanz, S. & Kastelein, R. a. (2003). The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* **19**, 641–4.
- Vallone, D., Picetti, R. & Borrelli, E. (2000). Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **24**, 125–32.
- Varnum, M.M. & Ikezu, T. (2012). The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease brain. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **60**, 251–66.
- Vázquez-Claverie, M., Garrido-Gil, P., San Sebastián, W., Izal-Azcárate, A., Belzunegui, S., Marcilla, I., López, B. & 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. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **68**, 977–84.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M. & Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**, 179–89.
- Verreck, F. a W., de Boer, T., Langenberg, D.M.L., Hoeve, M. a, Kramer, M., Vaisberg, E., Kastelein, R., Kolk, A., de Waal-Malefyt, R. & Ottenhoff, T.H.M. (2004). Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-

- producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 4560–5.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **9**, 503–10.
- Vogt, J., Paul, F., Aktas, O., Müller-Wielsch, K., Dörr, J., Dörr, S., Bharathi, B.S., Glumm, R., Schmitz, C., Steinbusch, H., Raine, C.S., Tsokos, M., Nitsch, R. & Zipp, F. (2009). Lower motor neuron loss in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann. Neurol.* **66**, 310–22.
- Vriend, C., Pattij, T., van der Werf, Y.D., Voorn, P., Booij, J., Rutten, S., Berendse, H.W. & van den Heuvel, O.A. (2014). Depression and impulse control disorders in Parkinson's disease: Two sides of the same coin? *Neurosci. Biobehav. Rev.* **38**, 60–71.
- Wahl, S.M. (2007). Transforming growth factor-beta: innately bipolar. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 55–62.
- Wakselman, S., Béchade, C., Roumier, A., Bernard, D., Triller, A. & Bessis, A. (2008). Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *J. Neurosci.* **28**, 8138–43.
- Wan, Y.Y. (2014). GATA3: a master of many trades in immune regulation. *Trends Immunol.*
- Wang, T., Anderson, J.F., Magnarelli, L.A., Wong, S.J., Koski, R.A. & Fikrig, E. (2001). Immunization of mice against West Nile virus with recombinant envelope protein. *J. Immunol.* **167**, 5273–7.
- Wang, T., Scully, E., Yin, Z., Kim, J.H., Yan, J., Mamula, M., Anderson, J.F., Craft, J., Wang, S. & Fikrig, E. (2003). IFN- $\gamma$ -Producing  $\gamma\delta$  T Cells Help Control Murine West Nile Virus Infection.

- Wang, T., Town, T., Alexopoulou, L., Anderson, J.F., Fikrig, E. & Flavell, R. a. (2004). Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat. Med.* **10**, 1366–73.
- Wang, X. & Michaelis, E.K. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front. Aging Neurosci.* **2**, 12.
- Wang, X.-J., Ye, M., Zhang, Y.-H. & Chen, S.-D. (2007). CD200-CD200R regulation of microglia activation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **2**, 259–64.
- Watson, M.B., Richter, F., Lee, S.K., Gabby, L., Wu, J., Masliah, E., Effros, R.B. & Chesselet, M.-F. (2012). Regionally-specific microglial activation in young mice over-expressing human wildtype alpha-synuclein. *Exp. Neurol.* **237**, 318–34.
- Waxman, E.A. & Giasson, B.I. (2009). Molecular Mechanisms of  $\alpha$ -Synuclein Neurodegeneration **1792**, 616–624.
- Weaver, C.T., Harrington, L.E., Mangan, P.R., Gavrieli, M. & Murphy, K.M. (2006). Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* **24**, 677–88.
- Weetman, J., Wong, M.B., Sharry, S., Rcom-H'cheo-Gauthier, a, Gai, W.P., Meedeniya, a & Pountney, D.L. (2013). Increased SUMO-1 expression in the unilateral rotenone-lesioned mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **544**, 119–24.
- Winner, B., Jappelli, R., Maji, S.K., Desplats, P.A., Boyer, L. & Aigner, S. (2011). In vivo demonstration that  $\alpha$  -synuclein oligomers are toxic.

- Wirdefeldt, K., Adami, H.-O., Cole, P., Trichopoulos, D. & Mandel, J. (2011a). Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur. J. Epidemiol.* **26 Suppl 1**, S1–58.
- Wirdefeldt, K., Adami, H.-O., Cole, P., Trichopoulos, D. & Mandel, J. (2011b). Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur. J. Epidemiol.* **26 Suppl 1**, S1–58.
- Wirth, T., Westendorf, A.M., Bloemker, D., Wildmann, J., Engler, H., Mollerus, S., Wadwa, M., Schäfer, M.K.-H., Schedlowski, M. & Del Rey, A. (2014). The sympathetic nervous system modulates CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells via noradrenaline-dependent apoptosis in a murine model of lymphoproliferative disease. *Brain. Behav. Immun.* **38**, 100–110.
- Wraith, D.C., Nicolson, K.S. & Whitley, N.T. (2004). Regulatory CD4+ T cells and the control of autoimmune disease. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 695–701.
- Wucherpfennig, K.W. & Strominger, J.L. (1995). Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* **80**, 695–705.
- Wuest, T.Y., Willette-Brown, J., Durum, S.K. & Hurwitz, A.A. (2008). The influence of IL-2 family cytokines on activation and function of naturally occurring regulatory T cells. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 973–80.
- Xiang, W., Schlachetzki, J.C.M., Helling, S., Bussmann, J.C., Berlinghof, M., Schäffer, T.E., Marcus, K., Winkler, J., Klucken, J. & Becker, C.-M. (2013). Oxidative stress-induced posttranslational modifications of alpha-synuclein: specific modification of alpha-synuclein by 4-hydroxy-2-nonenal increases dopaminergic toxicity. *Mol. Cell. Neurosci.* **54**, 71–83.
- Yang, J.-Y. & Yang, W.Y. (2013). Bit-by-bit autophagic removal of parkin-labelled mitochondria. *Nat. Commun.* **4**, 2428.

- Yang, T.-T., Lin, C., Hsu, C.-T., Wang, T.-F., Ke, F.-Y. & Kuo, Y.-M. (2013a). Differential distribution and activation of microglia in the brain of male C57BL/6J mice. *Brain Struct. Funct.* **218**, 1051–60.
- Yang, Y.-M., Shang, D.-S., Zhao, W.-D., Fang, W.-G. & Chen, Y.-H. (2013b). Microglial TNF- $\alpha$ -dependent elevation of MHC class I expression on brain endothelium induced by amyloid-beta promotes T cell transendothelial migration. *Neurochem. Res.* **38**, 2295–304.
- Youle, R.J. & Narendra, D.P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 9–14.
- Zhang, J., Markovic-Plese, S., Lacet, B., Raus, J., Weiner, H.L. & Hafler, D.A. (1994). Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* **179**, 973–84.
- Zhang, L., Kaizuka, Y. & Hanagata, N. (2012). Imaging of Fas-FasL membrane microdomains during apoptosis in a reconstituted cell-cell junction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **422**, 298–304.
- Zhang, L., Karsten, P., Hamm, S., Pogson, J.H., Müller-Rischart, A.K., Exner, N., Haass, C., Whitworth, A.J., Winklhofer, K.F., Schulz, J.B. & Voigt, A. (2013). TRAP1 rescues PINK1 loss-of-function phenotypes. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 2829–41.
- Zhang, W.W., Wang, T., Pei, Z., Miller, D.S., Wu, X., Block, M.L., Wilson, B., Zhou, Y., Hong, J.-S. & Zhang, J. (2005). Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J.* **19**, 533–42.

- Zhao, C., Ling, Z., Newman, M.B., Bhatia, A. & Carvey, P.M. (2007). TNF-alpha knockout and minocycline treatment attenuates blood-brain barrier leakage in MPTP-treated mice. *Neurobiol. Dis.* **26**, 36–46.
- Zhao, W., Xie, W., Xiao, Q., Beers, D.R. & Appel, S.H. (2006). Protective effects of an anti-inflammatory cytokine, interleukin-4, on motoneuron toxicity induced by activated microglia. *J. Neurochem.* **99**, 1176–87.
- Zhou, L., Lopes, J.E., Chong, M.M.W., Ivanov, I.I., Min, R., Gabriel, D., Shen, Y., Du, J., Rubtsov, Y.P., Rudensky, A.Y., Ziegler, F. & Littman, D.R. (2008). TGF- $\beta$  - induced Foxp3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing ROR  $\gamma$  t function **453**, 236–240.
- Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Uitti, R.J., Calne, D.B., Stoessl, a J., Pfeiffer, R.F., Patenge, N., Carbajal, I.C., Vieregge, P., Asmus, F., Müller-Myhsok, B., Dickson, D.W., Meitinger, T., Strom, T.M., Wszolek, Z.K. & Gasser, T. (2004). Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* **44**, 601–7.