UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE DE LILLE II
FACULTE DE MEDECINE

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE
En Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie, Spécialité Neurosciences

Présentée par
Eugénie MUTEZ

Apport du transcriptome des cellules mononucléées sanguines à l'étude de cas familiaux et sporadiques atteints de la maladie de Parkinson

Présentée le 30 novembre 2011, devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Pascal Derkinderen	**Rapporteur**
Monsieur le Docteur Erwan Bezard	**Rapporteur**
Monsieur le Professeur Charles Duyckaerts	**Examinateur**
Monsieur le Professeur Alain Destée	**Président du jury**
Madame le Docteur Marie-Christine Chartier-Harlin	**Directrice de thèse**

Monsieur le Professeur Derkinderen

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Je suis remercie de votre enthousiasme pour la tâche de rapporteur. Je vous prie de croire en mon profond respect et ma sincère estime.

Monsieur le Docteur Bezard

Votre venue en tant que rapporteur m'honore. Je suis sensible à l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail. Je vous prie de croire en ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur Duyckaerts

Je suis honorée de l'intérêt que vous avez porté à ce travail et vous remercie d'avoir accepté de participer à mon jury. Je vous prie de croire en ma profonde considération.

Monsieur le Professeur Destée

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites de présider ce jury de thèse. Je tiens chaleureusement à vous remercier pour m'avoir accueilli dans votre service et votre unité de recherche. Je vous remercie également de me permettre de poursuivre mes activités dans le service. Veuillez accepter ma profonde reconnaissance et toute mon estime.

Madame le Docteur Chartier-Harlin

Je te remercie vivement pour avoir encadré cette seconde thèse. Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et ton écoute. Reçois ici l'expression de ma profonde gratitude pour ton enseignement et l'accueil que tu m'as réservé au sein du laboratoire. Puisse notre collaboration se poursuivre de façon aussi fructueuse à l'avenir.

Ce travail est le fruit de nombreuses années de recherches et de discussion impliquant de nombreuses personnes.

« C'est dans la confrontation des idées que naissent les découvertes » MCCH, 2011

Je tiens à remercier les membres actuels et passés de l'unité UMR837 INSERM, Equipe 6 (anciennement EA2683) pour leur accueil, leurs conseils et leur bonne humeur (Pr Alain Destée, Dr Marie-Christine Chartier-Harlin, Vincent Mouroux, Aurélie Duflot, Dr Lydie Larvor, Dr Frédéric Leprêtre, Dr Christel Vanbesien-Mailliot, Dr Alexandre Kreisler, Dr Clémence Simonin, Dr Clothilde Levecque, Pierre Semaille, Thomas Comptdaer).

Je remercie l'équipe du service de Neurologie et Pathologie du Mouvement du CHRU de Lille du Professeur Alain Destée pour son aide au recrutement et à l'évaluation des sujets ainsi que les infirmières et les secrétaires du service pour leur aide technique et logistique.

Je remercie les différentes personnes qui m'ont précédée et qui continuent à participer au recrutement des cohortes : Dr Nawal Waucquier, Dr Jean-Philippe Legendre, Dr Emilie Le Rhun, Dr Séverine Bleuse, Dr Xavier Douay, Dr Serge Brique, Dr Estelle Becquet, Dr Delphine Prince, Dr Dorota Hamalek et Dr Bernard Frigard.

Je remercie le personnel des plateformes : Dr Jean-Pierre Kerckaert, Dr Martin Figeac, Dr Frédéric Leprêtre, Sabine Quief, Céline Villenet, Dr David Hot, Renaud Blervaque.

Je remercie le Pr Bernard Sablonnière et Alexandre Genet pour leur collaboration à l'étude SCA2.

Je remercie les équipes de l'IRCL et du centre JPArc.

Je remercie enfin les patients et leurs familles.

Et j'en oublie certainement…

Ce travail a été réalisé au sein de l'unité UMR 837 INSERM - JPArc Equipe 6
« Evénements moléculaires associés aux stades précoces de la maladie de Parkinson »
dirigée par le Professeur Alain Destée

Ce travail a donné lieu aux publications et communications suivantes :

Publications

A Destée, **E Mutez,** A Kreisler, C Vanbesien-Mailliot, MC Chartier-Harlin. Parkinson disease: genetics and neuronal death. *Rev Neurol (Paris)* 2009;165:F80-85.

E Mutez, L Larvor, F Leprêtre, V Mouroux, D Hamalek, JP Kerckaert, J Pérez-Tur, N Waucquier, C Vanbesien-Mailliot, A Duflot, D Devos, L Defebvre, A Kreisler, B Frigard, A Destée, MC Chartier-Harlin. Transcriptional profile of Parkinson blood mononuclear cells with LRRK2 mutation. *Neurobiol Aging*. 2011;32(10):1839-1848.

E Mutez, F Leprêtre, E Le Rhun, L Larvor, A Duflot, V Mouroux, JP Kerckaert, K Dujardin, A Destée, MC Chartier-Harlin. SNCA locus duplication carriers: from genetics to Parkinson's disease phenotypes. *Hum Mutat.* 2011;32(4):E2079-2090.

Communications orales

E Mutez, A Duhamel, B Sablonnière, JP Legendre, N Waucquier, A Destée, MC Chartier-Harlin. La maladie de Parkinson : étude d'une cohorte de cas familiaux et sporadiques. Journée Nationale des Internes de Neurologie, Paris 2009.

E Mutez, L Larvor, F Leprêtre, V Mouroux, D Hamalek, JP Kerckaert, J Pérez-Tur, N Waucquier, C Vanbesien-Mailliot, A Duflot, D Devos, L Defebvre, A Kreisler, B Frigard, A Destée, MC Chartier-Harlin. Etude transcriptomique de cellules mononucléées sanguines de patients parkinsoniens porteurs de la mutation G2019S de LRRK2. Journée de Recherche Clinique de la Société Française de Neurologie, Paris 2010.

E Mutez, C Vanbesien-Mailliot, A Kreisler, A Duflot, V Mouroux, A Destée, MC Chartier-Harlin. Phenotypic and molecular characterization of sporadic and familial Parkinson's disease subjects. Journée des doctorants JPArc, Lille 2010.

E Mutez, L Larvor, F Leprêtre, V Mouroux, C Vanbesien-Mailliot, A Duflot, D Devos, L Defebvre, A Kreisler, A Destée, MC Chartier-Harlin. Impact de la mutation G2019S du gène LRRK2 sur les cellules mononucléées sanguines de patients parkinsoniens. Journée DN2M (Dementia in Neurological and Mental Disorders), Lille 2010.

C Simonin*, **E Mutez***, B Sablonnière, A Duflot, M Figeac, F Leprêtre, L Defebvre, A Kreisler, C Vanbesien, D Devos, B Frigard, A Destée, MC Chartier-Harlin. Transcriptome profiling of blood mononuclear cells from SCA2 patients according to cerebellar or parkinsonian phenotypes. 63rd Annual Meeting of the American Academy of Neurology Congress, Hawaï 2011.
* Participation égale

Communications affichées

E Mutez, L Larvor, F Leprêtre, V Mouroux, A Destée, MC Chartier-Harlin. Etude transcriptomique de cellules mononucléées sanguines de patients parkinsoniens porteurs de la mutation G2019S de LRRK2. 13èmes Journées de Neurologie de Langue Française, Lille 2009.

MC Chartier-Harlin, **E Mutez**, V Mouroux, A Duhamel, J Salleron, CC Vanbesien-Mailliot, A Duflot, F Leprêtre, N Waucquier, JP Legendre, L Defebvre, I Vuillaume, B Sablonnière, A Kreisler, A Destée. Descriptive study of a cohort of 593 probable Parkinsonian patients from North of France. 9ème Colloque de la Société des Neurosciences, Bordeaux 2009.

E Mutez, C Vanbesien-Mailliot, A Kreisler, A Duflot, A Destée, MC Chartier-Harlin. Deregulation of immune system pathways in peripheral blood cells of parkinsonian patients. 13th Movement Disorders Congress, Paris 2009 et 14ème Congrès du Réseau LARC-Neurosciences, Lille 2010.

E Mutez, L Larvor, CC Vanbesien-Mailliot, V Mouroux, A Destée, MC Chartier-Harlin. Decreased expression of alpha-synuclein isoforms in peripheral blood cells of sporadic parkinsonian patients. 13th Movement Disorders Congress, Paris 2009 et 14ème Congrès du Réseau LARC-Neurosciences, Lille 2010.

E Mutez, CC Vanbesien-Mailliot, A Kreisler, A Duflot, A Destée, MC Chartier-Harlin. Caractérisation phénotypique et moléculaire de cas familiaux et sporadiques de sujets atteints par une maladie de Parkinson. 10ème Journée André Verbert, Lille 2010.

E Mutez, L Larvor, A Duflot, C Vanbesien, V Mouroux, A Destée, MC Chartier-Harlin. Expression of alpha-synuclein isoforms in familial and sporadic Parkinson's disease. 15th Movement Disorders Congress, Toronto 2011.

E Mutez, A Duflot, M Figeac, D Hot, R Blervaque, C Vanbesien, P Semaille, C Simonin, A Kreisler, A Destée, MC Chartier-Harlin. Deregulation of gene expression in peripheral blood mononuclear cells at different stages of Parkinson's disease. WFN 18th World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders, Shanghai 2011.

C Simonin*, **E Mutez***, B Sablonnière, A Duflot, M Figeac, F Leprêtre, L Defebvre, A Kreisler, C Vanbesien, D Devos, B Frigard, A Destée, MC Chartier-Harlin. Transcriptome profiling of blood mononuclear cells from SCA2 patients according to cerebellar or parkinsonian phenotypes. WFN 18th World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders, Shanghai 2011.
* Participation égale

Dépôt de brevet

MC Chartier-Harlin, **E Mutez**, E Le Rhun, L Larvor, V Mouroux, A Destée. Méthode de détection de l'expression différentielle d'un ensemble de marqueurs moléculaires associé à la maladie de Parkinson. N° de Dépôt de Brevet : FR 0855997. N° de Publication Internationale : WO 2010/026335A1.

D’autres travaux collaboratifs ont été réalisés pendant la période de la thèse ; ils seront brièvement détaillés.

Publications

A Elbaz, OA Ross, JP Ioannidis, AI Soto-Ortolaza, F Moisan, J Aasly, G Annesi, M Bozi, L Brighina, MC Chartier-Harlin, A Destée, C Ferrarese, A Ferraris, JM Gibson, S Gispert, GM Hadjigeorgiou, B Jasinska-Myga, C Klein, R Krüger, JC Lambert, K Lohmann, S van de Loo, MA Loriot, T Lynch, GD Mellick, **E Mutez**, C Nilsson, G Opala, A Puschmann, A Quattrone, M Sharma, PA Silburn, L Stefanis, RJ Uitti, EM Valente, C Vilariño-Güell, K Wirdefeldt, ZK Wszolek, G Xiromerisiou, DM Maraganore, MJ Farrer; Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease (GEO-PD) Consortium. Independent and joint effects of the MAPT and SNCA genes in Parkinson disease. *Ann Neurol.* 2011;69(5):778-92.

OA Ross, A Ortolaza, M Heckman, J Aasly, N Abahuni, G Annesi, J Bacon, S Bardien, M Bozi, A Brice, L Brighina, C Van Broeckhoven, J Carr, MC Chartier-Harlin, E Dardiotis, D Dickson, N Diehl, A Elbaz, C Ferrarese, A Ferraris, B Fiske, M Gibson, G Hadjigeorgiou, N Hattori, J Ioannidis, B Jasinska-Myga, BS Jeon, Y Kim, C Klein, R Kruger, E Kyratzi, S Lesage, CH Lin, T Lynch, D Maraganore, G Mellick, **E Mutez**, C Nilsson, G Opala, SS Park, A Puschmann, A Quattrone, M Sharma, P Silburn, YH Sohn, L Stefanis, V Tadic, J Theuns, H Tomiyama, R Uitti, EM Valente, S Van der Loo, D Vassilatis, C Vilarino-Guell, L White, K Wirdefelt, Z Wszolek, R Wu, MJ Farrer. LRRK2 exonic variants and susceptibility to Parkinson’s disease. *Lancet Neurol.* 2011;10(10):898-908.

MC Chartier Harlin, JC Dachsel, C Vilariño-Guell, SJ Lincoln, F Leprêtre, MM Hulihan, J Kachergus, AJ Milnerwood, L Tapia, MS Song, E Le Rhun, **E Mutez,** L Larvor, A Duflot, C Vanbesien-Mailliot, A Kreisler, OA Ross, K Nishioka, AI Soto-Ortolaza, SA Cobb, HL Melrose, B Behrouz, BH Keeling, JA Bacon, E Hentati, L Williams, A Yanagiya, N Sonenberg, PJ Lockhart, AC Zubair, RJ Uitti, JO Aasly, A Krygowska-Wajs, G Opala, ZK Wszolek, R Frigerio, DM Maraganore, D Gosal, T Lynch, M Hutchinson, AR Bentivoglio, EM Valente, WC Nichols, N Pankratz, T Foroud, RA Gibson, F Hentati, DW Dickson, A Destée, MJ Farrer. Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson's disease. *Am. J. Hum. Genet.* 2011;89(3):398-406.

Communications orales

MC Chartier-Harlin, J Dachsel, M Hulihan, J Kachergus, F Lepretre, E Le Rhun, **E Mutez,** S Lincoln, O Ross, C Vilariño-Güell, A Yanagiya, N Sonenberg, P Lockhart, Z Wszolek, J Aasly, R Frigerio, D Maraganore, T Lynch, A Ferraris, EM Valente, A Destée, M Farrer. EIF4G1 mutations in familial Parkinsonism. WFN 18th World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders, Miami 2009.

Communications affichées

C Vanbesien-Mailliot, **E Mutez**, V Mouroux, E Maury, O Viltard, F Leprêtre, N Waucquier, D Hamalek, B Frigard, D Vieau, A Pierce, ML Caillet-Boudin, S Maccari, A Destée, MC Chartier-Harlin. Subchronic exposure to low doses of the pesticide rotenone in rats mimics some features of prodomal Parkinsonism. 9ème Colloque de la Société des Neurosciences, Bordeaux 2009.

C Vanbesien, **E Mutez,** A Kreisler, A Duflot, S Peckeu, A Destée, MC Chartier-Harlin. Modification of peripheral blood mononuclear cells in a rotenone experimental analogue of Parkinson's disease. 10ème Colloque de la Société des Neurosciences, Marseille 2011.

C Vanbesien-Mailliot, **E Mutez**, A Kreisler, C Simonin, A Duflor, P Semaille, S Peckeu, A Destée, MC Chartier-Harlin. Transcriptome profiling of blood mononuclear cells from rats exposed to cumulative low doses of the Parkinson's disease-linked pesticide rotenone. WFN 18th World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders, Shanghai 2011.

Table des matières

TABLE DES MATIERES ..... **I**
INDEX DES FIGURES ..... **V**
INDEX DES TABLEAUX ..... **VII**
LISTE DES ABREVIATIONS ..... **IX**
I. INTRODUCTION **1**
A. LA MALADIE DE PARKINSON **2**
1. EPIDEMIOLOGIE **2**
2. CLINIQUE **2**
2.1 SIGNES MOTEURS 2
2.2 SYMPTOMES NON-MOTEURS 4
2.2.1 Signes neurovégétatifs *4*
2.2.2 Troubles sensitifs *4*
2.2.3 Troubles du sommeil et de la vigilance *4*
2.2.4 Troubles cognitifs *4*
2.2.5 Troubles psycho-comportementaux *5*
2.3 DIAGNOSTIC ET EVALUATION CLINIQUE 5
2.3.1 Critères diagnostiques *5*
2.3.2 Echelles d'évaluation clinique *5*
2.4 EVALUATION PARACLINIQUE 6
2.5 STADE PRECLINIQUE 6
2.6 DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL 7
3. TRAITEMENT **8**
3.1 MEDICAMENTEUX 8
3.2 STIMULATION CEREBRALE ET DOPAMINERGIQUE CONTINUE 8
3.3 AUTRES THERAPEUTIQUES 9
4. ANATOMOPATHOLOGIE **9**
4.1 NEUROPATHOLOGIE 9
4.1.1 Mort neuronale de la substance noire *9*
4.1.2 Autres lésions cérébrales dopaminergiques et non dopaminergiques *10*
4.1.3 Corps de Lewy et autres dépôts d'alpha-synucléine *10*
4.1.4 Lésions gliales et inflammatoires *11*
4.2 PATHOLOGIE EXTRA-CEREBRALE 11
4.3 PROGRESSION DES LESIONS 11
5. CIRCUIT DES GANGLIONS DE LA BASE **12**
6. DETERMINANTS **14**
6.1 DETERMINANTS ENVIRONNEMENTAUX 14
6.2 DETERMINANTS GENETIQUES 14
6.2.1 Formes monogéniques *17*
6.2.1.1 SNCA (PARK1/4) 17

6.2.1.2 LRRK2 (PARK8) 19
6.2.1.3 ATXN2 22
6.2.1.4 EIF4G1 (PARK18) 23
6.2.1.5 Parkin (PARK2) 23
6.2.1.6 PINK1 (PARK6) 24
6.2.1.7 DJ-1 (PARK7) 25
6.2.2 Facteurs de susceptibilité génétique *25*
7. MECANISMES PATHOGENIQUES 28
7.1 STRESS OXYDANT 28
7.2 DYSFONCTIONNEMENT MITOCHONDRIAL 28
7.3 VOIES DE DEGRADATION DES MOLECULES ET ORGANITES 29
7.4 PHENOMENES INFLAMMATOIRES 31
7.5 SYNTHESE 32
8. MODELES EXPERIMENTAUX 33
8.1 MODELES CELLULAIRES 33
8.2 MODELES ANIMAUX 34
8.2.1 Modèles animaux toxiques *34*
8.2.1.1 6-hydroxydopamine 34
8.2.1.2 MPTP 35
8.2.1.3 Roténone 35
8.2.2 Modèles animaux génétiques *35*
8.3 LIMITES DE CES MODELES 36
B. OBJECTIFS DE LA THESE 38
II. MATÉRIELS ET MÉTHODES 40
1. POPULATIONS ETUDIEES 41
1.1 PARADIGME ET CONVERGENCE 41
1.2 PARKFANORD 41
2. EXTRACTION D'ADN 41
3. RECHERCHE DE MUTATIONS 42
3.1 GENOTYPAGE DE LA MUTATION G2019S DE LRRK2 42
3.2 DOSAGE GENIQUE DU GENE SNCA 43
3.3 RECHERCHE DE L'EXPANSION DE TRIPLETS SCA2 43
4. PUCES CGH (COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION) 43
5. EXTRACTION D'ARN 44
6. PUCES D'EXPRESSION PANGENOMIQUE 44
6.1 PLATEFORME AGILENT 44
6.2 PLATEFORME ILLUMINA 45
6.3 ANALYSE DES DONNEES PAR LE LOGICIEL GENESPRING 45
6.4 ANALYSE DES DONNEES PAR LE LOGICIEL INGENUITY PATHWAY ANALYSIS 46
7. RT-PCR EN TEMPS REEL 46
III. RÉSULTATS 48
1. ETUDE DE LA MP ASSOCIEE A LA MUTATION G2019S DE LRRK2 49

1.1 EPIDEMIOLOGIE ET TABLEAU CLINIQUE 49
1.2 ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE 49
1.2.1 Sujets étudiés *49*
1.2.2 Procédure de puce d'expression Agilent *50*
1.2.3 Analyse en composante principale *50*
1.2.4 Fonctions cellulaires dérégulées *51*
1.2.5 Voies cellulaires canoniques dérégulées *52*
1.2.6 Confirmation de la validité des puces d'expression en RT-PCR *52*
1.2.7 Comparaison avec les données transcriptomiques de la littérature *53*
1.3 DISCUSSION 55
2. ETUDE DE LA DUPLICATION DE SNCA : CORRELATION GENOTYPE-PHENOTYPE 58
2.1 DESCRIPTION DE LA FAMILLE 59
2.1.1 Tableau clinique et neuropsychologique *59*
2.1.2 Paraclinique : scintigraphie cérébrale au DaTSCAN *60*
2.2 DIAGNOSTIC DE LA DUPLICATION DU LOCUS DE SNCA 62
2.2.1 Dosage génique de SNCA *62*
2.2.2 FISH (Fluorescent in situ hydridization) *62*
2.2.3 Puce CGH (comparative genomic hybridization) *63*
2.3 ANALYSE GENOMIQUE DE LA DUPLICATION 63
2.3.1 Séquençage des points de jonction *63*
2.3.2 Mécanisme de la duplication *64*
2.4 EXPRESSION DES GENES DUPLIQUES 65
2.4.1. RT-PCR dans les lymphocytes immortalisés et les PBMC *65*
2.4.2 Puces d'expression Agilent *66*
2.5 DISCUSSION 67
3. ETUDE DE LA DUPLICATION DE SNCA : CONSEQUENCES AU NIVEAU CELLULAIRE 70
3.1 EXPRESSION DES ISOFORMES DE SNCA 70
3.1.1 Chez le porteur de la duplication (P59/04) *71*
3.1.2 Comparaison avec les autres parkinsoniens *71*
3.1.2.1 RT-PCR en temps réel 71
3.1.2.2 Puces d'expression Agilent 72
3.2 ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE DES PBMC CHEZ LE DUPLIQUE 73
3.2.1 Puces d'expression Agilent *73*
3.2.2 Comparaison avec la plateforme Illumina *74*
3.2.3 Comparaison avec les autres sujets parkinsoniens *75*
3.3 DISCUSSION 77
4. ETUDE DE LA MP ASSOCIEE A UNE EXPANSION DE TRIPLETS SCA2 ET COMPARAISON AVEC LE PHENOTYPE CEREBELLEUX 81
4.1 EPIDEMIOLOGIE ET TABLEAU CLINIQUE 81
4.2 SEQUENCE DE L'EXPANSION DE TRIPLETS 82
4.3 ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE DES SUJETS SCA2 PARKINSONIENS ET CEREBELLEUX 83
4.3.1 Sujets inclus *83*

4.3.2 Analyse des puces d'expression *84*
4.3.2.1 Etude du transcriptome des sujets SCA2 versus les témoins 84
4.3.2.2 Analyse du transcriptome des parkinsoniens SCA2 versus leurs témoins appariés 85
4.3.2.3 Analyse du transcriptome des cérébelleux SCA2 versus leurs témoins appariés 86
4.3.2.4 Gènes dérégulés chez les porteurs de mutation SCA2 87
4.4 DISCUSSION 87
5. ETUDE DE L'EXPRESSION GENIQUE SELON LE STADE EVOLUTIF DE LA MP 92
5.1 SUJETS INCLUS 92
5.2 ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE 93
5.2.1 Gènes et voies dérégulés selon le stade de la maladie pour chaque expérience *94*
5.2.1.1 Voies canoniques dérégulées 94
5.2.1.2 Gènes dérégulés 95
5.2.2 Gènes et voies dérégulés communs présents dans toutes les analyses *95*
5.3 DISCUSSION 96
IV. TRAVAUX COLLABORATIFS 100
1. IDENTIFICATION D'UN NOUVEAU GENE EIF4G1 IMPLIQUE DANS LES FORMES AUTOSOMIQUES DOMINANTES DE LA MP 101
2. ETUDE DES VARIANTS EXONIQUES DE LRRK2 ET SUSCEPTIBILITE POUR LA MP 103
3. POLYMORPHISMES DE SNCA ET MAPT ET SUSCEPTIBILITE POUR LA MP 104
V. DISCUSSION GENERALE 105
1. LES PBMC COMME MODELE D'ETUDE DE LA MP 106
2. INTERETS ET LIMITES DE L'ETUDE DU TRANSCRIPTOME 108
2.1 CONSIDERATIONS TECHNIQUES 108
2.2 VALIDATION DES DONNEES TRANSCRIPTOMIQUES 110
3. APPORT DU TRANSCRIPTOME DES PBMC DES FORMES SPORADIQUES ET GENETIQUES DE MP 112
3.1 STADE PRECOCE DE LA MALADIE 112
3.1.1 Sujets à un stade précoce *112*
3.1.2 Marqueurs de la maladie *113*
3.2 VOIES MOLECULAIRES ASSOCIEES A LA PATHOGENIE DE LA MP 114
3.3 VOIES DE SIGNALISATION CELLULAIRE 118
3.3.1 Voies de survie, de croissance et de prolifération cellulaire *118*
3.3.1.1 Lien MP et cancer 119
3.3.1.2 Lien MP et voies de survie, de prolifération et de croissance cellulaire 120
3.3.2 Cycle cellulaire et mort cellulaire *125*
3.3.3 Schéma général *130*
4. PERSPECTIVES 132
VI. RÉFÉRENCES 134
VII. ANNEXES 162
VIII. ARTICLES 196

Index des figures

Figure 1 : Section du mésencéphale montrant la dépigmentation de la SN dans la MP. 10
Figure 2 : Corps de Lewy. 10
Figure 3 : Progression du processus d'apparition des lésions selon Braak *et al.* 2003. 12
Figure 4 : Représentation schématique de la progression de la symptomatologie clinique selon la présence des corps de Lewy d'après Halliday *et al*., 2011. 12
Figure 5 : Schéma de l'organisation fonctionnelle du circuit moteur des noyaux gris centraux en situation normale et en cas de MP adapté de Albin *et al*., 1989. 13
Figure 6 : Représentation schématique des 4 isoformes de SNCA avec positions des mutations ponctuelles. 18
Figure 7 : Représentation schématique de LRRK2 avec positions des 6 mutations pathogènes au sein des domaines fonctionnels d'après Martin *et al*., 2011. 21
Figure 8 : Représentation schématique de l'Ataxin-2 avec ses domaines fonctionnels d'après Lastres-Becker *et al*., 2008. 22
Figure 9 : Représentation schématique des domaines fonctionnels de PRKN d'après Martin *et al*., 2011. 24
Figure 10 : Voies de l'autophagie : macroautophagie, autophagie médiée par les chaperones et microautophagie d'après Cheung & Ip, 2009. 31
Figure 11 : Représentation schématique de la pathogénie de la MP avec localisation des gènes dans les différents systèmes impliqués d'après Hatano *et al*., 2009. 33
Figure 12 : Lecture des gels d'agarose identifiant la mutation G2019S de LRRK2 par PCR. 42
Figure 13 : Représentation en 3D de l'analyse en composante principale appliquée sur la liste des 132 gènes dérégulés entre porteurs de la mutation G2019S de LRRK2 et témoins. 51
Figure 14 : Arbre généalogique de la famille P59. 59
Figure 15 : Coupes passant par le striatum des DaTSCAN pour P59/02, P59/03 et P59/04. 60
Figure 16 : Dosage génique des exons 1 et 7 de SNCA. 62
Figure 17 : FISH sur un noyau en interphase de leucocyte de P59/04 montrant les 3 sondes. 63
Figure 18 : Identification du segment dupliqué en CGH du sujet P59/04 montrant la duplication surlignée en violet au locus 4q21.3-q22.1, comprenant 31 gènes. 63
Figure 19 : Représentation schématique du réarrangement entre les 2 LINE avec position des 12 amorces utilisées pour la PCR et le séquençage. 64
Figure 20 : Expression de SNCA dans les lignées immortalisées et les PBMC. 65
Figure 21 : Ratio d'expression normalisée des isoformes de SNCA chez P59/04 et les témoins. 71
Figure 22 : Ratio d'expression des 4 isoformes de SNCA en RT-PCR chez les sujets parkinsoniens sporadiques et ceux porteurs de la mutation G2019S de LRRK2. 72
Figure 23 : Ratio d'expression de SNCA en puces d'expression chez les sujets parkinsoniens sporadiques et porteurs de la mutation G2019S de LRRK2. 73
Figure 24 : Représentation en 3D de l'analyse en composante principale réalisée sur la liste des 43 sondes permettant de séparer les individus SCA2 selon leur phénotype. 85
Figure 25 : Représentation schématique des expansions pathologiques de triplets CAG avec les interruptions CAA pour nos patients parkinsoniens et les données de la littérature. 88

Figure 26 : Représentation schématique d'eIF4G1 au sein du complexe initiant la traduction avec localisation des mutations R1205H et A502V. 102
Figure 27 : Représentation de la voie PI3K/AKT issue du logiciel IPA..... 121
Figure 28 : Représentation de la voie ERK5 issue du logiciel IPA. 123
Figure 29 : Représentation de la voie de signalisation du contrôle de la transition G1/S du cycle cellulaire issue du logiciel IPA. 128
Figure 30 : Représentation de la voie de signalisation de l'apoptose issue du logiciel IPA. 129
Figure 31 : Représentation schématique des voies de signalisation cellulaire dérégulées dans la MP adaptée de Mamane *et al*., 2004. 131

Index des tableaux

Tableau 1 : Gènes impliqués dans les formes autosomiques dominantes, récessives de MP et certains facteurs de susceptibilité avec description clinique et neuropathologique. 16
Tableau 2 : Résultats des 10 principales études d'association pangénomique GWAS de la MP issus du site www.pdgene.org. 27
Tableau 3 : Amorces utilisées pour les réactions de génotypage, de séquençage, de dosage génique et de mesure d'expression. 47
Tableau 4 : Principales fonctions classées par Gene Ontology perturbées dans les PBMC des porteurs de la mutation G2019S de LRRK2. 51
Tableau 5 : Voies canoniques significativement dérégulées identifiées par le logiciel IPA dans les PBMC des sujets porteurs de la mutation G2019S de LRRK2. 52
Tableau 6 : Mesure des ratios d'expression entre les 9 porteurs de la mutation G2019S de LRRK2 et les 8 témoins pour les expériences de puces d'expression et de RT-PCR. 53
Tableau 7 : Principales voies dérégulées issues des études d'expression génique réalisées à partir de la substance noire de sujets parkinsoniens. 54
Tableau 8 : Gènes communs des études transcriptomiques entre PBMC et substance noire avec variation des ratios d'expression. 54
Tableau 9 : Voies canoniques obtenues par le logiciel IPA dans la lignée SH-SY5Y avec invalidation de LRRK2 (Häbig *et al.*, 2008). 56
Tableau 10 : Principales caractéristiques cliniques et neuropsychologiques des membres de la famille P59 et présence de la duplication de SNCA. 61
Tableau 11 : Liste des 31 gènes présents dans le locus dupliqué. 69
Tableau 12 : Conditions de RT-PCR en temps réel avec les séquences des amorces et leurs positions. 71
Tableau 13 : Liste des voies canoniques dérégulées chez P59/04 avec comparaison avec les souris transgéniques A53T et la plateforme Illumina. 74
Tableau 14 : Voies canoniques significativement dérégulées dans les PBMC communes entre les sujets porteurs de la mutation G2019S de LRRK2 et les parkinsoniens sporadiques avec correction de Benjamini & Hochberg. 76
Tableau 15 : Voies canoniques significativement dérégulées dans les PBMC communes entre les sujets porteurs de la mutation G2019S de LRRK2 et les parkinsoniens sporadiques sans correction de Benjamini & Hochberg. 77
Tableau 16 : Séquence de l'expansion de triplets au sein du gène ATXN2 des allèles sains et mutés pour les sujets parkinsoniens et cérébelleux. 82
Tableau 17 : Caractéristiques des sujets SCA2 et leurs témoins appariés. 83
Tableau 18 : Voies canoniques significatives identifiées dans les PBMC des sujets SCA2. 84
Tableau 19 : Détail des sujets selon leur sexe, âge et forme génétique inclus dans les 4 groupes. 93
Tableau 20 : Voies canoniques dérégulées présentes dans chaque expérience (Agilent et Illumina) selon le stade clinique. 94
Tableau 21 : Voies métaboliques dérégulées dans différentes aires cérébrales chez le macaque intoxiqué par le MPTP à différents temps d'exposition (6 jours, 12 jours et 25 jours)..... 97

Tableau 22 : Voies moléculaires dérégulées représentées dans les études du transcriptome de SN de parkinsoniens d'après Greene, 2011. 115
Tableau 23 : Comparaison entre nos données de transcriptome de PBMC avec la méta-analyse des échantillons cérébraux par le logiciel IPA d'après Sutherland *et al*., 2009. 116
Tableau 24 : Liste des gènes présents dans les voies canoniques dérégulées dans les PBMC des sujets porteurs de la mutation G2019S de LRRK2. 171
Tableau 25 : Liste des 373 gènes dérégulés communs chez le dupliqué du locus de SNCA entre les 2 plateformes. 173
Tableau 26 : Liste des 37 gènes différemment exprimés chez les sujets SCA2 parkinsoniens et cérébelleux en comparaison avec leurs témoins appariés. 182
Tableau 27 : Voies canoniques dérégulées dans les PBMC des parkinsoniens SCA2 par les puces d'expression Agilent et Illumina. 183
Tableau 28 : Voies canoniques dérégulées dans les PBMC des cérébelleux SCA2 par les puces d'expression Agilent et Illumina. 184
Tableau 29 : Gènes dérégulés dans les voies de signalisation d'intérêt chez les sujets SCA2. .. 186
Tableau 30 : Liste des gènes dérégulés pour chaque stade clinique et présents dans les 3 expériences. 189
Tableau 31 : Liste des voies canoniques dérégulées à partir de la liste des 3070 gènes dérégulés communs à tous les stades de la MP. 194

Liste des abréviations

6-OHDA	6-HydroxyDopamine
ACP	Analyse en Composante Principale
AMS	Atrophie Multi-Systématisée
ATP13A2	ATPase 13A2
ATXN2	Ataxin-2
BST1	Bone marrow Stromal cell antigen 1
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CL	Corps de Lewy
CMA	Chaperone-Mediated Autophagy
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DCB	Dégénérescence Cortico-Basale
DCL	Démence à Corps de Lewy
DCTN1	Dynactin 1
EBV	Epstein - Barr virus
EIF4G1	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4 Gamma 1
FBXO7	F-Box Only protein 7
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
GAK	Cyclin G-Associated Kinase
GBA	Glucosidase Beta Acid
GEO	Gene Expression Omnibus (www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gds)
GIGYF2	GRB10-Interacting GYF protein 2
GPE	Globus Pallidus Externe
GPI	Globus Pallidus Interne
GWAS	Genome-Wide Association Study
HDAC6	Histone DeAcetylase 6
HTRA2	HTRA serine peptidase 2
ICAM1	InterCellular Adhesion Molecule 1
ICOMT	Inhibiteur de la Catéchol-O-Méthyl-Transférase
IFNγ	Interferon γ
IL	InterLeukin
IMAOB	Inhibiteur de la MonoAmine-Oxydase B
iNOS	Inducible Nitric Oxyde Synthetase
IPA	Ingenuity pathway Analysis (www.ingenuity.com)
LAMP2A	Lysosome-Associated Membrane Protein 2A
LINE	Long Interspersed Nuclear Element
LRRK2	Leucine-Rich Repeat Kinase 2
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPT	Microtubule-Associated Protein Tau
MDRS	Mattis Dementia Rating Scale
MKK	MAPK Kinase
MLK	Mixed-Lineage Kinase

MMRN1	Multimerin 1
MMS	Mini Mental State
MP	Maladie de Parkinson
MPP+	1-Méthyl-4-PhénylPyridinium
MPTP	1-Méthyl-4-Phényl-1,2,3,6-TétrahydroPyridine
MSN	Moesin
NAHR	Non-Allelic Homologous Recombination
NINDS	National Institute of Neurological Disorders and Stroke
NPP	Noyau Pédonculo-Pontin
NR4A2	Nuclear Receptor subfamily 4, group A, member 2 ou NURR1
NST	Noyau Sous-Thalamique
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man (http://omim/org/)
ORF	Open Reading Frame
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGC-1α	PPARγ Coactivator 1α
PINK1	PTEN-Induced Kinase 1
PLA2G6	PhosphoLipase A2, group 6
POLG	Polymerase Gamma
PARIS	Parkin-Interacting Substrate
PRKN	Parkin
PSP	Paralysie Supra-nucléaire Progressive
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
RE	Réticulum Endoplasmique ou Ratio d'Expression
RIN	RNA Integrity Number
ROS	Reactive Oxygen Species
RPS18	Ribosomal Protein S18
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SCA	Ataxie Spino-Cérébelleuse
SN	Substance Noire
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor
SNCA	Alpha-Synucléine (Synuclein Alpha)
SNCAIP	SNCA Interacting Protein
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SUP	Système Ubiquitine-Protéasome
TDP-43	TAR DNA binding protein (TARDBP)
TEP	Tomographie par Emission de Positons
TEMP	Tomographie par Emission MonoPhotonique
TGFβ	Tranforming Growth Factor β
TNFα	Tumor Necrosis Factor α
UCHL1	Ubiquitin Carboxyl-terminal esterase 1
UKPDSBRC	United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Research Center
UPDRS	Unified Parkinson's Disease Rating Scale
UPR	Unfolded Protein Response
VPS35	Vacuolar Protein Sorting 35

I. INTRODUCTION

A. La maladie de Parkinson

Si les premières descriptions de syndrome parkinsonien remontent à des traités antiques de médecine indienne et chinoise, l'histoire retiendra le nom de James Parkinson qui fit la description en 1817 de 6 sujets atteints de « paralysie agitante » dans son ouvrage « An essay on the shaking palsy » (Parkinson, 1817). Charcot proposera la dénomination 'maladie de Parkinson' à ce tableau de détérioration neurologique progressive associant « tremblement de repos, manque de force musculaire et démarche festinante ». Par la suite, les études anatomopathologiques ont identifié la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire à l'origine de sa dépigmentation et la présence d'inclusions intra-cytoplasmiques ou corps de Lewy dans les neurones survivants du tronc cérébral. Depuis, les recherches se sont multipliées pour identifier la cause de cette pathologie qui demeure en grande partie inconnue malgré les découvertes physiopathologiques et génétiques de ces dernières décennies. En dépit de ces progrès, cette maladie reste incurable et à l'origine d'un handicap important.

1. Epidémiologie

La maladie de Parkinson (MP) est l'affection neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Elle touche environ 0,3% de la population générale et 1,7% des sujets de plus de 65 ans (De Rijk *et al.*, 2000). Le nombre de patients est estimé entre 100 000 et 150 000 en France et à plus de 6 millions de personnes sur la planète. L'âge moyen de début est situé entre 58 et 62 ans avec un début entre 40 et 75 ans dans 80% des cas. Un début avant 40 ans (forme de début précoce) est retrouvé chez 10% des sujets et avant 20 ans, la maladie est exceptionnelle (forme juvénile). La prévalence de la maladie est plus élevée chez les hommes avec un risque relatif de 1,5 (Wooten *et al.*, 2004). Malgré la prise en charge thérapeutique, la MP occasionne une surmortalité avec un risque relatif d'environ 2 (Chrysostome & Tison, 2006).

2. Clinique

2.1 Signes moteurs

Le diagnostic clinique de MP repose sur les éléments de la triade parkinsonienne : tremblement de repos, akinésie et rigidité qui sont également les signes inauguraux les plus fréquents (Hoehn & Yahr, 1967).

Le tremblement de repos est le signe le plus classique et inaugure la maladie chez 70% des sujets. Il débute classiquement aux membres supérieurs et de façon unilatérale. Il est fait d'oscillations rythmiques, lentes de 4 à 5 Hz, qui disparaissent lors du mouvement ou du maintien postural et qui se majorent à la fatigue ou à l'émotion. Il intéresse préférentiellement l'extrémité distale du membre supérieur avec l'impression d'émietter, mais il peut également toucher les membres inférieurs, les lèvres ou la mâchoire.

L'akinésie est une réduction de la motricité automatique et volontaire en l'absence de paralysie. On peut noter un défaut d'initiation du mouvement (akinésie proprement dite), une réduction d'amplitude du mouvement (hypokinésie) ou une lenteur d'exécution (bradykinésie). Elle se traduit par une réduction du ballant du bras lors de la marche, un faciès inexpressif (amimie), une rareté du clignement palpébral. Le patient peut être gêné dans l'exécution de mouvements alternatifs rapides ou de gestes fins. L'écriture apparait progressivement micrographique. L'akinésie axiale se traduit par des difficultés à se mouvoir (se retourner dans le lit, troubles de la marche, …) et rend compte aussi des troubles de la parole avec troubles d'articulation (dysarthrie) et perte du timbre de la voix (hypophonie).

L'hypertonie ou rigidité parkinsonienne se traduit par une résistance plastique à la mobilisation passive des segments de membre avec un aspect général en flexion avec une posture antéfléchie. La rigidité cède souvent par à-coups correspondant au phénomène de la roue dentée et est majorée par des mouvements actifs controlatéraux (manœuvre de Froment). Elle peut entraîner des déformations posturales et des douleurs.

Lors de l'évolution de la maladie, apparaissent des troubles de la marche avec démarche à petits pas, enrayages cinétiques lors de demi-tour ou passage d'obstacles. Une instabilité posturale survient également plus tardivement à l'origine de chutes, avec risque de traumatismes. Par ailleurs, l'akinésie axiale se majore et est responsable d'une dysarthrie parfois incompréhensible et de troubles de déglutition à l'origine de fausses routes et de pneumopathies qui grèvent le pronostic vital. Les troubles moteurs vont progressivement entraîner un handicap fonctionnel pour les activités quotidiennes jusqu'à une perte de la marche et une grabatisation.

Par ailleurs, après plusieurs années de contrôle de la symptomatologie par le traitement antiparkinsonien (lune de miel) permettant au patient de mener une vie quasi-normale, les complications motrices apparaissent. Il faut distinguer les fluctuations motrices qui correspondent à la résurgence du syndrome parkinsonien et les dyskinésies induites par la dopathérapie qui sont des mouvements anormaux involontaires de surdosage. L'association de ces complications motrices rend la prise en charge encore plus difficile.

2.2 Symptômes non-moteurs

Les signes cardinaux du syndrome parkinsonien peuvent être associés à d'autres symptômes apparaissant lors de l'évolution de la maladie, majorant encore le handicap fonctionnel.

2.2.1 Signes neurovégétatifs

Ces signes proviennent de l'extension des lésions neuronales. Ils comprennent l'hypersialorrhée résultant d'une stase salivaire, des troubles digestifs avec ralentissement de la vidange gastrique et constipation, l'hypotension artérielle orthostatique, des troubles génito-sphinctériens avec mictions impérieuses, troubles de la libido et impuissance, des troubles vaso-moteurs, des troubles respiratoires, ….

2.2.2 Troubles sensitifs

Les douleurs et phénomènes sensitifs sont identifiés chez 50% des patients. Les symptômes décrits sont variables : crampes, picotements, sensation de chaleur ou de froid, impatiences des membres inférieurs (syndrome des jambes sans repos), douleurs en rapport avec les blocages moteurs (phénomènes dystoniques) ou les déformations articulaires.

2.2.3 Troubles du sommeil et de la vigilance

Dans la MP, la qualité du sommeil est très souvent perturbée en raison d'une insomnie, un sommeil fragmenté, une résurgence du syndrome parkinsonien, un syndrome des jambes sans repos, un syndrome d'apnée du sommeil ou des troubles du comportement en sommeil paradoxal (parasomnie correspondant à des rêves animés pouvant être à l'origine de comportements agressifs, d'agitation verbale et motrice en rapport avec une disparition de l'atonie musculaire de cette phase de sommeil). La journée, il peut exister une somnolence diurne excessive parfois favorisée par les traitements antiparkinsoniens.

2.2.4 Troubles cognitifs

En l'absence d'une détérioration cognitive globale, les patients parkinsoniens présentent des déficits cognitifs spécifiques concernant la vitesse de traitement de l'information, le traitement des informations visuo-spatiales, la mémoire, l'attention et les fonctions exécutives (processus permettant le contrôle cognitif de l'action et la réalisation des comportements dirigés dans un but). Ces manifestations peuvent être précoces et leur retentissement est variable selon les patients. Les troubles vont progressivement s'aggraver jusqu'à l'apparition d'une démence à l'origine d'une altération de l'autonomie dans les activités de la vie quotidienne. Une démence

parkinsonienne est identifiée chez plus de 30% des patients parkinsoniens (Aarsland *et al*., 2005) et des critères diagnostiques ont été proposés (Emre *et al*., 2007).

2.2.5 Troubles psycho-comportementaux

Les troubles neuropsychiatriques sont particulièrement fréquents dans la MP et aggravent le retentissement de la maladie en dégradant la qualité de vie et en compliquant la prise en charge. Ils comprennent des troubles de l'humeur avec dépression (chez 40% des sujets), des troubles anxieux (trouble panique, phobies), l'apathie (perte d'intérêt pour les activités habituelles, manque d'initiative, indifférence et émoussement affectif), le syndrome de dysrégulation dopaminergique (addiction au traitement antiparkinsonien), le trouble du contrôle des pulsions (associé aux agonistes dopaminergiques avec hypersexualité, jeux ou achats pathologiques), des hallucinations voire des troubles psychotiques.

2.3 Diagnostic et évaluation clinique

2.3.1 Critères diagnostiques

Le diagnostic de certitude de la MP est réalisé *post-mortem* par l'examen anatomo-pathologique du cerveau identifiant la dégénérescence neuronale de la substance noire *pars compacta* et la présence de corps de Lewy dans les neurones survivants du tronc cérébral. Des critères de diagnostic clinique ont été proposés ; les plus utilisés sont ceux de l'UKPDSBRC - United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Research Center- (Gibb & Lees, 1989) –Annexe 1– et ceux du NINDS –National Institute of Neurological Disorders and Stroke- (Gelb *et al.*, 1999) –Annexe 2–. Ils reprennent les signes cardinaux d'un syndrome parkinsonien, les éléments devant faire évoquer un autre diagnostic et des critères évolutifs. Le meilleur critère reste la réponse significative et prolongée aux traitements antiparkinsoniens.

2.3.2 Echelles d'évaluation clinique

Différentes échelles sont couramment employées pour évaluer le degré de handicap fonctionnel chez le sujet parkinsonien. La plus utilisée est l'échelle UPDRS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale, Fahn S *et al*., 1987) qui permet une analyse quantitative et qualitative de l'ensemble des symptômes consécutifs au syndrome parkinsonien –Annexe 3–. Elle est composée de 6 sections appréciant l'état mental et le comportement thymique, les activités de la vie quotidienne, l'état moteur, les complications du traitement (dyskinésies et fluctuations motrices), le score de Hoehn &Yahr (sévérité globale du syndrome parkinsonien en 5 stades) et l'échelle de Schwab & England (degré global d'autonomie). Néanmoins, certains aspects de la

MP ne sont pas représentés dans cette échelle (notamment les troubles non moteurs) et certains items sont imprécis. C'est pour cela qu'a été proposée une nouvelle échelle, la MDS-UPDRS (Movement Disorders Society-UPDRS, Goetz *et al*., 2008) qui se compose de 65 questions. Elle met l'accent notamment sur l'anxiété, le syndrome de dysrégulation dopaminergique, les troubles du sommeil et urinaires et précise certains items comme le tremblement.

L'évaluation de l'état cognitif du patient parkinsonien fait appel à différents tests neuropsychologiques. L'efficience cognitive globale s'évalue classiquement par l'échelle de démence de Mattis (Mattis, 1976) qui est sensible à la dégradation cognitive associée aux syndromes parkinsoniens et donc plus sensible que le MMS (Mini Mental State). Elle évalue les principaux domaines de la cognition répartis en 5 items : attention, initiation, construction, formation de concepts et mémoire. D'autres tests évaluant le ralentissement psychomoteur, le traitement des informations visuo-spatiales, les capacités attentionnelles, la mémoire notamment épisodique et les fonctions exécutives complètent l'examen neuropsychologique. Des normes ont été proposées selon l'âge et le niveau scolaire, mais on considère généralement qu'un score à l'échelle de Mattis inférieur à 130/144 est témoin d'une dégradation cognitive patente (Dujardin, 2011).

2.4 Evaluation paraclinique

Le diagnostic clinique de MP ne nécessite pas d'examen complémentaire paraclinique. Néanmoins, en présence d'atypies cliniques ou évolutives, l'imagerie morphologique par IRM cérébrale peut aider au diagnostic différentiel. Par ailleurs, l'imagerie fonctionnelle par TEMP (tomographie par émission monophotonique) ou par TEP (tomographie par émission de positions) utilise des traceurs spécifiques et permet d'explorer le système dopaminergique. Les plus utilisés en routine sont la scintigraphie cérébrale au DaTSCAN® (^{123}I-β-CIT ou ^{123}I-FP-CIT) explorant la dénervation dopaminergique nigro-striée présynaptique et la TEP à la ^{18}F-fluorodopa évaluant le métabolisme de la dopamine au niveau striatal. Ces examens sont anormaux en cas de syndrome parkinsonien dégénératif. Récemment, a été proposée la technique d'échographie trans-crânienne qui identifie une hyper-échogénicité de la substance noire en cas de MP (Berg *et al*., 2008). Des tests pharmacologiques d'administration aigüe de levodopa permettent d'apprécier la dopasensibilité, mais ne présagent pas de son efficacité au long cours.

2.5 Stade préclinique

Lorsque le diagnostic de syndrome parkinsonien est posé, au moins 30% des neurones dopaminergiques nigro-striés et 50-60% de leurs terminaisons axonales ont disparu (Cheng *et al*.,

2010). Le stade préclinique de la MP correspond à la période qui précède la survenue des symptômes moteurs caractéristiques. Des études clinico-pathologiques et de neuro-imagerie ont estimé sa durée entre 4 et 7 ans (Hawkes, 2008 ; Savica *et al.*, 2010). Néanmoins, des données épidémiologiques sur les manifestations non motrices suggèrent que cette période pourrait être plus longue (> 20 ans) et même être définie dès la conception dans les formes génétiquement déterminées. Les manifestations cliniques retrouvées lors du stade préclinique sont des signes dysautonomiques (surtout la constipation), les troubles du comportement en sommeil paradoxal, un syndrome des jambes sans repos, l'hyposmie (altération ou perte de l'odorat), des manifestations anxieuses ou dépressives. Les techniques d'imagerie fonctionnelle, d'enregistrement du sommeil et de test de l'odorat peuvent identifier ces manifestations (Wu *et al.*, 2011). Néanmoins, à ce jour, en dehors des mutations génétiques, il n'existe pas de test biologique permettant le diagnostic à ce stade de MP en pratique clinique.

2.6 Diagnostic différentiel

La MP est la cause la plus fréquente de syndrome parkinsonien. Malgré les critères cliniques proposés, un taux d'erreur diagnostique avec l'analyse autopsique non négligeable de 10% persiste même dans les centres experts (Hughes *et al.*, 2001). Le diagnostic différentiel doit se faire avec le vieillissement physiologique où une lenteur du mouvement, une posture antéfléchie et une instabilité posturale ainsi qu'une dépigmentation de la substance noire *a minima* sont retrouvés. Le tremblement essentiel est caractérisé par un tremblement d'action. Toutefois, il peut comporter dans les formes sévères une composante de repos, sans présenter les autres composantes du syndrome parkinsonien. Un syndrome parkinsonien peut s'observer après exposition à de nombreux médicaments, dont les plus pourvoyeurs sont les neuroleptiques. Des lésions vasculaires cérébrales situées dans les ganglions de la base de même que l'hydrocéphalie à pression normale occasionnent un syndrome parkinsonien à prédominance axiale. Les autres syndromes parkinsoniens dégénératifs comprenant démence à corps de Lewy (DCL), atrophie multi-systématisée (AMS), paralysie supra-nucléaire progressive (PSP) et dégénérescence cortico-basale (DCB) sont les diagnostics différentiels les plus difficiles à établir surtout en début d'évolution. Une démence précoce, des hallucinations (DCL) ; une dysautonomie précoce, un syndrome cérébelleux (AMS) ; des chutes précoces, un syndrome frontal (PSP) ; une dystonie, des myoclonies, une apraxie (DCB) doivent faire évoquer ces diagnostics. D'autres rares syndromes parkinsoniens d'origine génétique sont également décrits comme les formes juvéniles de chorée de Huntington, la dystonie dopa-sensible, les prémutations de l'X fragile, *etc*... (Klein *et al.*, 2009).

3. Traitement

3.1 Médicamenteux

La MP reste une maladie incurable, même si le traitement améliore de façon substantielle la qualité de vie et le handicap fonctionnel. Le traitement actuel de la MP vise en priorité à compenser le déficit dopaminergique. Plusieurs options pharmacologiques existent : apporter de la levodopa exogène (en combinaison avec un inhibiteur de la dopa-décarboxylase périphérique) qui sera métabolisée en dopamine, stimuler directement les récepteurs dopaminergiques (agonistes dopaminergiques), réduire le catabolisme de la dopamine par les inhibiteurs enzymatiques de la monoamine-oxydase B (IMAOB : sélégiline, rasagiline) ou de la catéchol-O-méthyl-transférase (ICOMT). De façon plus accessoire, peuvent être utilisés les anticholinergiques pour le tremblement et l'amantadine pour les dyskinésies. La levodopa reste la thérapeutique la plus efficace. Néanmoins, en raison du risque d'apparition rapide de complications motrices, les agonistes dopaminergiques sont préférés chez les sujets jeunes. La rasagiline est le seul traitement ayant démontré un effet bénéfique modeste sur le cours évolutif de la maladie (Olanow *et al*., 2009). L'évolution de la maladie va nécessiter des adaptations thérapeutiques régulières. Tous ces traitements ne sont pas dénués d'effets secondaires notamment digestifs, confusiogènes ou comportementaux.

En cas de démence associée à la MP, un traitement anticholinestérasique peut être proposé (rivastigmine, Emre *et al*., 2004). Les troubles psycho-comportementaux justifient des ajustements thérapeutiques et le cas échéant la prescription d'un neuroleptique atypique (clozapine).

3.2 Stimulation cérébrale et dopaminergique continue

Au stade des complications motrices invalidantes, malgré un traitement médicamenteux optimal, une des méthodes de stimulation ou de délivrance dopaminergique continue peut être proposée : la stimulation cérébrale profonde, l'administration sous-cutanée d'apomorphine ou l'administration intraduodénale de gel de levodopa (Duodopa©). Ces deux dernières techniques permettent de maintenir une stimulation dopaminergique striatale stable.

Le traitement neurochirurgical par stimulation cérébrale profonde à haute fréquence des noyaux sous-thalamiques (NST) ou globus pallidus interne (GPI) a supplanté les techniques lésionnelles (thalamotomie et pallidotomie). Cette technique permet une amélioration prolongée des performances motrices et la réduction des dyskinésies dopa-induites. Elle n'est néanmoins pas dénuée de morbi-mortalité et ne peut être proposée à tous les patients (Lees *et al*., 2009).

3.3 Autres thérapeutiques

Les rééducations kinésithérapeutiques et orthophoniques complètent l'arsenal thérapeutique. La prise en charge sociale est également indispensable et peut être soutenue par les associations de malades.

Diverses thérapeutiques font également l'objet d'évaluation comme de nouveaux traitements modifiant le cours évolutif ou atténuant les complications motrices. Ces dernières années, ont également été étudiées des techniques de greffes de cellules embryonnaires et de cellules souches, d'administration intra-cérébrale ou grâce à des vecteurs viraux de facteurs de croissance. Ces techniques ont pu montrer un bénéfice chez quelques patients, mais elles restent encore à transposer en pratique clinique (Lees *et al*., 2009).

4. Anatomopathologie

4.1 Neuropathologie

La MP est définie sur le plan anatomopathologique, par une dépigmentation de la substance noire (SN) et par la présence de corps de Lewy (CL), dans les neurones survivants du tronc cérébral et d'autres régions cérébrales. Cette définition mérite d'être actualisée en raison de l'absence de CL dans certains formes génétiques de MP (mutations Parkin ou LRRK2) et la découverte de CL sans dégénérescence nigrée évoquant des formes prodromales de MP ou d'autres syndromes parkinsoniens (Dickson *et al*., 2009).

4.1.1 Mort neuronale de la substance noire

La dépigmentation de la SN est en rapport avec la mort sélective et progressive des neurones dopaminergiques qui contiennent de la neuromélanine, pigment cytoplasmique expliquant son aspect noir macroscopique (Figure 1). Cette dégénérescence n'est pas homogène et touche principalement la *pars compacta* ventro-latérale de la SN qui projette au niveau du putamen dorsal impliqué dans le contrôle moteur (Fearnley & Lees, 1991). Cette destruction neuronale est à l'origine d'une chute du taux de dopamine dans le striatum (Lotharius & Brundin, 2002 ; Savitt *et al*., 2006).

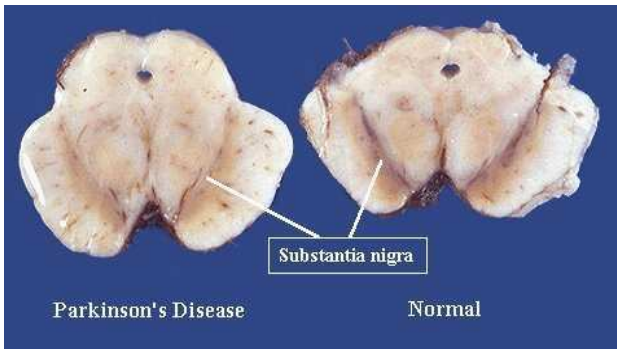


Figure 1 : Section du mésencéphale montrant la dépigmentation de la SN dans la MP. (http://library.med.utah.edu/WebPath/CNSHTML/CNS102.html)

4.1.2 Autres lésions cérébrales dopaminergiques et non dopaminergiques

D'autres neurones dopaminergiques sont également touchés, comme ceux de l'aire tegmentale ventrale et de la région fovéale de la rétine. Des systèmes non dopaminergiques sont également le siège d'une perte neuronale comme le *locus cæruleus* (noradrénergique), le raphé (sérotoninergique), le noyau dorsal du vague, le noyau basal de Meynert et le noyau pédonculo-pontin (cholinergiques) (Jellinger, 1999). Ces lésions sont à l'origine des signes non-moteurs de la maladie (Dickson *et al.*, 2009).

4.1.3 Corps de Lewy et autres dépôts d'alpha-synucléine

Les corps de Lewy (CL), décrits initialement dans les noyaux du tronc cérébral (Lewy, 1912), sont des inclusions intra-cytoplasmiques éosinophiles composées d'agrégats protéiques, dont le principal composant est l'alpha-synucléine (Spillantini *et al.*, 1997). Leur description dans tous les neurones pigmentés du tronc cérébral incluant la SN, en font le marqueur histopathologique de la MP (Forno, 1996). Les CL du tronc cérébral sont constitués d'un centre dense, granulaire et entourés d'une couronne radiaire filamenteuse ; ceux du cortex n'ont pas ce halo typique (Figure 2). En plus des CL, des neurites de Lewy sont identifiés en immunohistochimie (marqués par l'alpha-synucléine) dans les neurones survivants.

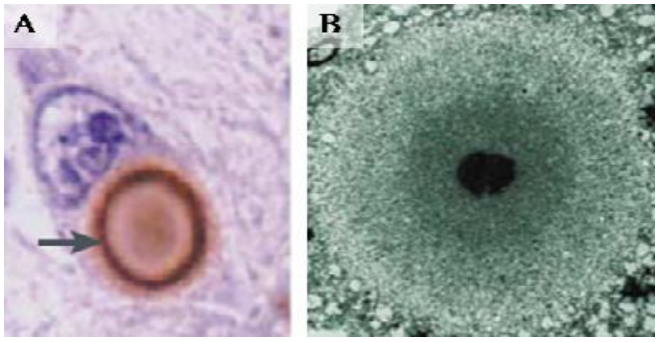


Figure 2 : Corps de Lewy.
A. Coloration par hématoxyline et éosine. B. Microscopie électronique.

4.1.4 Lésions gliales et inflammatoires

En plus de la dégénérescence neuronale et des inclusions d'alpha-synucléine, des réactions inflammatoires avec activation de la microglie, prolifération astrocytaire et infiltration leucocytaire ont été identifiées notamment dans la SN (McGeer *et al*., 1988 ; Hirsch *et al*., 2003). Au cours du processus dégénératif, sont libérées des cytokines pro-inflammatoires, comme le TNFα et l'IL6. De plus, l'activation de protéines d'adhésion, telle ICAM1, favoriserait l'infiltration de la SN par des lymphocytes CD4+, responsables de réactions dysimmunitaires (Miklossy *et al*., 2006 ; Brochard *et al*., 2009).

4.2 Pathologie extra-cérébrale

La MP est maintenant considérée comme un processus dégénératif multi-systémique. Ainsi, une atteinte du système nerveux entérique a été mise en évidence (Lebouvier *et al*., 2009). En effet, des neurones dopaminergiques présents dans les plexus digestifs font l'objet de la présence de dépôts d'alpha-synucléine et ces lésions sont précoces dans le développement de la maladie (Braak *et al*., 2003). L'analyse du système nerveux entérique accessible par des biopsies coliques pourrait être proposée à un stade précoce et servir de marqueur diagnostique de la maladie (Lebouvier *et al*., 2010). Par ailleurs, des dépôts d'alpha-synucléine phosphorylée ont été mis en évidence au niveau des terminaisons nerveuses cutanées chez 70% des sujets parkinsoniens étudiés et les auteurs évoquent l'intérêt de biopsies de peau dans le diagnostic de la MP (Ikemura *et al*., 2008). Ces mêmes dépôts ont été identifiés dans les glandes salivaires sous-maxillaires et pourraient être mis en rapport avec les troubles salivaires de la MP (Del Tredici *et al*., 2010). De la même façon, des dépôts d'alpha-synucléine ont été identifiés dans le système nerveux autonome évoquant un lien avec les troubles dysautonomiques de la maladie (Jellinger, 2011).

4.3 Progression des lésions

Braak et collaborateurs (Braak *et al*., 2003) ont suggéré que la progression des dépôts d'alpha-synucléine pouvait suivre les connexions axonales entre des régions cérébrales vulnérables selon un schéma déterminé et arbitrairement stratifié en 6 étapes. Le processus lésionnel débuterait dans les plexus digestifs et les terminaisons nerveuses olfactives puis diffuserait à la moelle allongée et au noyau olfactif. A partir du tronc cérébral, le processus s'étend de façon rostrale et notamment à la SN *pars compacta*. L'atteinte corticale est ensuite limitée au cortex temporal mésial puis au néocortex et finalement aux aires corticales d'association et primaires (Figure 3).

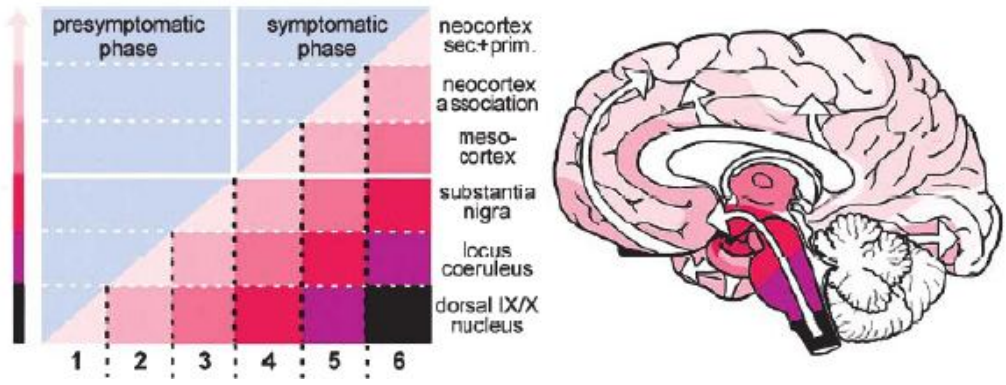


Figure 3 : Progression du processus d'apparition des lésions selon Braak *et al.* 2003.

Cette progression permettrait d'expliquer l'évolution de la symptomatologie clinique notamment des signes précliniques, puis les troubles dysautonomiques, moteurs, et cognitifs (Figure 4) (Halliday *et al.*, 2011).

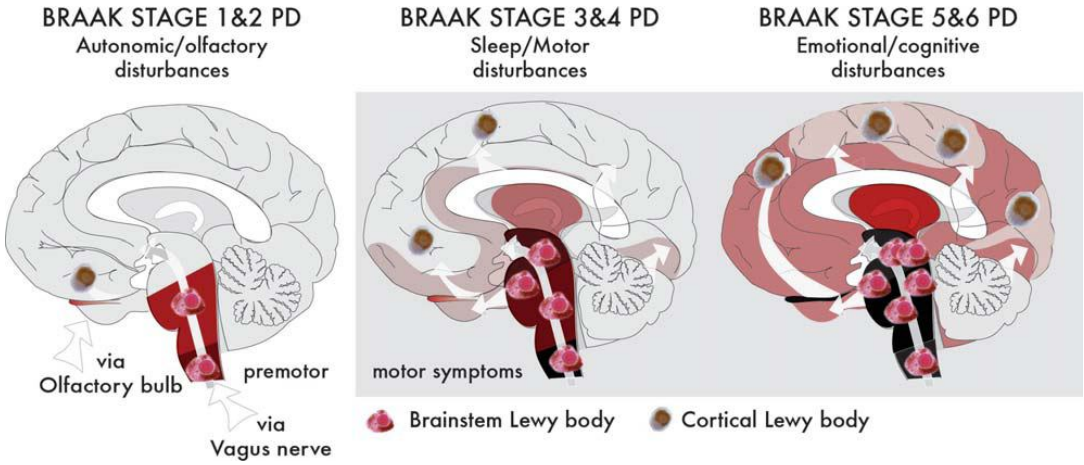


Figure 4 : Représentation schématique de la progression de la symptomatologie clinique selon la présence des corps de Lewy d'après Halliday *et al.*, 2011.

5. Circuit des ganglions de la base

La mort progressive des neurones pigmentés de la SN est à l'origine d'une dénervation dopaminergique striatale. Le diagnostic clinique est posé quand environ 50-60% des neurones dopaminergiques sont morts soit un taux de dopamine intra-striatal diminué de 70% (Schapira & Tolosa, 2010). Cette carence en dopamine est à l'origine d'un dysfonctionnement du circuit des ganglions de la base. Les ganglions de la base ou noyaux gris centraux comportent le striatum (putamen et noyau caudé), le *globus pallidus* (interne GPI et externe GPE), la substance noire (*pars compacta* SNc et *reticulata* SNr) et le noyau sous-thalamique (NST). Ils jouent un rôle important dans le contrôle moteur en régulant l'activité des neurones moteurs du cortex et du tronc cérébral. Le modèle classiquement admis (Albin *et al.*, 1989) comporte un circuit moteur

avec 2 entrées (striatum et NST) et une sortie par le GPI/SNr, qui est connecté avec le cortex via le thalamus. Les afférences projettent sur les ganglions de la base par 2 circuits distincts : (1) une voie directe vers le GPI/SNr via le striatum et (2) une voie indirecte polysynaptique vers le GPI/SNr via le striatum, le GPE et le NST (Figure 5). Le tonus dopaminergique striatal module l'activité des GPE, GPI/SNr et NST. Physiologiquement, les afférences cortico-striatales inhibent la voie indirecte et facilitent la voie directe. La déplétion dopaminergique associée à la MP modifie cet équilibre et est responsable d'une augmentation d'activité des NST et GPI/SNr à l'origine d'une inhibition excessive thalamo-corticale et des noyaux moteurs du tronc cérébral (Obeso *et al.*, 2008). En plus de ce circuit moteur, les ganglions de la base sont subdivisés en circuits oculo-moteur, associatif, limbique et orbito-frontal en fonction de leur aires de projection corticale et sont ainsi impliqués dans le contrôle moteur, mais également dans l'apprentissage, l'attention, la planification, la mémoire de travail et les émotions (Alexander *et al.*, 1986 ; Obeso *et al.*, 2008).

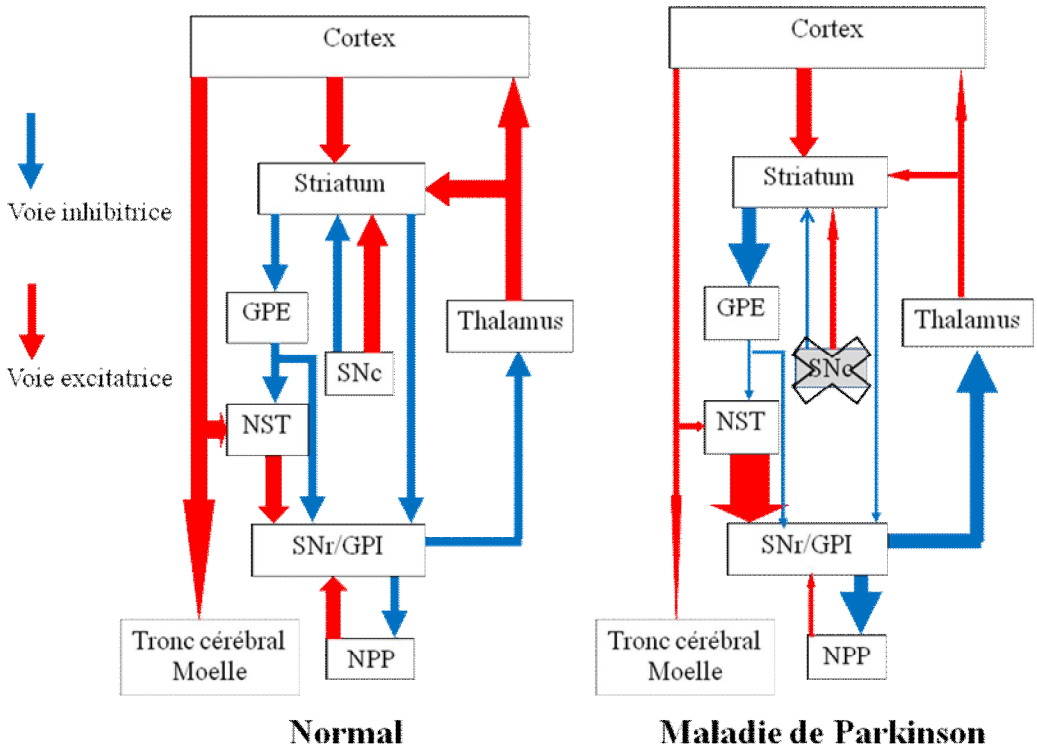


Figure 5 : Schéma de l'organisation fonctionnelle du circuit moteur des noyaux gris centraux en situation normale et en cas de MP adapté de Albin *et al.*, 1989.
GPE : *globus pallidus* externe, GPI : *globus pallidus* interne, NST : noyau sous-thalamique, SNc : *substantia nigra pars compacta*, SNr : *substantia nigra pars reticulata*, NPP : noyau pédonculo-pontin.

6. Déterminants

6.1 Déterminants environnementaux

L'étiologie exacte de la MP demeure inconnue, mais elle apparaît désormais comme une maladie plurifactorielle à la fois sous l'influence de facteurs environnementaux et de facteurs génétiques. Au début du XXème siècle, l'épidémie d'encéphalite léthargique de Von Economo responsable d'un syndrome parkinsonien avec déplétion dopaminergique striatale d'origine virale a attiré l'attention sur une étiologie environnementale. Ensuite, cette hypothèse de l'influence de facteurs environnementaux dans la MP a connu un regain d'intérêt avec la découverte d'un syndrome parkinsonien dopa-sensible chez des toxicomanes californiens exposés au MPTP (Langston *et al.,* 1983). Le MPTP pénètre dans les neurones dopaminergiques et est métabolisé en MPP+, puissant inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. Différentes études de cohortes ont confirmé que l'exposition prolongée à des pesticides, herbicides (paraquat qui présente une structure proche du MPP+) ou insecticides (roténone) est associée à une augmentation du risque (risque relatif ajusté de 1,7) de développer une MP (Ascherio *et al.,* 2006). Des facteurs associés à une moindre prévalence de la MP ont également été identifiés. Cette association est maintenant clairement démontrée pour la consommation de tabac (risque diminué de 60%) et de caféine (risque diminué de 30%). Cependant, elle reste plus incertaine pour la prise d'anti-inflammatoires ou d'hypolipémiants (Gale *et al*., 2003 ; Schapira & Jenner, 2011).

6.2 Déterminants génétiques

Dès le début du XXème siècle, Gowers retrouvait une histoire familiale chez 15% des patients parkinsoniens. Cependant, l'hypothèse génétique a été mise à mal par des études chez des jumeaux monozygotes et hétérozygotes ne retrouvant que de faibles taux de concordance pour la maladie (Ward *et al.,* 1983). Néanmoins, ce résultat a été critiqué en raison (1) de la grande variabilité d'âge d'apparition de la maladie et (2) de la difficulté à établir le diagnostic de MP en début d'évolution. Les études utilisant la TEP au 18F-Dopa ont permis d'évoquer un rôle plus important de la part génétique dans le développement de la MP avec une concordance de 75% entre jumeaux monozygotes et de 22% entre dizygotes (Foltynie *et al.,* 2002). Par ailleurs, la découverte de mutations responsables de formes familiales de MP a relancé l'hypothèse génétique. Des analyses de liaison génétique et des études d'association pangénomique ont permis de découvrir plusieurs loci d'intérêt (nommés PARK1 à PARK18), dont les marqueurs ségrègent avec la maladie. Parmi ces loci, plusieurs gènes ont été identifiés et sont associés à la

maladie (Tableau 1). Les gènes formellement impliqués dans les formes autosomiques dominantes sont les gènes de l'alpha-synucléine (SNCA, PARK1/4) (Polymeropoulos *et al*., 1997; Singleton *et al*., 2003, Chartier-Harlin *et al*., 2004) et LRRK2/PARK8 (Zimprich *et al*., 2004). Des mutations des gènes de la Parkin/PARK2 (Kitada *et al*., 1998), PINK1/PARK6 (Valente *et al*., 2004) et DJ-1/PARK7 (Bonifati *et al*., 2003) sont à l'origine de formes autosomiques récessives de la maladie. Par ailleurs, d'autres gènes n'ont pas été identifiés (PARK3 (Gasser *et al*., 1998), PARK10 (Hicks *et al*., 2002), PARK12 (Pankratz *et al*., 2003)) ou sont incertains comme UCHL1/PARK5 où une mutation a été identifiée dans une famille (Leroy *et al.*, 1998) et GIGYF2/PARK11 (Lautier *et al.*, 2008). Une approche de type gène candidat a permis d'identifier des mutations au sein des gènes OMI/HTRA2 (PARK13) (Strauss *et al.*, 2005), NR4A2 (Le *et al*., 2003) et Synphilin-1 (SNCAIP, synuclein alpha interacting protein ; un des composants des corps de Lewy) (Marx *et al*., 2003). Des mutations au sein d'autres gènes ont été mises en évidence dans quelques familles présentant le plus souvent un syndrome parkinsonien « plus », avec ophtalmoplégie et neuropathie pour le gène POLG (Davidzon *et al.*, 2006), avec syndrome pyramidal et démence dans le cadre du syndrome de Kufor-Rakeb pour le gène ATP13A2/PARK9 (Ramirez *et al.*, 2006), avec dystonie, syndrome pyramidal et troubles cognitifs pour le gène PLA2G6/PARK14 (Paisan-Ruiz *et al*., 2009), avec syndrome pyramidal pour le gène FBXO7/PARK15 (Di Fonzo *et al*., 2009), avec démence fronto-temporale pour le gène MAPT (Hutton *et al*, 1998) et avec hypoventilation, dépression dans le cadre du syndrome de Perry pour le gène DCTN1 (Farrer *et al*., 2009). Certaines familles atteintes d'une forme typique de MP sont porteuses d'une expansion de triplets au sein du gène de l'ataxie spino-cérébelleuse de type 2 (SCA2, ATXN2) (Gwinn-Hardy *et al.*, 2000) ou de l'ataxie spino-cérébelleuse de type 3 (SCA3, ATXN3, maladie de Machado-Joseph) (Gwinn-Hardy *et al*., 2001). Récemment, deux équipes ont identifié par séquençage d'exons des mutations ponctuelles au sein du gène VPS35/PARK17 (vacuolar protein sorting 35) chez plusieurs familles de MP de transmission autosomique dominante (Vilariño-Güell *et al*., 2011 ; Zimprich *et al* ., 2011). Enfin, notre groupe, en collaboration avec l'équipe du Dr Farrer a découvert plusieurs mutations ponctuelles au sein du gène EIF4G1 (PARK18) chez plusieurs familles présentant une MP de forme autosomique dominante (Chartier-Harlin *et al*., 2011).

Tableau 1 : Gènes impliqués dans les formes autosomiques dominantes (AD), récessives (AR) de MP et certains facteurs de susceptibilité avec description clinique et neuropathologique. SP pour syndrome parkinsonien. Les dénominations PARK ont été réactualisées selon OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man, http://omim.org/).

Nom	Locus	Gène	Type de mutation	Transmission	Phénotype clinique	Neuropathologie
PARK1	4q22.1	SNCA	mutations A30P, E46K, A53T	AD	MP ou démence à corps de Lewy	Corps de Lewy
PARK2	6q26	Parkin	>100 mutations (mutations ponctuelles, réarrangements d'exons)	AR	MP de début précoce	Corps de Lewy (rarement)
PARK3	2p13	??		AD	MP	Corps de Lewy
PARK4	4q22.1	SNCA	duplications, triplications	AD	MP, démence corrélée au dosage génique	Corps de Lewy
PARK5	4p13	UCHL1	substitution I93M	AD?	MP	??
PARK6	1p36.12	PINK1	>20 mutations (mutations ponctuelles, réarrangements d'exons)	AR	MP de début précoce	Corps de Lewy
PARK7	1p36.23	DJ-1	mutations ponctuelles, délétions	AR	MP de début précoce	??
PARK8	12p12	LRRK2	mutations ponctuelles, G2019S la plus fréquente	AD	MP	Corps de Lewy classiquement
PARK9	1p36.13	ATP13A2	mutations ponctuelles	AR	Syndrome de Kufor-Rakeb	??
PARK10	1p32	??		AD?	MP	??
PARK11	2q37.1	GIGYF2	mutations ponctuelles	AD	MP	??
PARK12	Xq21-q25	??		lié à l'X	MP	??
PARK13	2p13.1	OMI/HTRA2	mutations ponctuelles	AD?	MP	??
PARK14	22q13.1	PLA2G6	mutations ponctuelles	AR	dystonie, SP, pyramidal, démence	Corps de Lewy
PARK15	22q12.3	FBXO7	mutations ponctuelles	AR	syndrome pyramidal et SP	Corps de Lewy
PARK16	1q32	NUCKS1??		susceptibilité	MP	??
PARK17	16q11.2	VPS35	mutations ponctuelles	AD	MP	??
PARK18	3q27.1	EIF4G1	mutations ponctuelles	AD	MP	Corps de Lewy
	17q21.31	MAPT	mutations ponctuelles	AD	démence fronto-temporale avec SP	Dégénérescence neuro-fibrillaire
	15q26.1	POLG	mutations ponctuelles	AR?, AD?	SP avec neuropathie, ophtalmoplégie	??
	2p13	DCTN1	mutations ponctuelles	AD	Syndrome de Perry	Inclusions TDP-43
	2q24.1	NR4A2	mutations ponctuelles	AD?	MP	??
	5q23.2	SNCAIP	mutations ponctuelles	??	MP	??
	12q24.12	ATXN2	expansion de triplets CAG	AD	ataxie spino-cérébelleuse, MP	Corps de Lewy
	14q32.12	ATXN3	expansion de triplets CAG	AD	ataxie spino-cérébelleuse, MP	??
	1q22	GBA	mutations ponctuelles	??	maladie de Gaucher, MP	Corps de Lewy

6.2.1 Formes monogéniques

Nous allons détailler plus spécifiquement les formes monogéniques associées aux 5 gènes formellement associés à la MP (SNCA, LRRK2, Parkin, PINK1, DJ-1) et également à ATXN2 et à EIF4G1 en raison de leur intérêt au sein du laboratoire. Nous détaillerons d'abord les gènes associés à des formes autosomiques dominantes puis aux formes récessives.

6.2.1.1 SNCA (PARK1/4)

Une analyse de liaison réalisée au sein de la famille italienne 'Contursi' a permis de localiser sur le chromosome 4q22.1 le locus PARK1 associé à une forme autosomique dominante de MP (Polymeropoulos *et al*., 1996). Ce locus contient le gène SNCA, premier gène impliqué dans les formes familiales de MP. Trois mutations faux-sens, A53T (209G>A), A30P (88G>C) et E46K (188G>A), ont été identifiées respectivement dans 3 familles italienne, allemande et espagnole (Polymeropoulos *et al*., 1997, Krüger *et al*., 1998, Zarranz *et al*., 2004). La mutation A53T a ensuite été retrouvée chez quelques autres familles et son phénotype est celui d'un syndrome parkinsonien avec un âge de début précoce (45 ans en moyenne), un déclin cognitif rapide avec dysautonomie, myoclonies et présence de CL diffus (Spira *et al*., 2001). Le phénotype des sujets porteurs de la mutation E46K est plus proche de celui d'une démence à corps de Lewy (DCL), alors que celui des porteurs de la mutation A30P correspond plus à une MP. Par la suite, des multiplications du locus de SNCA (PARK4) ont été rapportées, avec duplications et triplications du gène sauvage (Singleton *et al*., 2003, Chartier-Harlin *et al*., 2004, Ibanez *et al*., 2004). Le phénotype clinique des sujets porteurs de la duplication est celui d'une MP débutant à l'âge moyen, évoluant progressivement alors que celui des porteurs d'une triplication est plus sévère, débutant plus précocement avec démence rapide, dysautonomie et présence de CL diffus (phénotype de DCL) évoquant un effet de dosage génique (Ross *et al*., 2008). D'autres rares familles présentant ces altérations génomiques ont ensuite été identifiées indiquant que les mutations de SNCA tant ponctuelles que réarrangements génomiques étaient des événements rares (<2% des formes autosomiques dominantes ; Lesage & Brice, 2009). Néanmoins, leur découverte a permis de grands progrès dans la compréhension de la maladie. Ainsi, le gène SNCA peut être à l'origine d'une MP par un gain de fonction toxique de la protéine mutée ou par la surexpression de la protéine sauvage. La mutation A53T a été associée à une régulation épigénétique avec inactivation de l'expression de l'allèle muté et surexpression de l'allèle sauvage dans les cellules sanguines (Voutsinas *et al*., 2010). Par ailleurs, des polymorphismes de SNCA ont été associés à un risque accru de développer une MP, comme plusieurs SNPs localisés

en 3' et le polymorphisme de répétition Rep1 situé en amont du promoteur qui est à l'origine d'une augmentation de l'expression de SNCA (Mueller *et al.*, 2005 ; Maraganore *et al.*, 2006).

Le gène SNCA s'étend sur 117kb, comporte 6 exons et code pour la protéine alpha-synucléine composée de 140 acides aminés. Des variants d'épissage ont été identifiés au niveau des exons 3 et 5 codant pour des isoformes de 126, 112 et 98 acides aminés par perte des exons 3, 5 et 3+5, respectivement (Beyer, 2006 ; Beyer *et al.*, 2008) (Figure 6). La région N-terminale comporte le motif KTKEGV retrouvé dans les domaines de liaison aux lipides des apolipoprotéines (Clayton & George, 1998). La région centrale appelée NAC (non-amyloid component) jouerait un rôle dans les processus d'agrégation et la région C-terminale régulerait la formation de fibrilles (Murray *et al.*, 2003).

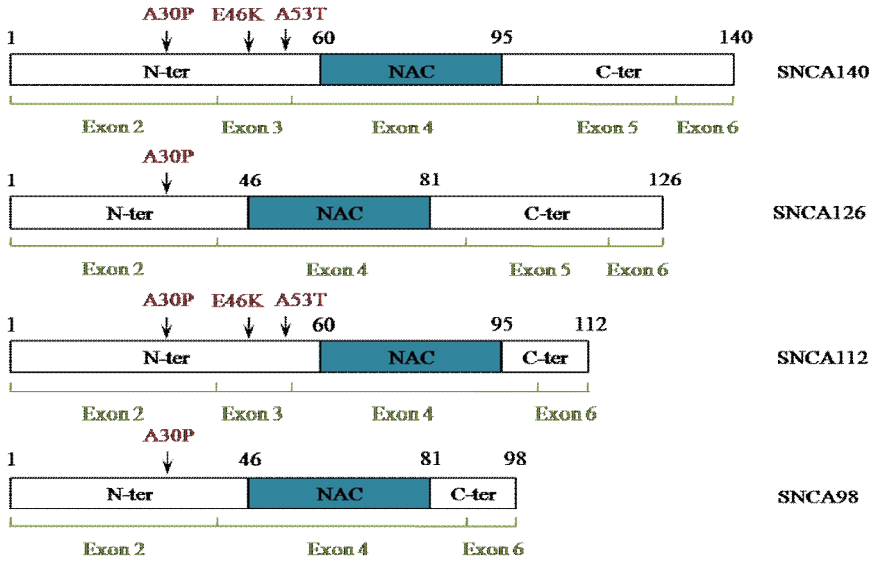


Figure 6 : Représentation schématique des 4 isoformes de SNCA avec positions des mutations ponctuelles.
SNCA140 correspond au transcrit complet ; SNCA126, SNCA112 et SNCA98 sont les variants d'épissage avec perte des exons 3, 5, 3+5, respectivement. NAC pour « non-amyloid component ».

La protéine est fortement exprimée dans le cerveau, en particulier dans les neurones, mais également dans d'autres tissus comme les cellules hématopoïétiques (Miller *et al.*, 2004). On la retrouve dans les vésicules synaptiques et les membranes plasmatiques via les lipid rafts qui sont des micro-domaines membranaires servant de plateformes à la signalisation intracellulaire (Lee *et al.*, 2008 ; Fortin *et al.*, 2004). Ces données suggèrent un rôle dans la régulation de la dynamique vésiculaire, le métabolisme lipidique et une modulation de la concentration de dopamine intracellulaire (Perez *et al.*, 2002). Une surexpression de SNCA est aussi à l'origine d'une inhibition de la libération de neurotransmetteurs synaptiques (Nemani *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'alpha-synucléine favorise l'assemblage du complexe SNARE (soluble N-ethylmaleimide-

sensitive factor attachment protein receptor) impliqué dans la fusion des vésicules synaptiques (Burré *et al*., 2010).

L'alpha-synucléine est l'un des principaux composants des CL, marqueur histologique des formes familiales et sporadiques de MP (Spillantini *et al*., 1997). Son agrégation est un des événements clés de la mort neuronale (Lee & Trojanowski, 2006). L'alpha-synucléine a une forte propension à s'agréger, surtout en cas de mutations ou de surexpression (Li *et al*., 2001 ; Shtilerman *et al*., 2002). Les monomères d'alpha-synucléine sont de conformation étalée de façon native ou peuvent se lier aux membranes sous forme d'hélices α. Ces monomères peuvent s'agréger en oligomères, qui peuvent être stabilisés par des interactions de type feuillets β et ensuite en fibrilles insolubles de haut poids moléculaire retrouvés dans les CL. Ce processus semble sous la dépendance de modifications post-traductionnelles de la protéine comme sa phosphorylation sur la Sérine 129, sa troncature par des protéases ou sa nitration lors de processus inflammatoires, qui augmentent sa capacité à s'agréger (Cookson, 2009). Par ailleurs, les proto-fibrilles pourraient être directement toxiques en perméabilisant les membranes et formant des pores (Volles & Lansbury, 2002) et les mutations ponctuelles A53T et A30P provoquent la formation préférentielle des proto-fibrilles toxiques (Li *et al*., 2001). La toxicité induite par l'alpha-synucléine est responsable d'une altération du transport vésiculaire entre le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi (Cooper *et al*., 2006), d'une diminution de la libération des vésicules synaptiques, d'un dysfonctionnement mitochondrial avec perturbation énergétique et induction de l'apoptose. Cette toxicité est également à l'origine d'un dysfonctionnement des voies de dégradation protéique par le système ubiquitine-protéasome (SUP) (Rideout *et al*., 2001) et de l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) (Cuervo *et al*., 2004) par l'inhibition des fonctions lysosomales. Enfin, des études *in vitro* montrent que l'alpha-synucléine et ses agrégats ont la capacité à se propager de cellules en cellules par exocytose (Lee *et al*., 2005). Ceci pourrait expliquer la propagation de dépôts d'alpha-synucléine dans une réaction de type hôte *versus* greffon chez les sujets ayant bénéficié d'une greffe cérébrale de cellules embryonnaires (Li *et al*., 2008). Par ailleurs, il a été récemment démontré que les mutations ponctuelles de SNCA ou sa surexpression entraînent la formation de tubules dans les bi-couches lipidiques (Pandey *et al*., 2011).

6.2.1.2 LRRK2 (PARK8)

En 2002, une analyse de liaison au sein de la famille japonaise 'Sagamihara' a localisé le locus PARK8 sur le chromosome 12p12 (Funayama *et al*., 2002). Les individus présentaient une MP typique dopasensible de transmission autosomique dominante. Des mutations au sein du gène

LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2) ont ensuite été identifiées dans plusieurs familles d'origine européenne (Paisan-Ruiz *et al.*, 2004 ; Zimprich *et al.*, 2004). Plus de 100 mutations ponctuelles faux-sens ou non-sens ont été décrites, mais seules 6 ont démontré formellement leur causalité (R1441C/G/H, Y1699C, G2019S, I2020T). La mutation G2019S, située dans l'exon 41, est particulièrement fréquente puisqu'elle rend compte de 1% des formes sporadiques de MP et 4% des formes autosomiques dominantes en population caucasienne (Healy *et al.*, 2008) avec des fréquences très élevées dans certaines populations (15% chez les Juifs Ashkénazes et 40% chez les Maghrébins) (Lesage *et al.*, 2006, Ozelius *et al.*, 2006). Sa pénétrance est variable et est estimée entre 24 et près de 100% à 80 ans (Goldwurm *et al.*, 2011). Deux polymorphismes de LRRK2 (G2385R et R1628P) ont été mis en évidence dans les populations asiatiques comme facteurs de risque de MP (Di Fonzo *et al.*, 2006 ; Ross *et al.*, 2008).

Le phénotype clinique est le plus souvent celui d'une MP typique débutant à l'âge moyen ; néanmoins des cas atypiques ont été décrits avec dopa-résistance, démence précoce, maladie du motoneurone, paralysie de la verticalité du regard. L'étude neuropathologique montre également un phénotype pléiomorphe avec classiquement une perte cellulaire nigrée et des CL, mais dans certains cas une absence de CL, une dégénérescence neuro-fibrillaire, des inclusions TDP-43 ou ubiquitine (Wider *et al.*, 2010). Cette variabilité clinique et pathologique suggère que LRRK2 jouerait un rôle sur plusieurs carrefours de neurodégénérescence.

Le gène LRRK2 s'étend sur 144 kb, comporte 51 exons et code pour une protéine (initialement nommée dardarin, pour tremblement en Basque) de 2517 acides aminés. Elle comporte plusieurs domaines fonctionnels (Figure 7). Elle appartient à la superfamille Ras/GTPase et plus particulièrement à la famille ROCO, caractérisée par la présence d'un domaine GTPase (ROC) et d'un domaine COR. Parmi les autres domaines fonctionnels, se trouvent un domaine riche en leucine (suggérant un rôle dans les interactions protéines/protéines) et un domaine kinase (homologue des MAPKKK, mitogen-activated protein kinase kinase kinase) (Mata *et al.*, 2006). Elle est aussi considérée comme une protéine tyrosine-kinase capable d'autophosphorylation (West *et al.*, 2005 ; Gloeckner *et al.*, 2009 ; Greggio *et al.*, 2008). Les mutations principales sont localisées dans les domaines GTPase et kinase, suggérant une altération de la signalisation cellulaire. Le domaine kinase est requis pour la toxicité des mutants (Smith *et al.*, 2006). Seule la mutation G2019S localisée dans le domaine kinase en augmente l'activité (Greggio & Cookson, 2009). Une autre interprétation est que le domaine kinase régule le domaine GTPase/ROC qui serait impliqué dans le processus pathologique (Greggio *et al.*, 2011).

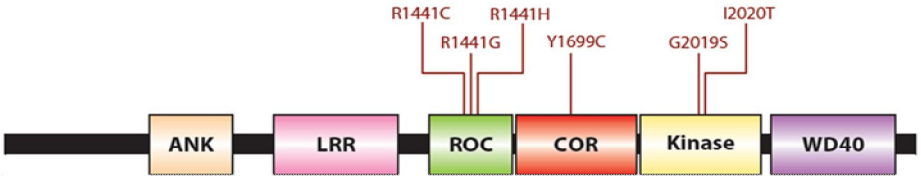


Figure 7 : Représentation schématique de LRRK2 avec positions des 6 mutations pathogènes au sein des domaines fonctionnels d'après Martin *et al.*, 2011.
ANK = Ankyrin-like repeats, LRR = leucine-rich repeats, ROC = Ras of complex proteins domaine GTPase, COR = C-terminal of ROC, Kinase et WD40.

La protéine LRRK2 est exprimée dans le système nerveux cérébral, et également dans d'autres organes ou cellules périphériques comme les leucocytes. Elle est localisée dans le cytoplasme et associée aux membranes, en particulier vésiculaires (lysosomes, endosomes), mitochondriales externes, synaptiques, du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi ainsi qu'aux microtubules et aux lipid rafts (Biskup *et al.*, 2006 ; Hatano *et al.*, 2007). Elle est également localisée dans le cœur des corps de Lewy (Vitte *et al.*, 2010). Différentes études *in vitro* et sur modèles animaux ont impliqué LRRK2 dans le contrôle et le maintien de la longueur des neurites (MacLeod *et al.*, 2006) par un mécanisme d'autophagie (Plowey *et al.*, 2008), dans l'endocytose des vésicules synaptiques (Shin *et al.*, 2008), le tri vésiculaire entre axone et dendrites (Sakaguchi-Nakashima *et al.*, 2007) et la modulation du trafic des vésicules synaptiques (Piccoli *et al.*, 2011). Elle joue également un rôle dans la transduction des signaux notamment par la voie MAPK en phosphorylant MKK3/4 et ERK1/2 (Gloeckner *et al.*, 2009 ; Carballo-Carbajal *et al.*, 2010), dans le contrôle de la traduction des protéines par la phosphorylation de 4E-BP (Imai *et al.*, 2008) et son interaction avec des micro-ARN régulant la synthèse protéique (Gehrke *et al.*, 2010). Elle semble impliquée dans la dynamique du cytosquelette par son interaction aux micro-tubules (Gandhi *et al.*, 2008 ; Gillardon, 2009), sa phosphorylation de la protéine tau et de la moesin, élément de la famille ERM (ezrin, radixin, moesin) qui lie la membrane plasmatique au cytosquelette (Melrose *et al.*, 2010 ; Jaleel *et al.*, 2007). Enfin, plusieurs données suggèrent que LRRK2 joue un rôle en amont de SNCA, car elle peut phosphoryler l'alpha-synucléine sur la sérine 129 (Qing *et al.*, 2009). Toutes deux ont des interactions avec les membranes biologiques et notamment les lipid rafts. De plus, l'altération du transport axonal lors des mutations LRRK2 pourrait entraîner une accumulation d'alpha-synucléine avec augmentation de l'autophagie et de la mort cellulaire (Tong *et al.*, 2010). La mutation G2019S de LRRK2 favorise la phosphorylation, l'agrégation et la propagation de l'alpha-synucléine aux cellules voisines (Kondo *et al.*, 2011).

6.2.1.3 ATXN2

L'ataxie spino-cérébelleuse de type 2 est une maladie autosomique dominante caractérisée par une expansion de triplets CAG au sein du gène ATXN2 localisé sur le chromosome 12q24.12 codant pour la protéine Ataxin-2. Le tableau clinique est variable, mais comporte le plus souvent une ataxie cérébelleuse, une ophtalmoparésie et une neuropathie périphérique. En raison de la présence d'un syndrome parkinsonien *a minima* et d'une dépigmentation de la SN chez certains sujets, la recherche d'une mutation du gène ATXN2 a été identifiée dans une famille chinoise de patients parkinsoniens (Gwinn-Hardy *et al.,* 2000). Depuis, cette mutation a été retrouvée dans plusieurs familles (1,5% en population caucasienne et 8% en population asiatique) et également chez des parkinsoniens sporadiques (0,5%) avec un phénotype typique de MP dopa-sensible (Furtado *et al.*, 2004 ; Shan *et al.*, 2004). L'autopsie d'un cas de MP associé à une mutation ATXN2 a identifié une atrophie olivo-ponto-cérébelleuse, une dégénérescence nigrée et des dépôts d'alpha-synucléine (type corps de Lewy) dans la SN, le *locus cœruleus* et le noyau dorsal du vague (Yomono *et al.*, 2010).

La valeur de 31 triplets a été proposée comme valeur seuil de la taille de l'expansion de triplets pathologique pour l'ataxie spino-cérébelleuse SCA2 avec le plus souvent une taille supérieure à 38 triplets (Riess *et al.,* 1997). La différence génomique entre les sujets de phénotype cérébelleux et parkinsonien semble résider en une taille d'expansion de triplets CAG plus courte et entrecoupée différemment par plusieurs triplets CAA pour les formes à phénotype purement parkinsonien (Kim *et al.,* 2007). Cette différence aurait des conséquences sur la fonction des transcrits. Les longs transcrits sans interruptions formeraient des épingles à cheveux simples alors que les transcrits plus courts et avec interruptions formeraient des structures en épingle à cheveux branchées qui interféreraient avec les ARNm et gêneraient la traduction (Sobczak & Krzyzosiak, 2005).

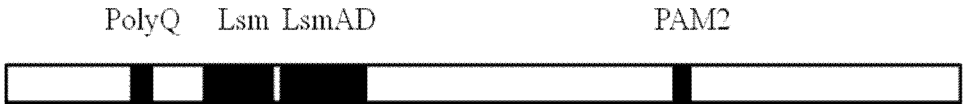


Figure 8 : Représentation schématique de l'Ataxin-2 avec ses domaines fonctionnels d'après Lastres-Becker *et al.*, 2008**.**
Le domaine poly-glutamine (PolyQ) est situé en 3'. Le domaine Lsm (Like Sm domain) est impliqué dans le métabolisme des ARNm, le domaine LsmAD (Lsm-associated domain) comporte des signaux d'adressage au Golgi et au RE, le motif PAM2 sert à l'assemblage avec la polyadenylate (polyA)-binding protein PABP.

La protéine Ataxin-2 a un poids moléculaire de 140kDa et comporte un domaine polyglutamine ; elle est localisée dans l'appareil de Golgi et les membranes (Figure 8). Elle est associée aux polyribosomes (Satterfield & Pallanck, 2006) et impliquée dans la maturation des

ARN et l'assemblage des granules de stress (Ralser *et al.*, 2005). Le transcrit pathologique du gène ATXN2 jouerait un rôle délétère en séquestrant des protéines se liant à l'ARN.

6.2.1.4 EIF4G1(PARK18)

Une analyse de liaison au sein d'une famille suivie dans notre unité présentant une MP de forme autosomique dominante a identifié un nouveau locus (PARK18) sur le chromosome 3q27.1. Le séquençage de la région a permis d'identifier une mutation au sein du gène EIF4G1 (eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1) ségrégeant avec la maladie (Chartier-Harlin *et al*., 2011). Plusieurs autres mutations ponctuelles ont ensuite été trouvées dans d'autres familles (Voir détails dans la section IV.1). Le gène EIF4G1 comporte 34 exons, dont les 9 premiers sont soumis à un épissage alternatif. La protéine eIF4G1 appartient au complexe protéique chargé notamment d'initier la traduction de certains ARNm impliqués dans la régulation de l'activité mitochondriale (Ramirez-Valle *et al*., 2008).

6.2.1.5 Parkin (PARK2)

Une analyse de liaison réalisée dans des familles présentant un syndrome parkinsonien de début précoce (<40 ans) voire juvénile, de transmission autosomique récessive a identifié le locus PARK2 sur le chromosome 6q26 (Matsumine *et al*., 1997). Le gène responsable a été nommé Parkin (PRKN) ; il contient 12 exons qui s'étendent sur 1,53Mb et code pour une protéine de 465 acides aminés (Kitada *et al*., 1998). Le tableau clinique comporte un syndrome parkinsonien de début précoce (dystonie souvent inaugurale), dopasensible, d'évolution lente et avec apparition précoce de dyskinésies (Yamamura *et al*., 1973). Néanmoins, certains patients présentent le phénotype d'une MP typique (Klein *et al*., 2000). Le tableau neuropathologique est le plus souvent celui d'une perte cellulaire marquée dans la SN et plus modérée dans le *locus cæruleus* sans corps de Lewy même si de rares cas avec CL ont été décrits (Farrer *et al*., 2001). De multiples mutations au sein du gène PRKN ont été décrites : délétions, multiplications d'exons, mutations ponctuelles non-sens et faux-sens de façon homozygote ou hétérozygote composite (Abbas *et al*., 1999). Ces mutations rendent compte de près de 50% des MP autosomiques récessives de début précoce, mais leur fréquence diminue avec l'augmentation de l'âge de début (<1% après 50 ans) (Lücking *et al*., 2000). Par ailleurs, des mutations hétérozygotes simples de la PRKN ont été identifiées chez de nombreux patients parkinsoniens, mais leur rôle dans la pathogénie est encore discuté (Klein *et al*., 2007).

La protéine Parkin comporte un domaine N-terminal ubiquitine-like et une région C-terminal comportant 2 domaines RING séparées par un domaine IBR (in between RING) (Figure 9). Cette

structure en fait une enzyme E3 ubiquitine-ligase qui interagit avec les enzymes E2 de conjugaison de l'ubiquitine qui catalysent la liaison de molécules d'ubiquitine aux protéines cibles qui seront détruites par le protéasome (Shimura *et al.*, 2000).

Figure 9 : Représentation schématique des domaines fonctionnels de PRKN d'après Martin *et al.*, 2011.
UBL = domaine ubiquitin-like, 2 domaines RING encadrant le domaine IBR.

La protéine Parkin est localisée principalement dans le cytosol, mais également au niveau des vésicules synaptiques, de l'appareil de Golgi, du réticulum endoplasmique et la membrane mitochondriale externe indiquant un rôle dans le trafic vésiculaire (Bekris *et al.*, 2010). La Parkin a été identifiée au sein des corps de Lewy (Schlossmacher *et al.*, 2002). La perturbation de l'élimination des mitochondries endommagées (mitophagie) semble être un des mécanismes principaux de la mort neuronale associée à la Parkin. La Parkin est recrutée par les mitochondries endommagées caractérisées par une diminution de leur potentiel de membrane et entraîne leur élimination par les autophagosomes (Narendra *et al.*, 2008). La mitophagie fait intervenir l'ubiquitination du facteur de fusion mitochondriale par la Parkin (Glauser *et al.*, 2011). Les mutations de Parkin perturbent l'ubiquitination des mitochondries et la mitophagie médiée par HDAC6 (Lee *et al.*, 2010). Dans ce cadre, Parkin active le SUP en vue de la protéolyse de la membrane mitochondriale externe (Chan & Chan, 2011). Elle régule l'expression de PARIS (Parkin-interacting substrate) via le SUP et l'expression de PGC-1α (PPARγ coactivator 1α), qui contrôle l'expression des gènes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ceci entraîne une perte des neurones dopaminergiques en cas de mutation (Shin *et al.*, 2011). Enfin, de part son activité E3 ubiquitine-ligase, la Parkin joue également un rôle dans le métabolisme lipidique (Kim *et al.*, 2011).

6.2.1.6 PINK1 (PARK6)

Le locus PARK6 a été localisé sur le chromosome 1p36.12 dans une grande famille italienne consanguine présentant une MP autosomique récessive de début précoce (Valente *et al.*, 2001). Par la suite, le gène responsable PINK1 (phosphatase and tensin homolog (PTEN)-induced kinase 1) a été identifié. Il s'étend sur 1,8kb, contient 8 exons et code pour une protéine de 581 acides aminés (Valente *et al.*, 2004). Les mutations sont principalement des mutations ponctuelles non-sens et faux-sens et de rares délétions (Hatano *et al.*, 2004). Elles représentent de 1 à 8% des MP

familiales de début précoce (Klein & Schlossmacher, 2007) avec un phénotype clinique et neuropathologique typique (Gandhi *et al.*, 2006). Il semble également que la présence d'une mutation hétérozygote de PINK1 soit associée à une augmentation du risque de MP (Abou-Sleiman *et al.*, 2006).

La protéine PINK1 comporte un motif d'adressage à la mitochondrie en N-terminal et un domaine sérine/thréonine kinase (Mills *et al.*, 2008). Elle a une expression ubiquitaire et est localisée dans le cytosol et l'espace inter-membranaire mitochondrial (Silvestri *et al.*, 2005). PINK1 agit en amont de la Parkin dans la voie de dégradation des mitochondries endommagées (Clark *et al.*, 2006 ; Park *et al.*, 2006) et régule la phosphorylation oxydative en jouant sur la fission des mitochondries (Liu *et al.*, 2011).

6.2.1.7 DJ-1 (PARK7)

Le locus PARK7 a été localisé sur le chromosome 1p36.23 dans une famille hollandaise présentant une MP autosomique récessive (Van Duijn *et al.*, 2001). Le gène causal est DJ-1 qui contient 8 exons et code pour une protéine de 189 acides aminés (Bonifati *et al.*, 2003). Plusieurs mutations (délétions d'exons, mutations faux-sens) ont été identifiées au sein du gène DJ-1 qui rendent compte de <1% des MP de début précoce (Kubo *et al.*, 2006). Le tableau clinique est similaire à celui des sujets porteurs de mutations PRKN ou PINK1.

DJ-1 est une protéine cytoplasmique, qui peut être localisée à la mitochondrie où elle agit comme antioxydant (Abou-Sleiman *et al.*, 2003). Elle peut également limiter l'agrégation de l'alpha-synucléine (Batelli *et al.*, 2008). DJ-1 joue également un rôle dans le maintien de l'intégrité des mitochondries (Thomas *et al.*, 2011). Récemment, il a été démontré que Parkin, PINK1 et DJ-1 formaient un complexe qui jouait un rôle de E3 ligase et promouvait l'ubiquitination et la dégradation des substrats de la Parkin (Xiong *et al.*, 2009). De plus, DJ-1 se lie à la protéine mitochondriale BCL-XL et en limite la dégradation (Ren *et al.*, 2011).

6.2.2 Facteurs de susceptibilité génétique

L'ensemble des mutations génétiques précédemment décrites ne peut expliquer plus de 10% des cas de MP. Plusieurs facteurs de susceptibilité ont été recherchés par étude d'association avec des gènes candidats. Des méta-analyses ont identifié le variant S18Y de UCHL1, le variant Rep1 et des variants en 3' de l'alpha-synucléine, l'haplotype H1 de tau (MAPT), le variant G2385R de LRRK2 comme des facteurs de risque de développer une MP (Tan, 2007).

L'utilisation de puces de génotypage de polymorphismes de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism) couvrant 500 000 à 1 million de variants pour chaque individu, a permis

l'identification de facteurs de susceptibilité par des études d'association pangénomique (GWAS Genome-wide Association Studies). De multiples SNP ont été identifiés comme facteurs de susceptibilité à la MP, mais les associations avec des variants de SNCA, MAPT, BST1 et LRRK2 semblent les plus robustes (Gasser *et al.*, 2011 ; www.pdgene.org) (Tableau 2).

Enfin, le gène de la glucocérébrosidase (GBA) occupe une place importante dans la susceptibilité à développer une MP. Une faible proportion des sujets atteints par la maladie de Gaucher (maladie autosomique récessive multisystémique du stockage lipidique lysosomal par mutation homozygote de GBA) présentent un syndrome parkinsonien avec corps de Lewy. Par ailleurs, la présence d'une mutation hétérozygote au sein de ce gène est responsable d'un risque accru de MP (odd-ratio de 5) (Sidransky *et al.*, 2009). Cette anomalie génétique est responsable d'un dysfonctionnement lysosomal avec altération des voies de l'autophagie et augmentation de l'agrégation protéique notamment de l'alpha-synucléine (Bekris *et al.*, 2010) reliant maladie de Gaucher et MP ; ce d'autant que GBA interagit avec l'alpha-synucléine (Yap *et al.*, 2011).

Tableau 2 : Résultats des 10 principales études d'association pangénomique GWAS de la MP issus du site www.pdgene.org.
Des polymorphismes du gène SNCA sont retrouvés dans les 10 études, 6 études pour MAPT, 5 études pour BST1 et 4 pour LRRK2.

Etude	Nombre de SNP	Cas (GWAS/suivi)	Contrôles (GWAS/suivi)	Gènes
Pankratz *et al*., 2009	328 189	857	867	CRHR1 DGKQ GAK IMP5 MAPT MMRN1 PLEKHM1 SNCA
Simon-Sanchez *et al*., 2009	463 185	1745/3452	4047/4756	LRRK2 MAPT NUCKS1 SNCA
Satake *et al*., 2009 Population asiatique	435 470	1078/933	2628/15753	BST1 LRRK2 NUCKS1 PM20D1 SLC41A1 SLC45A3 SNCA
Hamza *et al*., 2010	811 597	2000	1986	GAK HLA-DRA MAPT SNCA
Spencer *et al*., 2011	1 733 533	1705/1039	5175/1984	MAPT SNCA
Saad *et al*., 2011	492 929	1039/3232	1984/7064	BST1 SNCA
Do *et al*., 2011	522 782	3426/6584	29624/15470	FAM47E GBA IMP5 MCCC1 RIT2 SLC41A1 SNCA SREBF1 TREM175
Liu *et al*., 2011 Population juive Ashkénaze	525 124	268/1782	178/1658	BST1 GBA LAMP3 LOC15332 LRRK2 NSF NUCKS1 SLC25A48 SLCO3A1 SNCA STK39 UNC13B WNT3
Simon-Sanchez *et al*., 2011	514 799	772	2024	BST1 BTNL2 MAPT PCGF3 SNCA
Nalls *et al*., 2011 Méta-analyse	7 689 524	5333/7053	12019/9007	ACMSD/TMEM BST1 CCDC62/HIP1R GAK HLA-DRB5 LRRK2 MAPT MCCC1 SNCA STK39 SYT11/RAB25

7. Mécanismes pathogéniques

La compréhension des mécanismes associés à la MP a progressé grâce aux constatations anatomopathologiques, à la découverte des gènes impliqués et l'analyse de leur rôle ainsi qu'aux modèles expérimentaux notamment toxiques. Il existe désormais un consensus sur certains mécanismes à l'origine de la mort cellulaire qui contribuent à la perte neuronale de la MP. Le stress oxydant, le dysfonctionnement mitochondrial, les voies de dégradation des protéines et organites altérés et les phénomènes inflammatoires entraînent un dysfonctionnement puis une mort cellulaire par apoptose et autophagie (Schapira & Jenner, 2011).

7.1 Stress oxydant

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la production de radicaux libres de l'oxygène (délétères pour la cellule) et les mécanismes de défense antioxydants. Les neurones dopaminergiques subissent l'attaque de grandes quantités de radicaux libres en raison de la dégradation de la dopamine (Graham *et al.*, 1978, Spina & Cohen, 1989) et de la richesse en fer de la substance noire (Jellinger *et al.*, 1990 ; Dexter *et al.*, 1991). Il existe par ailleurs un déficit en enzymes détoxifiantes (catalase, superoxyde dismutase, glutathion peroxydase). Ce stress oxydant est à l'origine d'une peroxydation des lipides et de dommages des protéines et de l'ADN. La vulnérabilité des cellules dopaminergiques au stress oxydant est mis en exergue par la découverte de l'effet de la 6 hydroxydopamine (6-OHDA) qui détruit les cellules de la SN, servant ainsi de modèle expérimental (Ungerstedt *et al*., 1974). Sur le plan génétique, la découverte du gène DJ-1 qui a un rôle d'antioxydant appuie l'implication du stress oxydant dans la pathogénie de la MP. De même, les mutations de LRRK2, en hyper-phosphorylant PRDX3 (peroxiredoxin 3, membre mitochondrial des peroxydases), exacerbent la mort neuronale liée au stress oxydant (Angeles *et al*., 2011). La surexpression de SNCA est aussi à l'origine d'une exacerbation du stress oxydant qui perturbe le fonctionnement mitochondrial (Parihar *et al*., 2009).

7.2 Dysfonctionnement mitochondrial

Les altérations mitochondriales sont principalement situées au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire avec réduction de son activité dans la SN des parkinsoniens (Schapira *et al.*, 1990). Ces perturbations ont également été identifiées dans le muscle strié, les plaquettes et les lymphocytes (Schapira, 1994). Elles entraînent une diminution de la production d'ATP et une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et donc perturbent le fonctionnement

cellulaire. De plus, plusieurs gènes impliqués dans la MP sont liés à la mitochondrie comme Parkin et PINK1 qui en régulent l'activité. Les animaux invalidés pour l'expression de ces 2 gènes montrent des perturbations du fonctionnement mitochondrial (Itier *et al*., 2003; Park *et al*., 2006 ; Gautier *et al*., 2008). Ces 2 gènes agissent dans la voie favorisant la fission de la mitochondrie (Deng *et al*., 2008) et sont impliqués dans la mitophagie. Par ailleurs, une fraction de l'alpha-synucléine est localisée à la mitochondrie (Li *et al*., 2007) et inhibe le complexe I de façon dose-dépendante (Devie *et al*., 2008). Les patients porteurs de la mutation G2019S de LRRK2 présentent dans leurs fibroblastes des perturbations mitochondriales (Mortiboys *et al*., 2010). Les toxines inhibant la mitochondrie miment certaines caractéristiques de la MP et sont utilisées dans les modèles expérimentaux. Le MPTP fut identifié accidentellement par des toxicomanes qui développèrent un syndrome parkinsonien après son injection intra-veineuse (Langston *et al*., 1983). *In vivo*, le MPTP est transformé en MPP+ par la monoamine oxydase dans les cellules gliales, puis est transporté dans les neurones où il inhibe de façon drastique le complexe I mitochondrial (Javitch *et al*., 1985). Le MPTP est utilisé pour entraîner un syndrome parkinsonien chez les rongeurs et les primates où il induit une perte neuronale dopaminergique de la SNc. La roténone est un insecticide qui inhibe aussi le complexe I et son administration chronique chez les rats induit une déplétion dopaminergique nigrée et des inclusion fibrillaires d'alpha-synucléine (Betarbet *et al*., 2000). Enfin, des souris transgéniques (MitoPark) présentant une délétion du facteur de transcription mitochondrial A montrent une réduction du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale avec dégénérescence neuronale nigrée progressive (Ekstrand *et al*., 2007). Toutes ces données démontrent l'importance de la mitochondrie dans la pathogénie de la MP.

7.3 Voies de dégradation des molécules et organites

Les cellules ont plusieurs moyens pour dégrader les protéines anormalement conformées. Ces mécanismes régulent également les niveaux cellulaires de nombreuses protéines. Le protéasome est un complexe multi-protéique qui dégrade les protéines marquées par l'ubiquitine par l'action de plusieurs enzymes ligases E1, E2 et E3. Dans la MP, ce système ubiquitine-protéasome est défaillant avec une diminution de 40% de son activité dans la SNc (McNaught *et al*., 2001). Par ailleurs, les mutations de la Parkin diminuent son activité d'enzyme E3 ligase (Shimura *et al*., 2000). Le SUP est également lié à l'alpha-synucléine puisque sa surexpression ou ses mutations sont responsables d'une diminution de l'activité du protéasome (Stefanis *et al*., 2001). En retour, l'inhibition du SUP contribue à l'accumulation d'alpha-synucléine et son agrégation intra-cytoplasmique (Rideout *et al*., 2004).

Les cellules disposent d'un autre moyen pour diminuer les taux de protéines mal conformées ou anormales : il s'agit de la voie du stress du réticulum endoplasmique (RE) ou UPR (unfolded protein response) (Ron & Walter, 2007). L'activation de l'UPR entraîne une diminution de la traduction, de la prise en charge des protéines mal conformées par des chaperonnes et peut être à l'origine de la mort cellulaire programmée. Dans le cadre de la MP, il a été identifié une telle activation dans la SN en lien avec des dépôts d'alpha-synucléine avec phosphorylation de PERK (pancreatic ER kinase) et d'EIF2 (eukaryotic initiation factor 2), qui sont les marqueurs de l'UPR (Hoozemans *et al*., 2007). L'accumulation d'alpha-synucléine occasionne une activation du stress du RE (Bellucci *et al*., 2011). De plus, l'activation de l'UPR induit l'expression de la Parkin, ce qui en fait un lien entre le stress du RE et la mitochondrie (Bouman *et al*., 2011). Enfin, LRRK2 protégerait de la mort neuronale induite par la 6-OHDA ou par la surexpression de SNCA par modulation du stress du RE chez C. elegans (Yuan *et al*., 2011). Toutes ces données récentes font du stress du RE une voie impliquée dans la pathogénie de la MP.

A côté du SUP et de l'UPR, la voie de l'autophagie lysosomale est un important système de dégradation. Il existe 3 types d'autophagie : la macroautophagie, l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) et la microautophagie (Martinez-Vicente & Cuervo, 2007). La macroautophagie est impliquée dans la dégradation des larges débris comme les agrégats protéiques et les organelles (mitochondrie). Une vésicule à double membrane (autophagosome) se forme autour du matériel à dégrader. Puis l'autophagosome fusionne avec un lysosome qui dégrade le contenu. La CMA implique un adressage direct au lysosome des protéines cytoplasmiques ayant un motif spécifique KFERQ. Les protéines ciblées sont reconnues par la chaperone cytosolique heat-shock cognate 70 (Hsc70), puis sont transportées vers les lysosomes grâce à leur association avec LAMP2A (lysosome-associated membrane proteine 2A). La microautophagie implique l'absorption directe par les lysosomes (Figure 10).

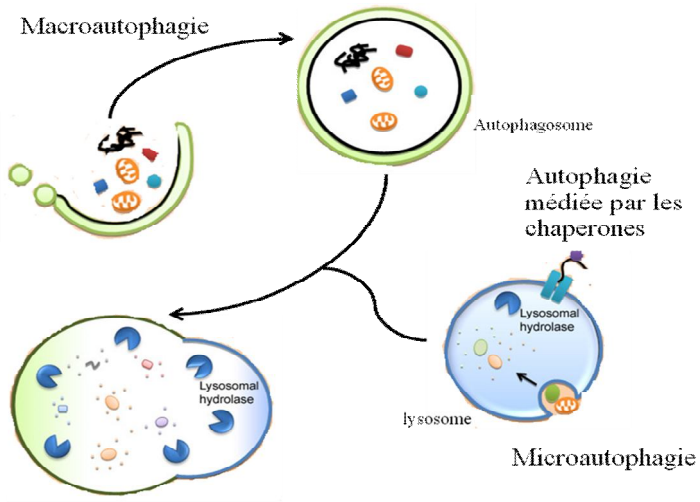


Figure 10 : Voies de l'autophagie : macroautophagie, autophagie médiée par les chaperones et microautophagie d'après Cheung & Ip, 2009.

Dans la MP, il existe des preuves d'autophagie au niveau de la SN avec augmentation du nombre d'autophagosomes (Anglade *et al.*, 1997 ; Dehay *et al.*, 2010) et altération de la CMA avec diminution de l'expression de LAMP2A et Hsc70 (Alvarez-Erviti *et al.*, 2010). De plus certains gènes impliqués dans la MP codent pour des protéines lysosomales comme ATP13A2 responsable du syndrome de Kufor-Rakeb et la glucocérébrosidase (GBA) de la maladie de Gaucher. L'autophagie est importante dans la régulation de la dégradation de l'alpha-synucléine : les formes solubles sont dégradées par le SUP et la CMA (Webb *et al.*, 2003), alors que les formes insolubles sont détruites par macroautophagie (Rideout *et al.*, 2004). Par ailleurs, les mutants de SNCA inhibent la CMA (Cuervo *et al.*, 2004). La perte de fonction de GBA est à l'origine d'une accumulation d'alpha-synucléine qui inhibe en retour l'activité lysosomale de GBA (Mazzulli *et al.*, 2011). L'autophagie joue aussi un rôle dans l'effet pathogène de LRRK2, puisque son effet sur la longueur des neurites semble dépendre de l'autophagie (Plowey *et al.*, 2008). Enfin, chez les souris traitées par le MPTP, la formation de ROS (espèces réactives de l'oxygène) dans la mitochondrie entraîne une perméabilisation anormale de la membrane lysosomale et une accumulation d'autophagosomes dans les neurones dopaminergiques (Dehay *et al.*, 2010). Toutes ces données indiquent que les lysosomes sont un élément important de la pathogénie de la MP et qu'ils sont reliés aux événements mitochondriaux et au stress oxydant.

7.4 Phénomènes inflammatoires

Sur les examens neuropathologiques, il existe une microgliose et une astrocytose dans les régions cérébrales affectées par la MP. De plus, on note une élévation des enzymes iNOS (inducible nitric oxide synthetase), COX2 (cyclo-oxygenase 2) (Knott *et al.*, 2000) et une

altération de nombreuses cytokines dans la SN comme interleukin 2 (IL2), IL6, TNF-α (tumor necrosis factor alpha), TGF-β (transforming growth factor beta) et IFN-γ (interferon gamma) (McGeer *et al.*, 1988 ; Hunot & Hirsch, 2003). De plus, les cellules gliales montrent également des perturbations du complexe I mitochondrial et du protéasome. Il n'est pas déterminé si l'activation microgliale est un mécanisme primaire dans la mort des cellules dopaminergiques ou une conséquence de la perte neuronale. Néanmoins, une activation microgliale est détectée de nombreuses années après l'exposition au MPTP suggérant un rôle dans la pérennisation du processus délétère (McGeer *et al*., 2003). Enfin des cellules immunitaires lymphocytes T CD4+ et CD8+ ont été détectées dans la SN de sujets parkinsoniens (McGeer *et al*., 1988 ; Brochard *et al*., 2009). Cette infiltration leucocytaire pourrait être la conséquence d'une altération de la barrière hémato-encéphalique mise en évidence chez les parkinsoniens (Kortekaas *et al*., 2005).

7.5 Synthèse

Toutes ces données montrent que de multiples phénomènes pathologiques concourent à la mort neuronale (Figure 11). S'il existe désormais un consensus sur les mécanismes généraux impliqués (stress oxydant, dysfonctionnement mitochondrial, voie de dégradation des molécules et réactions inflammatoires) ; il reste à déterminer la combinaison et la séquence des événements aboutissant à la mort neuronale (Schapira & Jenner, 2011). De même, la sélectivité des lésions neuronales et non-neuronales reste encore à expliquer. De plus, les événements moléculaires précédant la mort neuronale nécessitent d'être précisés comme la redistribution synaptique des protéines SNARE et l'accumulation d'alpha-synucléine qui sont des événements précoces dans un modèle murin induit par l'expression d'une alpha-synucléine tronquée (Garcia-Reitböck *et al.*, 2010). Enfin, des données récentes *in vitro* et *in vivo* suggèrent que les formes fibrillaires et oligomériques d'alpha-synucléine peuvent essaimer de proche en proche selon un mécanisme évoquant celui de la protéine prion ouvrant ainsi le champ vers de nouvelles perspectives thérapeutiques (Mougenot *et al*., 2011 ; Lee *et al*., 2011).

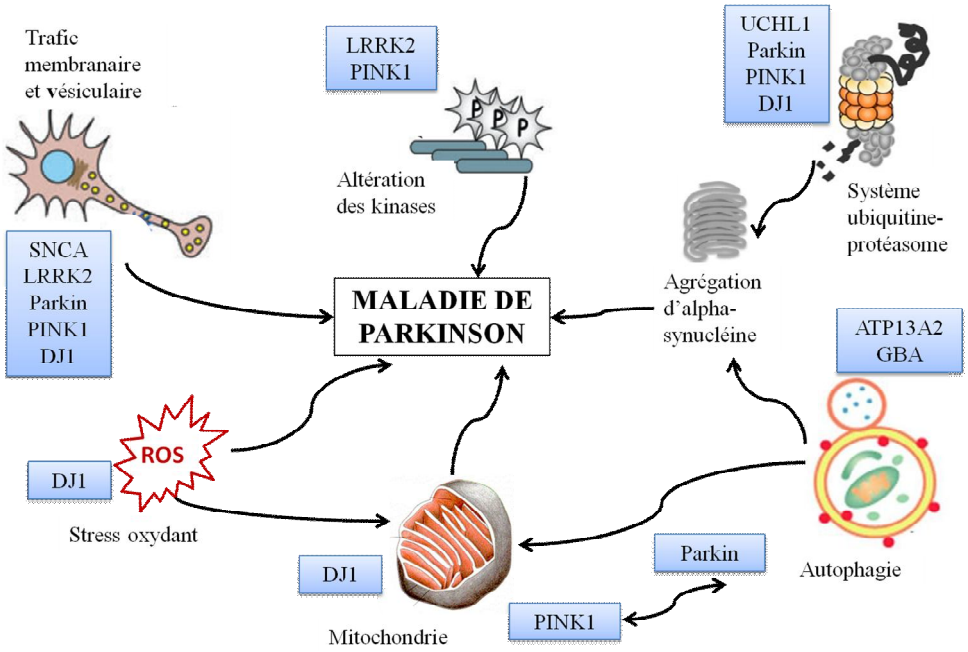


Figure 11 : Représentation schématique de la pathogénie de la MP avec localisation des gènes dans les différents systèmes impliqués d'après Hatano *et al.*, 2009.

8. Modèles expérimentaux

Les différents mécanismes à l'origine de la MP ont été identifiés grâce à l'étude de modèles expérimentaux cellulaires comme animaux, toxiques et génétiques.

8.1 Modèles cellulaires

Les modèles cellulaires de la MP les plus utilisés sont les lignées neuronales issues de neuroblastome humain (comme les SH-SY5Y) et les cultures primaires de neurones mésencéphaliques. Le traitement de ces cellules par les neurotoxines, comme le MPP+, la 6-OHDA ou la roténone, montrent de nombreux aspects de la mort des neurones dopaminergiques observés dans la MP. Les neurones mésencéphaliques sont une source de neurones dopaminergiques mais ces cellules humaines sont relativement difficiles à obtenir et à cultiver. Les lignées cellulaires de type SH-SY5Y sont des cellules qui possèdent les caractéristiques biochimiques de neurones humains dopaminergiques (Xie *et al.*, 2010). Ces cellules permettent également d'exprimer ou d'invalider les gènes humains sauvages ou ayant des mutations pathogènes afin de disséquer les fonctions moléculaires des gènes et protéines impliqués dans la MP. Par exemple, le gène LRRK2 présentant la mutation G2019S a été exprimé dans cette lignée suggérant ainsi l'implication de l'autophagie dans sa pathogénie (Plowey *et al.*, 2008). Les cellules SH-SY5Y exprimant de façon stable la mutation A53T de SNCA sont plus vulnérables à l'exposition au MPP+ et pourraient servir de modèles pour tester de nouvelles thérapeutiques

(Zhao *et al*., 2007). L'invalidation de la Parkin dans cette même lignée a permis de montrer son implication dans la mitophagie (Gegg *et al*., 2010). Ces 3 exemples parmi beaucoup d'autres confortent l'intérêt de tels modèles. Enfin, des lignées cellulaires « cybrides » (cytoplasmic hydrids) ont été créées en fusionnant des plaquettes contenant l'ADN mitochondrial de sujets parkinsoniens avec des cellules SH-SY5Y (Trimmer & Bennett, 2009). Ces cellules présentent un dysfonctionnement mitochondrial, des perturbations des voies de mort cellulaire et des inclusions type corps de Lewy.

Ces modèles cellulaires ne représentent pas toute la complexité de la maladie et l'interprétation des résultats issus de ces modèles peut être sujette à caution. C'est pourquoi, en parallèle, des modèles expérimentaux animaux sont développés permettant d'étudier le processus cellulaire dans le contexte d'un circuit fonctionnel neuronal.

8.2 Modèles animaux

Un modèle animal idéal de MP doit être caractérisé par une perte progressive des neurones dopaminergiques et un début à l'âge adulte. De plus, il doit reproduire le phénotype clinique notamment moteur qui répond à la dopathérapie (Chesselet, 2008). Différents modèles animaux (primates, rongeurs (souris et rats), poisson zèbre (Danio rerio), mouches (Drosophila melanogaster), vers (Caenorhabditis elegans), *etc*…) ont été générés par administration de substances neurotoxiques et par manipulations génétiques pour disséquer les mécanismes à l'origine de la maladie et tester de nouveaux traitements.

8.2.1 Modèles animaux toxiques

Les neurotoxiques les plus utilisés à l'heure actuelle sont la 6-hydroxydopamine, le MPTP et la roténone. Ces toxines détruisent les neurones dopaminergiques de la SN, à l'origine d'un syndrome parkinsonien chez les animaux.

8.2.1.1 6-hydroxydopamine

La 6-OHDA est l'une des premières toxines utilisées et documentées (Ungerstedt, 1968). La 6-OHDA est principalement injectée de façon unilatérale et stéréotaxique au niveau nigro-strié, car elle ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique et car des lésions bilatérales sont à l'origine d'un tableau très sévère. Elle est à l'origine d'un syndrome parkinsonien avec comportement de rotation permettant de comparer les 2 hémisphères cérébraux et ainsi de tester de nombreux traitements. La toxine peut être utilisée chez le rat, la souris, le primate voire C. elegans (Bezard *et al*., 1998 ; Bezard & Przedborski, 2011).

8.2.1.2 MPTP

Le MPTP a été produit accidentellement durant la synthèse chimique d'un opioïde et son injection intraveineuse a été responsable d'un syndrome parkinsonien (Langston *et al*., 1983). Le MPTP traverse la barrière hémato-encéphalique et est métabolisé par les astrocytes en MPP+ qui pénètre les neurones dopaminergiques grâce au transporteur de la dopamine (Javitch *et al*., 1985). Le MPP+ se concentre au niveau mitochondrial où il inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire à l'origine d'une déplétion en ATP et d'un stress oxydant responsable de la mort neuronale. Le modèle expérimental MPTP est l'un des plus utilisés dans le cadre de la MP principalement par administration systémique chez la souris et le primate. Ce modèle a permis d'apporter de nombreux éléments sur la physiopathologie et la pathogénie de la MP et sert également à tester de nombreuses molécules. Néanmoins, à ce jour, aucune molécule neuroprotectrice efficace dans les modèles MPTP n'a pu être transposée en pratique clinique chez l'homme (Cannon & Greenamyre, 2010).

8.2.1.3 Roténone

La roténone est un insecticide puissant inhibiteur du complexe I mitochondrial non seulement des neurones dopaminergiques, mais aussi au niveau systémique. Son injection intracérébrale produit des lésions non spécifiques. La roténone est désormais plutôt utilisée par administration systémique ou intra-péritonéale de façon chronique à faibles doses afin de produire une dégénérescence nigro-striée plus sélective et des inclusions cytoplasmiques d'alpha-synucléine (Betarbet *et al*., 2000). Ce modèle reste controversé, car certaines équipes ne retrouvent cet effet que chez 50% des rats traités. Néanmoins, ce modèle a l'avantage de produire une neurodégénérescence progressive correspondant plus à la MP que les modèles par administration aigüe de 6-OHDA ou MPTP. D'autres espèces animales (souris, drosophile) reproduisant ce phénotype avec la roténone ont également été proposées (Cannon & Greenamyre, 2010).

8.2.2 Modèles animaux génétiques

En raison du décryptage du génome murin et de la facilité de sa manipulation génétique, la souris est de loin le modèle animal le plus utilisé. Néanmoins, des modèles utilisant la drosophile ou C. elegans ont également été réalisés. Pour chacun des gènes majeurs associés à la MP, des modèles animaux transgéniques de surexpression des gènes humains sauvages (knock-in) ou mutés et d'invalidation (knock-down) ont été développés (Dawson *et al*., 2010).

En raison de son rôle prépondérant dans la MP, de nombreux modèles utilisant SNCA ont été créés. La surexpression de SNCA et des mutations A53T et A30P chez la drosophile entraîne une

mort sélective des neurones dopaminergiques, des inclusions corps de Lewy-like et un déficit locomoteur dopasensible (Feany & Bender, 2000). Chez C. elegans, la surexpression de SNCA entraîne uniquement une mort des neurones dopaminergiques (Lakso *et al.*, 2003). Néanmoins, ces modèles animaux n'ont pas l'organisation des vertébrés et n'expriment pas l'alpha-synucléine. Parmi tous les modèles murins, seule la souris transgénique A53T SNCA avec le promoteur murin du prion montre une agrégation de l'alpha-synucléine associée à une dégénérescence âge-dépendante (Giasson *et al.*, 2002). La surexpression de SNCA peut également utiliser des vecteurs adénoviraux et lentiviraux qui ciblent les neurones mésencéphaliques des rongeurs et primates provoquant une perte neuronale dopaminergique marquée (Ulusoy *et al.*, 2010).

La surexpression de LRRK2 chez la drosophile entraîne une perte neuronale dopaminergique et une réduction de l'activité motrice dopasensible âge-dépendante (Liu *et al.*, 2008). De la même façon, sa surexpression chez C. elegans provoque une dégénérescence neuronale dopaminergique (Saha *et al.*, 2009). L'invalidation des homologues de LRRK2 chez ces animaux et de LRRK2 chez la souris a suggéré son rôle dans le maintien des neurones dopaminergiques (Imai *et al.*, 2008 ; Lee *et al.*, 2007 ; Sakaguchi-Nakashima *et al.*, 2007). Les souris transgéniques surexprimant LRRK2 ne présentent pas de dégénérescence dopaminergique marquée, mais la souris transgénique R1441G LRRK2 montre une atteinte motrice dopasensible (Li *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2010).

De la même façon que les modèles utilisant les gènes des formes autosomiques dominants, les modèles drosophiles des formes autosomiques récessives montrent une perte neuronale dopaminergique âge-dépendante et un phénotype moteur alors que les modèles murins ne répliquent que peu de caractéristiques de la MP. Les drosophiles invalidées pour la Parkin ou PINK1 ont une espérance de vie réduite, des troubles moteurs et un déficit mitochondrial (Greene *et al.*, 2003 ; Whitworth *et al.*, 2005 ; Clark *et al.*, 2006 ; Park *et al.*, 2006 ; Yang *et al.*, 2006). Les souris invalidées pour Parkin ou PINK1 ne montrent que des anomalies mineures de la transmission dopaminergique (Von Coelln *et al.*, 2004 ; Kitada *et al.*, 2007). Les drosophiles invalidées pour DJ-1 par RNA interference présentent une perte neuronale dopaminergique (Yang *et al.*, 2005).

8.3 Limites de ces modèles

L'obstacle majeur des modèles tant cellulaires *in vitro* qu'animaux *in vivo* est qu'ils ne comportent pas toutes les caractéristiques et mécanismes associés à la MP. Les modèles animaux rendent rarement compte des caractéristiques cliniques de la maladie comme l'âge de début, le

tableau neurologique, l'atteinte neuropathologique spécifique et l'évolution progressive. Les modèles utilisant des toxines ou animaux transgéniques ne miment pas tous les déterminants pathologiques de la maladie. Une combinaison de plusieurs modèles permettrait de mieux définir la pathogénie de la maladie qui combine des facteurs environnementaux et génétiques. De plus, les études *in vitro* ont modélisé les altérations des constituants cellulaires comme le protéasome, la mitochondrie et les lysosomes, mais la relevance de ces anomalies dans le processus pathogénique reste discutée (Obeso, 2010). En raison de ces difficultés à développer un modèle étiologique qui mime les caractéristiques de la MP, l'étude des tissus et lignées cellulaires issus de sujets affectés par la maladie pourrait constituer des modèles d'étude intéressants.

B. Objectifs de la thèse

En raison des limites des modèles cellulaires et animaux, et de l'inaccessibilité du tissu cérébral du vivant du sujet (notamment pour la SN), une meilleure compréhension de la maladie pourrait passer par le développement de modèles d'études tissulaires et cellulaires issus directement des sujets malades. Parmi les tissus et cellules accessibles aisément, on peut répertorier, les fibroblastes par biopsies cutanées, la muqueuse digestive par biopsies per-coloscopiques ou fibroscopiques, les cellules épithéliales nasales par biopsies de la muqueuse olfactive et les cellules sanguines (Scherzer *et al.*, 2007 ; Hoepken *et al.*, 2008 ; Lebouvier *et al.*, 2008 ; Witt *et al.*, 2009). Parmi les cellules sanguines, les cellules mononucléées (PBMC) semblent particulièrement intéressantes en raison de leur implication dans la pathogénie de la MP. En effet, une infiltration de cellules lymphocytaires a été identifiée dans le parenchyme cérébral à proximité des neurones dopaminergiques chez les cas autopsiques de MP (Brochard *et al.*, 2009). De plus, ces cellules sanguines montrent des altérations moléculaires associées à la pathogénie de la MP avec expression de protéines dopaminergiques comme le transporteur de la dopamine et la tyrosine hydroxylase (Amenta *et al.*, 2001), altération du SUP avec diminution de l'activité du protéasome (Blandini *et al.*, 2006 ; Ullrich *et al.*, 2010) et dysfonctionnement mitochondrial (Shinde & Pasupathy, 2006). Toutes ces données nous poussent à envisager les PBMC comme un modèle d'étude potentiel de la MP.

Nous avons émis l'hypothèse que la MP était associée à une modification de l'expression des gènes avec perturbations de voies cellulaires et moléculaires identifiables au sein des PBMC. De façon parallèle à nos premières analyses, cette hypothèse a été proposée par d'autres auteurs qui ont démontré une altération du profil transcriptomique au sein des PBMC de sujets porteurs d'une maladie d'Alzheimer (Maes *et al.*, 2007). De plus, dans cette étude, les gènes dont l'expression était dérégulée appartenaient à des voies cellulaires et moléculaires associées à la pathogénie de la maladie d'Alzheimer. Nous avons appliqué cette technologie pour identifier les gènes et voies moléculaires altérés au sein des PBMC de sujets parkinsoniens. Nous avons ainsi réalisé des études transcriptomiques à partir des PBMC de plusieurs groupes de sujets parkinsoniens de forme sporadique ou porteurs de mutations délétères des gènes impliqués dans la MP en les comparant à des sujets sains non apparentés pour déceler les gènes et voies de signalisation cellulaire dérégulés. Nous nous sommes d'abord intéressés aux formes génétiquement déterminées avec mutation des gènes LRRK2 (substitution G2019S), SNCA (duplication du locus) et ATXN2 (expansion de triplets). Nos analyses ont ensuite porté sur les formes

sporadiques sans mutation identifiée. Enfin, nous nous sommes intéressés au profil d'expression génique des sujets parkinsoniens non plus en fonction de leur statut génétique, mais selon leur stade évolutif en nous intéressant en particulier aux sujets à un stade précoce de la maladie (asymptomatiques/paucisymptomatiques porteurs de mutations délétères ou patients *de novo* dès le diagnostic clinique avant tout traitement), afin d'identifier les voies moléculaires précocement dérégulées.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Populations étudiées

L'ensemble des sujets parkinsoniens et des témoins étudiés est issu des études PARADIGME (PARkinson Alzheimer DIsease Gene Metabolism and Environment), PARKFANORD (PARKinson dans les FAmilles du NORD de la France) et CONVERGENCE. Ces deux études ont été approuvées par le Comité de Protection des Personnes du CHRU de Lille. Tous les sujets inclus ont signé un consentement de participation.

1.1 PARADIGME et CONVERGENCE

L'étude PARADIGME vise à identifier des facteurs de susceptibilité génétique impliqués dans le développement de maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson et à établir des corrélations entre les phénotypes cliniques et des déterminants génétiques et environnementaux. Le recrutement des patients a débuté en 2003 et la cohorte comporte 371 sujets atteints d'une MP suivis dans le service de Neurologie et Pathologie du Mouvement du Pr Destée du CHRU de Lille. Les critères de sélection utilisés correspondent aux critères de diagnostic de l'UKPDSBRC -United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Research Center- (Gibb & Lees, 1998) –Annexe 1– et aux critères du NINDS –National Institute of Neurological Disorders and Stroke– (Gelb *et al.*, 1999) –Annexe 2–. A coté de la cohorte PARADIGME, une cohorte CONVERGENCE a été mise en place depuis 2008, permettant le recueil d'échantillons biologiques de témoins sains sans antécédent neurologique personnel ou familial.

1.2 PARKFANORD

L'étude PARKFANORD vise à recueillir depuis 1994 des données sur les patients de la région Nord-Pas de Calais qui présentent une forme familiale de MP (avec au moins un apparenté atteint). Un total de 310 familles a été collecté à ce jour. Un arbre généalogique a été réalisé pour chaque famille et des données cliniques ont été recueillies pour chaque membre de la famille atteint. Chaque famille est dénommée par son numéro d'identification (PXX) et chaque individu est nommé par P(n° de la famille)/(n° de l'individu ; 01 pour le probant).

2. Extraction d'ADN

Pour chaque individu, les échantillons sanguins sont collectés dans des tubes BD VACUTAINER® EDTA. Les tubes sont centrifugés à 1750g pendant 20 min à température ambiante. La couche leucocytaire (Buffy Coat en anglais) est récupérée et est stockée à -20°C.

L'extraction d'ADN est réalisée par le kit DNA extraction (Stratagene) selon le protocole du fournisseur en plusieurs étapes : lyse des globules rouges, lyse des membranes leucocytaires, digestion des protéines par protéinase, digestion des ARN par RNase I, précipitation de l'ADN par l'éthanol absolu et récupération des filaments d'ADN qui seront repris en solution. La concentration en ADN est mesurée par l'absorbance à 260nm sur Nanodrop ND-1000 et la qualité est déterminée par les rapports 260nm/280nm et 260nm/230nm.

3. Recherche de mutations

3.1 Génotypage de la mutation G2019S de LRRK2

L'ADN est amplifié par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) contenant la Taq polymérase, les amorces de PCR et le tampon (GibcoBRL^{TM}). Les conditions d'amplification sur thermocycleur Eppendorf sont :

Dénaturation	95 °C	10 min	
Elongation	95 °C 60 °C 72 °C	1 min 30 s 30 s	X 4 cycles
	95 °C 60 °C 72 °C	1 min 30 s 30 s	X 20 cycles, -0,5 °C/ cycle
	95 °C 50 °C 72 °C	1 min 30 sec 30 sec	X 11 cycles
	72 °C	10 min	
Terminaison	4 °C	10 min	

La qualité de l'amplification est vérifiée sur gel d'agarose à 3%, permettant la visualisation de l'amplicon (322 paires de bases). L'addition de l'enzyme de restriction *Bfm* I (Fermentas) crée un site de restriction. La présence de la mutation G2019S de l'exon 41 de LRRK2 crée un nouveau site de restriction pour l'enzyme de restriction *Bfm* I et donc la présence d'un fragment supplémentaire de 209 paires de base (Figure 12).

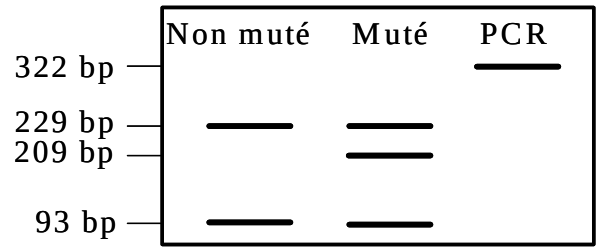


Figure 12 : Lecture des gels d'agarose identifiant la mutation G2019S de LRRK2 par PCR.

3.2 Dosage génique du gène SNCA

Le dosage génique de SNCA a été déterminé par PCR semi-quantitative en temps réel sur 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Les exons 1 et 7 de SNCA ont été amplifiés par PCR de même que le gène RPS18 (ribosomal protein S18) servant de référence interne. L'étape de PCR permet de suivre en temps réel l'amplification d'un fragment d'ADNc cible grâce au fluorophore SYBR® Green (Applied Biosystems). Cet intercalant de l'ADN devient fluorescent lorsqu'il est lié à l'ADN double brin. La quantité de fluorescence est mesurée à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle de PCR. Cette mesure permet de détecter à quel cycle (Ct pour cycle threshold), la fluorescence dépasse le seuil déterminé par l'utilisateur, sur la courbe d'amplification. Cette technique permet de calculer le dosage normalisé relatif du gène cible. La normalisation se fait par rapport à un gène de référence. La méthode de calcul est dérivée de la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pour tenir compte du fait que l'efficacité de la PCR n'est pas de 100%. Le dosage génique normalisé est donc le rapport : (1/Ct du gène cible) / (1/ Ct du gène référent) (Schmittgen & Livak, 2008). Les mesures des échantillons sont réalisées en double exemplaire. Les amorces utilisées sont représentées Tableau 3.

3.3 Recherche de l'expansion de triplets SCA2

La recherche de l'expansion de triplets SCA2 a été réalisée en collaboration avec le Pr Sablonnière du CHRU de Lille. Le gène ATXN2 a été amplifié par PCR puis l'amplicon a été séquencé sur appareil 3130XL Genetic Analyser (Applied Biosystems). Les amorces utilisées sont représentées Tableau 3. En raison de la plus grande difficulté à séquencer un gène avec une longue expansion de triplets, la séquence de l'allèle normal a été déterminée et a permis ainsi par soustraction d'identifier celle de l'allèle muté.

4. Puces CGH (comparative genomic hybridization)

La procédure a été réalisée par la plateforme de génomique fonctionnelle et structurale dirigée par le Dr Figeac (IFR114, IMPRT, IRCL). L'ADN génomique est marqué par la cyanine3 (Cy3) et la cyanine5 (Cy5) -dCTP, selon les recommandations du fournisseur (Agilent Technologies). L'ADN est ensuite hybridé sur les puces CGH 244k à haute densité pendant 40 heures dans un four à 65°C. Les puces sont scannées avec le scanner de puce d'Agilent (Micro-Array Scanner System) et analysées par le logiciel CGH analytics software. L'intensité des signaux fluorescents est corrigée par rapport au bruit de fond et seuls les signaux présentant un taux supérieur de 1,7 fois le bruit de fond ont été sélectionnés. La normalisation des données est effectuée par rapport à la médiane des ratios Cy5/Cy3 des signaux de toutes les puces. Les données sont représentées

dans une échelle Log2 et les ratios normaux sont établis arbitrairement entre -0,3 et 0,3. La détection d'un ratio anormal de 3 ou plus pour plusieurs sondes consécutives indique une duplication de la région chromosomique concernée.

5. Extraction d'ARN

Les échantillons sanguins, prélevés dans des tubes CPT® (BD Vacutainer), sont centrifugés pendant 20 minutes à 1750g à température ambiante. L'anneau leucocytaire obtenu est recueilli avec une pipette. Après lavages, des aliquots contenant $0,5\times10^7$ cellules sont réalisés en ajoutant dans chaque tube 700µL de tampon de lyse du kit d'extraction des ARN (kit RNeasy mini de QIAGEN©) contenant 1% de β-mercaptoéthanol.

L'extraction de l'ARN est réalisée grâce au même kit et celui de la RNase-free DNase de QIAGEN©. Les cellules sont lysées mécaniquement. Un volume d'éthanol 70% est incorporé à chaque échantillon. Le mélange ainsi obtenu est déposé sur une colonne contenant une membrane en silice qui va retenir les acides nucléiques. Après un lavage, un traitement à la DNase est appliqué pour éliminer toute trace d'ADN résiduel. Trois autres lavages permettent d'éliminer la DNase, l'ADN et les traces d'éthanol. L'ARN est récupéré dans un volume de 30µL d'eau RNase-free par une centrifugation d'une minute à 10000g. L'échantillon d'ARN total est conservé à -80°C.

Le dosage des ARN est effectué grâce au spectrophotomètre Nano-Drop© ND-1000 par mesure de l'absorbance à 260nm à partir d'1µL d'échantillon. Le calcul des rapports d'absorbance 260 nm/280 nm et 260 nm/230 nm permet d'évaluer la pureté de l'ARN.

L'analyse de la qualité de l'ARN est réalisée grâce au Bioanalyzer RNA 6000 nano d'Agilent©. Les données utilisées pour vérifier la qualité des ARN sont : le rapport des fractions d'ARN ribosomal 28S/18S et le RIN pour RNA Integrity Number, algorithme développé par Agilent© permettant d'évaluer la dégradation de l'ARN sur une échelle allant de 1 à 10.

6. Puces d'expression pangénomique

6.1 Plateforme Agilent

La procédure a été réalisée par la plateforme de génomique fonctionnelle et structurale dirigée par le Dr Figeac (IFR114, IMPRT, IRCL). Le procédé utilise un simple marquage sur des puces Whole Human Genome 44k d'Agilent® couvrant le génome humain et a été effectué selon les recommandations du fournisseur. Chaque puce comporte 41000 sondes oligonucléotidiques 60-mères représentant autant de gènes et de transcrits. Pour chaque puce, l'amplification et le

marquage par la Cy3 de l'ARN complémentaire ont été réalisés à partir de 300 ng d'ARN. Des contrôles positifs internes (RNA Spike-In mixtures, Agilent®) ont été soumis aux mêmes étapes d'amplification et de marquage. L'ARN complémentaire marqué a été purifié et 1650 ng de chaque échantillon ont été fragmentés et hybridés sur les puces pendant 17 heures à 65°C. Après lavage, les puces ont été scannées et les données extraites par le logiciel d'Agilent® (Feature Extraction Software©).

6.2 Plateforme Illumina

De façon à valider les données de puces d'expression Agilent, nous avons utilisé une autre plateforme Illumina avec les puces Human HT-12 v4 Expression BeadChip contenant plus de 47000 sondes provenant de la banque de données RefSeq (Plateforme de transcriptomique et génomique appliquée, Institut Pasteur de Lille, IFR 142, Dr Hot). Les sondes s'hydrident à la fois à des ARN codants et non codants. Pour chaque individu, 500 ng d'ARN a été amplifié, marqué à la biotine et rétro-transcrit. L'ARNc fragmenté a été hybridé sur les puces pendant 16h à 58°C. Les puces comportent un réseau de billes sur lesquelles sont attachées des amorces spécifiques. Après lavage, les puces ont été scannées et les données extraites par le logiciel iScan reader (Illumina).

6.3 Analyse des données par le logiciel Genespring

L'analyse des données a été réalisée par le logiciel GeneSpring GX 7.3.1 Software d'Agilent® puis la version GX 11.0. Une normalisation par puce (à la médiane) et par sonde (à la médiane des témoins ou au 75^{éme} percentile) a été appliquée. Le t-test de Welch (test paramétrique permettant de comparer deux échantillons avec des variances inégales) avec ou sans correction de Benjamini & Hochberg pour tests multiples a été effectué pour identifier les gènes différentiellement significativement exprimés (p<0,05) entre les différentes formes étudiées et les témoins. La liste des gènes dérégulés a été soumise à une analyse en composante principale (ACP) qui permet de réduire la complexité des données en identifiant des composantes qui représentent au mieux la variabilité. Cette approche sans *a priori* permet de voir si les gènes significativement dérégulés sont capables de séparer les individus selon leur statut génétique par exemple. Par ailleurs, les gènes ont été classés selon leur fonction biologique et métabolique ou ontologie par l'outil Gene Ontology (www.geneontology.org).

6.4 Analyse des données par le logiciel Ingenuity Pathway Analysis

Les gènes significativement dérégulés ont été soumis au logiciel Ingenuity® Pathway Analysis (IPA, Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com) qui permet d'identifier les voies canoniques dérégulées et de générer des réseaux entre ces gènes. Pour réaliser cette analyse, un ensemble de données comportant l'identifiant (numéro de sonde ou d'accession RefSeq) et la valeur d'expression correspondante est téléchargée dans l'application. Chaque identifiant reconnu est associé à son gène correspondant dans la base de données d'IPA (Ingenuity Pathways Knowledge Base). Sur la base de ces données, l'analyse des voies canoniques identifie les voies significativement présentes dans la liste des sondes téléchargées. Un test exact de Fisher calcule la valeur de *p* pour que la probabilité de l'association entre les gènes de la liste et ceux de la voie canonique soit expliquée par la chance. Les voies canoniques sont des voies de signalisation créées par IPA à partir de sa base de données représentant les voies classiques des processus cellulaires et métaboliques. Pour générer les réseaux moléculaires, les gènes sont intégrés dans la base de données du site qui calcule de façon arithmétique la connectivité entre eux.

7. RT-PCR en temps réel

La rétro-transcription de l'ARN en ADNc est réalisée grâce au kit QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen) à partir de 250 ng d'ARN conformément au protocole du fabricant. L'ADN résiduel est éliminé par un traitement à la DNase. Puis a lieu la réaction de rétro-transcription permettant la synthèse d'ADNc à partir de l'ARN total. L'étape de PCR permet de suivre en temps réel l'amplification d'un fragment d'ADNc cible grâce au fluorophore SYBR® Green (Applied Biosystems). La quantité de fluorescence est mesurée à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle de PCR. Cette mesure permet de détecter à quel cycle (Ct pour cycle threshold) la fluorescence dépasse le seuil déterminé par l'utilisateur, sur la courbe d'amplification. Cette technique permet de calculer l'expression normalisée relative du gène cible. La normalisation se fait par rapport à un gène de référence (RPS18, GAPDH ou β-Actine). La méthode de calcul est dérivée de la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pour tenir compte du fait que l'efficacité n'est pas de 100%. L'expression normalisée est donc le rapport : (1/Ct du gène cible) / (1/ Ct du gène référent) (Schmittgen & Livak, 2008). Les mesures des échantillons sont réalisées en double exemplaire. La PCR en temps réel est réalisée sur un appareil 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems). L'analyse statistique des rapports d'expression entre les individus malades et les témoins est réalisée pour chaque gène par un test de Mann et Whitney (seuil de significativité $p<0,05$). Toutes les amorces utilisées sont représentées Tableau 3 et ont été conçues par le logiciel Oligo Primer Analysis 5.0 (National Biosciences).

Tableau 3 : Amorces utilisées pour les réactions de génotypage, de séquençage, de dosage génique et de mesure d'expression.

Usage		Séquence 5'-3'
Génotypage G2019S LRRK2		TTTTGATGCTTGACATAGTGGAC
		CACATCTGAGGTCAGTGGTTATC
Dosage génique SNCA	Exon 1	CCTTCAAGCCTTCTGCCTTTC
		CGAATGGCCACTCCCAGTT
	Exon 7	TCTTTGCTCCCAGTTTCTTGAGA
		TGGAACTGAGCACTTGTACAGGAT
Séquençage points de jonction duplication de SNCA	1	TCAGAAGAGGCATATTACAT
	2	GTGACAACATTCTAAAAGGG
	3	TTCCTTATGATTCCACTTAG
	4	GCACAGACAAACAAAAAGAC
	5	AAGACCATCGAGACTAGGAA
	6	ACACCTCTACGCAAATAAAC
	7	CCAAGTCAATCCTAAGCC
	8	AATCATGCTGCTATAAAGAC
	9	AAAAGTGGGTGAAGGATATG
	10	CCCTTTTAGAATGTTGTCAC
	11	CAAAACAGAGAAAACAGAAG
	12	ATGTGGGTCTGTAGCAAC
Expansion de triplets SCA2		GGGCCCCTCACCATGTCG
		CCAATGTCCGCAAGCCCG
Expression ALAS2		CTGCCAGGGTGCGAGATTTA
		GTGGTCAGGGTCATTGTGCC
Expression ARG1		ACCCATCTTTCACACCAGC
		TCCTGAGAGTAGCCCTGTTT
Expression DUSP10		GGCTTTTGAGTTCATTGAGG
		GTCATCCGAGTGTGCTTCAT
Expression ERAF		AATCAGCAGGTCTTCAATG
		GCTGCCTGTAATAGTTGATG
Expression IFNG		GGAAAGAGGAGAGTGACAGA
		ATGTCTTCCTTGATGGTCTC
Expression LTF		GCTACTCTGGTGCCTTCAA
		AGGTCCTCAAACACTGTGC
Expression SELENBP1		AAGAACGAGGGAGGTACATG
		AGAGCAGGATGTCGGTGAT
Expression UGT2B17		CACAAAAGGTTCTATGGAG
		AAGGTCATTCTGGGGTA
Expression SNCA		ATGTAGGCTCCAAAACCAAG
		TACCCTTCCTCAGAAGGCA
Expression RPS18		CCTGGATACCGCAGCTAGGA
		GCGGCGCAATACGAATGCCCC
Expression ACTB		CACGGCATCGTCACCAACT
		AGCCACACGCAGCTCATTG
Expression GAPDH		TACATGTTCCAATATGATTCCACC
		ACCTTCTTGATGTCATCATATTTG
Isoformes SNCA	SNCA 140	CCAAAACCAAGGAGGGAGTG
		TCCTTCTTCATTCTTGCCCA
	SNCA 126	ATGTAGTGGCTGAGAAGACC
		TCTTCATTCTTGCCCAAC
	SNCA 112	CCAAAACCAAGGAGGGAGTG
		ATACCCTTCCTTGCCCAACT
	SNCA 98	CTCTATGTAGTGGCTGAGAA
		ATACCCTTCCTTGCCCTTA

III. RÉSULTATS

1. Etude de la MP associée à la mutation G2019S de LRRK2

1.1 Epidémiologie et tableau clinique

La recherche de la mutation G2019S de LRRK2 a été réalisée par génotypage au sein d'une cohorte de 465 patients parkinsoniens. Elle a été identifiée chez 3 sujets de forme sporadique (3/307 soit 0,98%) et 4 sujets probants d'une forme familiale (4/158 soit 2,53%). Un de ces sujets appartient à une grande famille présentant une MP de transmission autosomique dominante, ce qui nous a permis d'obtenir des informations cliniques et des échantillons sanguins pour 2 autres malades (dont une femme à un stade *de novo* non traitée) et un sujet porteur de la mutation asymptomatique.

Les 9 sujets parkinsoniens (3 hommes, 6 femmes) porteurs de la mutation G2019S de LRRK2 présentent le phénotype clinique d'une MP dopasensible avec un âge de début moyen de 54,9 ± 13 ans ; le sujet asymptomatique est un homme âgé de 23 ans au moment du prélèvement.

1.2 Etude transcriptomique

Nous avons émis l'hypothèse que la mutation G2019S de LRRK2 pouvait être à l'origine d'une modification de l'expression des gènes qui affecterait l'ensemble des cellules de l'organisme. En raison de l'implication des cellules mononucléées périphériques dans la pathogénie de la MP et de leur facilité d'accès, nous avons utilisé une approche transcriptomique pour comparer le profil d'expression génique des PBMC entre porteurs de cette mutation et sujets sains témoins.

1.2.1 Sujets étudiés

Nous avons extrait l'ARN total des PBMC pour chacun des prélèvements sanguins des 10 sujets porteurs de la mutation G2019S de LRRK2. Nous avons recruté 40 sujets témoins sans antécédent neurologique personnel ou familial (20 hommes, 20 femmes, âge moyen 53 ± 19 ans). Les échantillons d'ARN de ces sujets ont permis de réaliser un assemblage équimolaire d'ARN (Pool40) afin de limiter la variabilité du groupe témoin et d'évaluer la reproductibilité des puces d'expression et des résultats de RT-PCR en temps réel. En plus de ce pool, 7 échantillons de témoins individuels (2 hommes, 5 femmes, âgés de 56-83 ans) ont servi de groupe contrôle.

1.2.2 Procédure de puce d'expression Agilent

La procédure a utilisé la plateforme Agilent et les puces d'expression Whole Human Genome Oligo Microarray 44K. Un niveau d'expression génique a été obtenu pour chaque sonde de chaque puce (10 porteurs de la mutation *versus* 9 témoins dont le Pool40 en dupliqué). Néanmoins, les contrôles de qualité ont montré que l'un des porteurs de la mutation présentait un profil d'expression aberrant et avait le RIN (RNA integrity number) le plus faible (8,6). Nous l'avons donc exclu des analyses.

Le logiciel Genespring a permis d'identifier 1241 sondes significativement dérégulées entre ces 2 groupes (*t*-test de Welch, $p<0,05$) et 132 sondes significativement dérégulées (avec un rapport d'expression >2 ; *t*-test de Welch, $p<0,05$).

1.2.3 Analyse en composante principale

Une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée sur ces listes de sondes dérégulées. L'ACP réduit la complexité de l'ensemble des données en recherchant les composantes qui sont à l'origine de la plus grande part de la variabilité dans les données. Une explication de plus de 80% de la variance par 3 composantes principales est considérée comme significative. Cette approche permet de voir si le niveau d'expression de ces gènes peut séparer les individus selon leur génotype (porteur ou non de la mutation G2019S de LRRK2). Cette analyse est réalisée sans *a priori*, c'est-à-dire sans tenir compte au préalable du statut génétique des sujets.

L'ACP réalisée sur la liste des 132 sondes permet de clairement séparer les individus selon leur génotype (Figure 13). Les 3 composantes, représentées par les axes X, Y et Z, expliquent plus de 80% de la variance de la liste de gènes et séparent les porteurs de mutation des témoins. Le sujet asymptomatique (P1) porteur de la mutation est classé avec les parkinsoniens. De plus, si cette analyse est réalisée sur une nouvelle liste incluant le sujet P1 dans le groupe contrôle, il reste classé parmi les malades. Par ailleurs, il n'est pas observé de séparation des individus selon leur classe d'âge ou leur sexe, indiquant que la mutation G2019S de LRRK2 est à l'origine d'un profil d'expression génique particulier identifiable dans les PBMC permettant de séparer sans *a priori* les individus selon leur génotype.

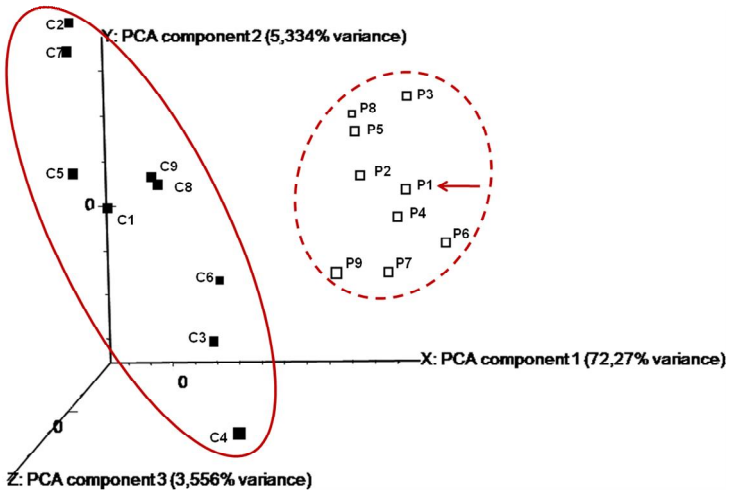


Figure 13 : Représentation en 3D de l'analyse en composante principale appliquée sur la liste des 132 gènes dérégulés entre porteurs de la mutation G2019S de LRRK2 et témoins.
C pour les témoins (carrés noirs) et P pour les porteurs de mutation (carrés blancs). C8 et C9 correspondent au Pool40 en dupliqué ; P1 correspond au sujet asymptomatique (flèche).

1.2.4 Fonctions cellulaires dérégulées

Parmi les 1241 sondes dérégulées dans les PBMC, 827 (67%) sont annotées par l'outil Gene Ontology. Parmi les fonctions des gènes dérégulés, sont retrouvées des fonctions impliquées dans la pathogénie de la MP comme le système ubiquitine-protéasome, la mitochondrie, l'apoptose et la réponse immunitaire. Par ailleurs, de nombreux gènes impliqués dans la machinerie cellulaire sont dérégulés comme la transduction des signaux, la signalisation cellulaire, la transcription et la traduction. De même, des fonctions rattachées à la pathogénie de LRRK2 sont retrouvées comme l'activité kinase, le cytosquelette d'actine, l'endocytose et le transport vésiculaire, la fonction axonale et synaptique (Tableau 4).

Tableau 4 : Principales fonctions classées par Gene Ontology perturbées dans les PBMC des porteurs de la mutation G2019S de LRRK2.

FONCTIONS	Nombre de gènes	FONCTIONS	Nombre de gènes
Liaison et transport	125	Membrane	38
Transcription et traduction	98	Signalisation cellulaire (dont MAPK)	35
Ubiquitination and protéolyse	57	Apoptose	29
Réponse immunitaire	57	Cycle cellulaire et différentiation	28
Transduction du signal	56	Métabolisme lipidique et transport	24
Activité transférase (dont kinase)	47	Adhésion cellulaire	20
Cytosquelette d'actine	45	Mitochondrie	20
Système nerveux central (axone, synapse)	39	Endocytose et transport vésiculaire	14
Métabolisme ADN et ARN	39	Autres processus métaboliques	56

1.2.5 Voies cellulaires canoniques dérégulées

Afin d'identifier les voies cellulaires impliquées, les 1241 sondes dérégulées ont été analysées en utilisant le logiciel IPA et 980 sondes ont été reconnues par la base bibliographique d'IPA (IPA Knowledge Base). Notre analyse des voies canoniques a identifié 11 voies significativement dérégulées (Tableau 5) et comprenant notamment les voies de signalisation du guidage axonal, de l'extravasation leucocytaire et de la MP. La voie canonique de la MP représente les gènes impliqués dans la MP ainsi que des gènes associés aux voies de mort cellulaire (voies de l'ubiquitination, JNK et p38 MAPK à l'origine d'une activation des caspases et du cytochrome C). Parmi les gènes retrouvés dans ces 11 voies cellulaires dérégulées, sont retrouvés des kinases (comme JNK=MAPK8, p38 MAPK=MAPK14 et MAPK12), des gènes du cytosquelette d'actine (comme la moesin MSN) et de la famille des éphrines (ephrin-A2, ephrin receptor 3) (Tableau 24 en Annexe 4).

Tableau 5 : Voies canoniques significativement dérégulées identifiées par le logiciel IPA dans les PBMC des sujets porteurs de la mutation G2019S de LRRK2.

VOIES CANONIQUES	***p***
Signalisation guidage axonal	0,005
Signalisation TGF-β	0,006
Signalisation IL-10	0,007
Extravasation leucocytaire	0,009
Maladie de Parkinson	0,017
Signalisation IL-4	0,018
Signalisation Neuregulin	0,026
Signalisation récepteur Toll-like	0,032
Signalisation IL-6	0,032
Signalisation calcique	0,036

1.2.6 Confirmation de la validité des puces d'expression en RT-PCR

Afin de valider par une seconde technique les données des puces d'expression, nous avons confirmé par RT-PCR en temps réel les variations d'expression de 8 gènes significativement dérégulés (ALAS2, ARG1, DUSP10, ERAF, IFNG, LTF, SELENBP1 et UGT2B17). Ces 8 gènes ont également été choisis en raison de leur potentielle implication dans la MP. ALAS2 (Aminolevulinate delta-synthase 2) est une enzyme mitochondriale impliquée dans le métabolisme du fer qui catalyse la première étape de la synthèse de l'hème. ERAF (Erythroid associated factor) est aussi impliqué dans le métabolisme du fer. Des taux altérés de LTF (Lactotranferrin) ont été mesurés dans les neurones mésencéphaliques de sujets parkinsoniens (Leveugle *et al.*, 1996). ARG1 (Arginase 1) catalyse le métabolisme de la L-arginine qui est un substrat de la NO synthétase, impliquée dans la production d'oxyde nitrique et d'espèces

réactives de l'oxygène. DUSP10 (Dusp specificity phosphatase 10) inactive des kinases telles p38 MAPK et JNK (Theodosiou *et al.*, 1999). IFNG (Interferon gamma) joue un rôle dans la réponse immunitaire et participe à la mort des neurones dopaminergiques en régulant l'activité microgliale (Mount *et al.*, 2007). SELENBP1 (Selenium binding protein 1) se lie au sélénium, substance anti-oxydante qui protège les neurones de la toxicité de la dopamine (Imam *et al.*, 1999). UGT2B17 (UDP glucuronyl transferase 2 family, polypeptide B17) est impliqué dans la détoxification des xénobiotiques par le cytochrome P450.

Le ratio d'expression entre les porteurs de la mutation et les témoins mesuré en RT-PCR en temps réel de ces 8 gènes varie dans le même sens que sur les données de puce d'expression avec une forte corrélation (r^2=0,73) entre ces 2 techniques indiquant leur validité (Tableau 6).

Tableau 6 : Mesure des ratios d'expression (RE) avec résultats des tests statistiques (Mann & Whitney) entre les 9 porteurs de la mutation G2019S de LRRK2 et les 8 témoins pour les expériences de puces d'expression et de RT-PCR.

GENE	**Puce**		**RT-PCR**	
	RE	***p***	**RE**	***p***
ALAS2	0.03	4.10^{-5}	0.08	0.0006
ARG1	0.01	0.0007	0.17	0.003
DUSP10	2.09	0.002	1.97	0.05
ERAF	0.05	4.10^{-5}	0.04	8.10^{-5}
IFNG	2.18	0.01	1.72	0.04
LTF	0.03	0.004	0.05	0.008
SELENBP1	0.05	4.10^{-5}	0.04	0.0006
UGT2B17	0.45	0.0008	0.33	0.02

1.2.7 Comparaison avec les données transcriptomiques de la littérature

Nous avons comparé nos résultats de transcriptomique issus de PBMC de sujets porteurs de la mutation G2019S de LRRK2 avec les données de la littérature. Nous avons relevé 3 études de transcriptome réalisées à partir de la substance noire de patients parkinsoniens comparés avec des témoins (Grünblatt *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2005 ; Miller *et al.*, 2006). Ces études ont identifié des perturbations des voies et fonctions classiquement impliquées dans la pathogénie de la MP et retrouvées également dans les PBMC (Tableau 7). De plus, nous avons observé dans les PBMC une altération de l'expression des gènes de l'apoptose (tels CASP6, APAF1, MAPK8 et BCL2) alors que les 3 études réalisées sur le cerveau n'ont pas mis en évidence cette voie. Les modifications tissulaires *post-mortem* sont vraisemblablement à l'origine de cette absence de dérégulation ; des phénomènes d'apoptose pouvant survenir à la fois chez les malades et les témoins. L'apoptose est néanmoins une des voies de la mort cellulaire des neurones

dopaminergiques (Anglade *et al*., 1997) et la toxicité cellulaire de LRRK2 implique APAF1 et les caspases (Iaccarino *et al*., 2007 ; Ho *et al*., 2009).

Tableau 7 : Principales voies dérégulées issues des études d'expression génique réalisées à partir de la substance noire de sujets parkinsoniens.

Auteur	Mécanismes cellulaires impliqués
Grünblatt *et al*., 2004	Protéolyse Métabolisme/transmission dopaminergique Voies énergétiques Transduction du signal Adhésion cellulaire/cytosquelette Transport Cycle cellulaire Inflammation Transcription Modification protéiques/phosphorylation
Zhang *et al*., 2005	Chaîne respiratoire mitochondriale Système ubiquitine-protéasome Signalisation cellulaire
Miller *et al*., 2006	Transmission dopaminergique Cytosquelette Adhésion cellulaire

Seuls 8 gènes significativement dérégulés sont communs entre nos résultats et les 3 études transcriptomiques cérébrales ; avec un dérèglement dans le même sens pour 7 d'entre eux dans les 2 compartiments biologiques (Tableau 8). L'analyse des listes de gènes par les logiciels de bioinformatique comme IPA, permettant d'identifier des voies moléculaires et des fonctions dérégulées, apparaît donc comme un moyen intéressant pour mettre en valeur des événements moléculaires associés à la MP plutôt que s'intéresser aux seuls gènes. Cette approche peut refléter les relations complexes entre les produits des gènes survenant dans un contexte cellulaire ou tissulaire. Par ailleurs, l'expression des gènes est tissu-dépendante et il est difficile de parfaitement coupler les résultats entre les différents compartiments.

Tableau 8 : Gènes communs des études transcriptomiques entre PBMC et substance noire avec variation des ratios d'expression.

Symbole	Nom du gène	Sonde Agilent	RE PBMC	RE Cerveau
CSNK1G2	casein kinase 1, gamma 2	A_24_P99963	↗	↗
CTBP1	C-terminal binding protein 1	A_23_P41286	↗	↘
FMR1	fragile X mental retardation 1	A_24_P93967	↘	↘
MMP23B	matrix metallopeptidase 23B	A_23_P74088	↗	↗
SET	SET translocation (myeloid leukemia-associated)	A_23_P217015	↘	↘
SLC7A8	solute carrier family 7, member 8	A_23_P205489	↘	↘
STAT6	signal transducer and activator of transcription 6	A_23_P47879	↗	↗
TF	transferrin	A _23_P212500	↗	↗

RE pour ratio d'expression entre malades et témoins ; ↗ pour augmenté ; ↘ pour diminué.

1.3 Discussion

Nous avons identifié la mutation G2019S de LRRK2 chez environ 1% des sujets de forme sporadique et 2,5% des formes familiales de nos cohortes. Ces valeurs sont proches de celles retrouvées dans la littérature en population caucasienne (Healy *et al.*, 2008). En raison de sa présence aussi bien dans les formes familiales que sporadiques, cette mutation est retrouvée chez de nombreux individus et notamment chez des sujets à un stade pré-symptomatique de la maladie comme c'est le cas pour un des sujets de l'étude.

L'étude du transcriptome des PBMC de sujets porteurs de cette mutation a permis d'identifier des gènes dérégulés indiquant que la présence de la mutation LRRK2 est à l'origine d'un profil d'expression particulier. Cette liste de gènes est par ailleurs capable de séparer les individus selon leur génotype en ACP. Chose intéressante, le sujet pré-symptomatique se retrouve classé parmi les malades indiquant la présence de façon précoce d'une dérégulation de l'expression des gènes induite par la mutation. Cette approche a l'intérêt d'identifier des dérèglements moléculaires chez les patients de leur vivant et ainsi d'approcher les mécanismes sous-jacents des premières étapes de la maladie. Par ailleurs, l'identification d'un profil d'expression génique associé à la MP dans les PBMC pourrait servir à désigner ces gènes comme des marqueurs biologiques de la maladie. Une autre équipe a utilisé une technique similaire pour proposer un ensemble de gènes capables de séparer les parkinsoniens de contrôles sains et de contrôles présentant une autre pathologie neurodégénérative (Scherzer *et al.*, 2007). Néanmoins, même si ces auteurs indiquent que leurs sujets sont à un stade précoce de la MP (score de Hoehn & Yahr moyen 2,3), la neurodégénérescence est déjà à un stade avancé. En revanche, l'étude du transcriptome des PBMC de sujets à un stade asymptomatique comme le sont les porteurs de mutations pathogènes (telles des gènes SNCA, LRRK2, Parkin, DJ-1, PINK1, *etc*...) pourrait apporter de nouvelles informations sur les mécanismes très précoces de la maladie.

Nous avons mis en évidence dans les PBMC des porteurs de la mutation G2019S de LRRK2 des gènes appartenant à des systèmes impliqués dans la MP comme le SUP, la mitochondrie, la réponse immunitaire ou l'apoptose. L'expression des gènes codant pour les grandes fonctions cellulaires est également dérégulée (cycle cellulaire, adhésion cellulaire, transduction des signaux, signalisation cellulaire, fonction membranaire, cytosquelette, métabolisme lipidique, transcription et traduction). Toutes ces perturbations sont également retrouvées dans les études transcriptomiques issues de la substance noire de parkinsoniens (Grünblatt *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2005 ; Miller *et al.*, 2006) confirmant que les PBMC reflètent des événements moléculaires associés à la maladie et indiquant l'intérêt de l'étude du transcriptome des PBMC comme nouvelle approche de la pathogénie de la MP.

Par ailleurs, nous avons identifié des voies et fonctions associées à la pathogénie de LRRK2 comme des gènes de la signalisation MAPK. La mutation G2019S est en effet située dans le domaine MAPKKK et est associée à un gain de fonction toxique (West *et al*., 2005). La protéine LRRK2 appartient à la famille tyrosine kinase MLK (mixed-lineage kinase) qui régule les MAPK8 (JNK) et MAPK14 (p38 MAPK) qui sont dérégulées dans les PBMC et dont les formes actives sont retrouvées dans les cerveaux humains parkinsoniens ou de modèles MPTP (Ferrer *et al*., 2001 ; Gallo & Johnson, 2002). Ces données corroborent avec les perturbations de l'activité de la signalisation MAPK observées dans les leucocytes de sujets porteurs de cette même mutation (White *et al*., 2007). Parmi les gènes dérégulés dans les PBMC, se trouve le gène de la moesin qui est le premier substrat identifié de LRRK2 et qui permet d'ancrer l'actine à la membrane plasmatique (Jaleel *et al*., 2007). Des gènes impliqués dans le cytosquelette d'actine, l'endocytose, le transport vésiculaire, le métabolisme lipidique sont également dérégulés dans les PBMC et ces fonctions sont associées à la protéine LRRK2 qui est localisée à des structures vésiculaires, aux microtubules et la mitochondrie (Biskup *et al*., 2006 ; Plowey *et al*., 2008). LRRK2 est également connectée au guidage axonal et la mutation G2019S est à l'origine d'une réduction de la taille des neurites dans des cultures neuronales primaires (MacLeod *et al*., 2006). Les gènes de la voie du guidage axonal (comme des ephrins EPH et SLIT) sont également associés à la MP (Lesnick *et al*., 2007 ; Srinivasan *et al*., 2009). Nous avons aussi observé une perturbation de l'expression de EFNA2 (ephrin-A2), EPH receptor 3 et SLIT 3 dans les PBMC des sujets LRRK2. Il est intéressant de noter que ces voies sont également dérégulées dans l'étude transcriptomique réalisée dans la lignée SH-SY5Y invalidée pour LRRK2 (Häbig *et al*., 2008) confirmant le rôle central de LRRK2 dans ces voies (Tableau 9).

Tableau 9 : Voies canoniques obtenues par le logiciel IPA dans la lignée SH-SY5Y avec invalidation de LRRK2 (Häbig *et al*., 2008).
Les voies canoniques communes avec l'analyse des PBMC sont indiquées en gras.

VOIES CANONIQUES	*p*
Signalisation guidage axonal	0,004
Signalisation intégrines	0,013
Signalisation chémokines	0,015
Signalisation cytosquelette d'actine	0,015
Signalisation TGF-β	0,019
Signalisation SAPK/JNK	0,027
Signalisation récepteur ephrin	0,033
Signalisation calcique	0,034
Stress oxydant médié par NRF2	0,036
Extravasation leucocytaire	0,047

Enfin, nos données mettent en évidence une perturbation de la signalisation des interleukines et TGF-β et l'implication de l'extravasation leucocytaire dans la MP. Ces résultats confortent l'hypothèse que la MP est aussi une maladie associant processus neuro-inflammatoire et infiltration par le système immunitaire périphérique (Monahan *et al.*, 2008). Une infiltration de lymphocytes T CD4+ et CD8+ a été identifiée dans les cerveaux parkinsoniens humains et MPTP. Les cellules CD4+ CD25+ semblent contribuer à la neurodégénérescence (Brochard *et al.*, 2009). Ces cellules T régulatrices modulent l'inflammation de la microglie par la médiation des interleukines et du TGF-β (Reynolds *et al.*, 2007). Par ailleurs, une étude d'association génique GWAS a rapportée la voie du récepteur lymphocyte T comme facteur de susceptibilité à la MP (Srinivasan *et al.*, 2009). Tous ces résultats tendent à confirmer l'implication de ces cellules dans la pathogénie de la MP.

En conclusion, l'analyse du profil d'expression génique des PBMC de porteurs d'une mutation LRRK2 a permis d'identifier des voies et fonctions moléculaires associées à la MP et à LRRK2 et permet d'apporter de nouvelles pistes dans la compréhension de la maladie.

2. Etude de la duplication de SNCA : corrélation génotype-phénotype

Au sein de la cohorte PARKFANORD, la famille P59 présente une MP de forme autosomique dominante associée à une duplication du locus de SNCA (Chartier-Harlin *et al*., 2004). Ce type d'évènement est rare car il n'a pas été retrouvé chez 149 autres familles de notre cohorte présentant une MP de forme autosomique dominante et seules quelques familles présentant une multiplication de SNCA (duplication ou triplication) sont rapportées dans la littérature (Lesage & Brice, 2009). Néanmoins, ce réarrangement génomique a mis en lumière l'importance du niveau d'expression de l'alpha-synucléine puisqu'une surexpression de SNCA est suffisante pour causer une MP. Par ailleurs, la sévérité de la maladie est corrélée avec le dosage génique car les sujets porteurs d'une duplication de SNCA (3 copies) présentent le tableau d'une MP alors les individus porteurs d'une triplication (4 copies) ont le phénotype plus sévère d'une DCL (Singleton *et al*., 2003; Chartier-Harlin *et al*., 2004; Ross *et al*., 2008; Ibáñez *et al*., 2009). Néanmoins, il est difficile de savoir si le phénotype clinique est dû au seul gène SNCA ou si les autres gènes présents dans le réarrangement génomique participent au tableau neurologique. Le gène MMRN1, présent dans le locus, a été impliqué dans les troubles cognitifs présentés par certains sujets (Nishioka *et al*., 2006). Ce gène est également présent dans la duplication de la famille P59, rapportée dans la littérature sous le nom FPD-131. Cette duplication est la plus longue décrite à ce jour et comporterait 33 à 34 gènes (Ibáñez *et al*., 2009). Il a par ailleurs été suggéré que la duplication de ce locus avait été causée par une recombinaison non allélique homologue (NAHR, non-allelic homologous recombination) (Ross *et al*., 2008). Néanmoins, seul le séquençage exact des points de jonction du réarrangement permettrait d'affirmer cette hypothèse.

Afin de répondre à ces questions et d'étudier les relations entre le génotype et le phénotype, nous avons approfondi notre description clinique et notamment neuropsychologique des membres de la famille P59. Nous nous sommes intéressés aux limites exactes de la duplication, au nombre de gènes et au séquençage des points de jonction. Nous avons également étudié le niveau d'expression des gènes de cette duplication.

2.1 Description de la famille

2.1.1 Tableau clinique et neuropsychologique

Nous avons détaillé le phénotype clinique et neuropsychologique des 10 membres de la famille P59 dont l'arbre généalogique est représenté Figure 14. L'ensemble des données est décrite dans le Tableau 10. La famille comporte 4 sujets parkinsoniens (P59/XX, P59/01, P59/02 et P59/05) et 6 sujets asymptomatiques ou avec quelques signes insuffisants pour porter le diagnostic de MP selon les critères de l'UKPDSBRC (Gibb & Lees, 1989).

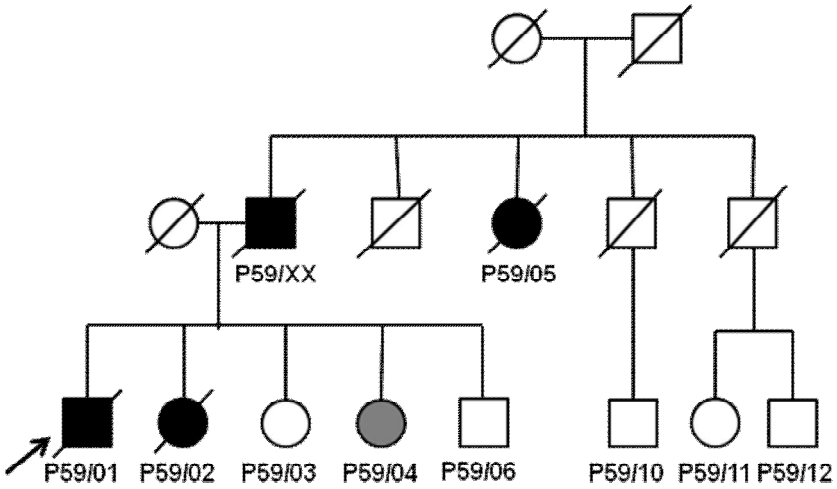


Figure 14 : Arbre généalogique de la famille P59.
Le probant (P59/01) est représenté par la flèche. Les sujets atteints par la MP sont en noir ; le sujet P59/04 est grisé car elle présente quelques signes parkinsoniens.

P59/XX était décédé avant le début de l'étude et seules des données anamnestiques sont relevées. Sa MP a débuté à 39 ans et a duré 23 ans. P59/05 a présenté une MP avec tremblement de repos, rigidité, akinésie et début asymétrique à l'âge de 65 ans et une durée de maladie de 19 ans. P59/01 a présenté une MP dopasensible ayant débutée à 48 ans par une akinésie. La MP de P59/02 a été diagnostiquée à 40 ans sans signe atypique. Lors de la dernière évaluation, elle était grabataire avec les critères de démence parkinsonienne (Emre *et al.*, 2007) avec dégradation de l'efficience cognitive globale, perturbation de la mémoire de travail et de la mémoire épisodique et un syndrome dysexécutif important. Elle est décédée quelques mois plus tard à 58 ans. P59/03 présente un discret tremblement postural et un syndrome dysexécutif avec un score à l'échelle de Mattis (MDRS) de 131/144. P59/04 a été évaluée à 52 ans et présente une rigidité du bras gauche et un déclin cognitif global (MDRS 130/144) avec trouble de la mémoire de travail et syndrome dysexécutif. P59/06 présente une discrète akinésie sans plainte cognitive et un score MDRS de 136/144. P59/10 a présenté un délire mystique et mégalomaniaque à l'âge de 37 ans traité depuis par neuroleptiques, sans récurrence des symptômes. Lors de l'évaluation neurologique à 47 ans, il présente un tremblement postural et une bradykinésie attribués à la prise chronique de

neuroleptiques. Il rapporte une plainte cognitive avec perturbation de la mémoire de travail, de la mémoire épisodique et syndrome dysexécutif. Le score MDRS est de 136/144. Les sujets P59/11 et P59/12 ne présentent pas de syndrome parkinsonien ni de plainte cognitive. Leurs scores MDRS sont 141 et 144/144, respectivement (Tableau 10).

Hormis de l'arthrose, aucun des sujets de la famille P59 ne rapporte de maladie particulière notamment pas de pathologie cardio-vasculaire, de maladie hématologique ou carcinologique.

2.1.2 Paraclinique : scintigraphie cérébrale au DaTSCAN

Une scintigraphie cérébrale au DaTSCAN a été réalisée chez les membres de la famille P59 par injection du radiotraceur [^{123}I]FP-CIT. L'interprétation est basée sur l'analyse semi-quantitative du traceur au niveau du noyau caudé et du putamen (calcul d'un index de liaison en utilisant le cortex occipital comme référence).

Cet examen est normal pour les sujets P59/03, P59/06, P59/10, P59/11 et P59/12. En revanche, le sujet P59/02 présente un déficit dopaminergique striatal sévère à prédominance droite et P59/04 montre une hypofixation modérée du putamen droit. Ces données sont en corrélation avec la rigidité du membre supérieur gauche observée chez ce sujet (Figure 15). Les valeurs de fixation du DaTSCAN corrèlent ainsi avec le phénotype clinique de ces 2 individus.

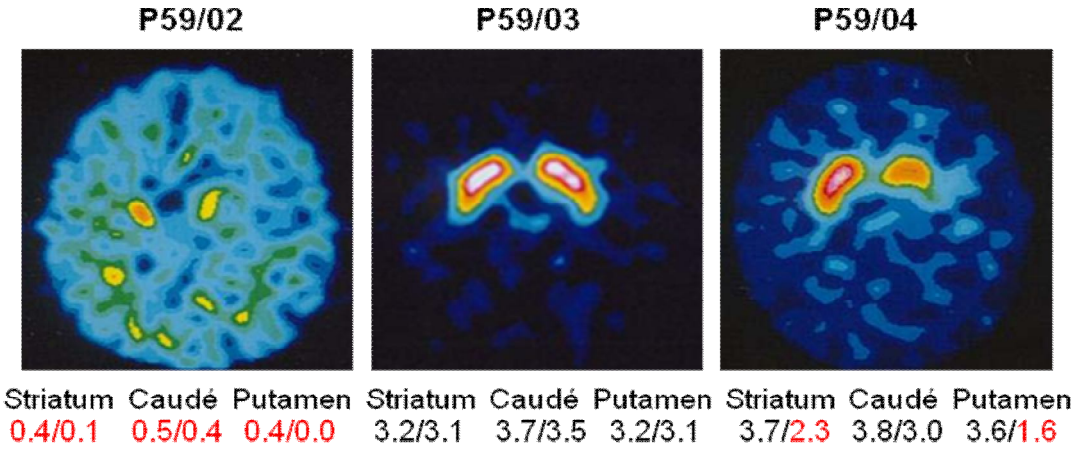


Figure 15 : Coupes passant par le striatum des DaTSCAN pour P59/02, P59/03 et P59/04.
Les valeurs correspondent aux index de liaison du traceur pour les zones d'intérêt (côté gauche/droit) ; les valeurs anormales sont indiquées en rouge.

Tableau 10 : Principales caractéristiques cliniques et neuropsychologiques des membres de la famille P59 et présence de la duplication de SNCA.
NA pour non applicable ou données manquantes ; + pour présent ; - pour absent.

	P59/XX	**P59/05**	**P59/01**	**P59/02**	**P59/03**	**P59/04**	**P59/06**	**P59/10**	**P59/11**	**P59/12**
Sexe	M	F	M	F	F	F	M	M	F	M
Année de naissance	1913	1914	1944	1947	1949	1952	1946	1957	1952	1949
Age au décès	62	84	57	58	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Age à l'évaluation	NA	83	53	57	55	52	58	47	52	55
Age de début de MP	39	65	48	40	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Premier signe	NA	NA	Akinésie	Dépression	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Bradykinésie	NA	+	+	+	-	-	+	+	-	-
Rigidité	NA	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Tremblement de repos	NA	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Instabilité posturale	NA	+	-	+	-	-	-	+	-	-
Début asymétrique	NA	+	+	+	-	+	-	-	-	-
Tremblement postural	NA	-	-	+	+	-	-	+	-	-
UPDRS III (/108)	NA	NA	55	72	2	1	2	14	0	0
Réponse à levodopa	NA	Non testée	Positive	Positive	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Plainte cognitive	NA	NA	NA	+	-	-	-	+	-	-
Atteinte efficience globale	NA	NA	NA	+	+	+	-	-	-	-
Déficit mémoire de travail	NA	NA	NA	+	-	+	+	+	-	-
Trouble mémoire épisodique	NA	NA	NA	+	-	-	-	+	-	-
Syndrome dysexécutif	NA	NA	NA	+	+	+	-	+	-	-
Score MDRS (/144)	NA	NA	NA	Démence	131	130	136	136	141	144
Prise neuroleptiques	NA	NA	-	-	-	-	-	+	-	-
Duplication SNCA	**NA**	**+**	**+**	**+**	**-**	**+**	**-**	**-**	**-**	**-**

2.2 Diagnostic de la duplication du locus de SNCA

2.2.1 Dosage génique de SNCA

Dans un premier temps, le diagnostic de la duplication a été obtenu par dosage génique des exons 1 et 7 de SNCA. Une duplication de SNCA a été identifiée chez P59/01, P59/02, P59/04 et P59/05, avec une augmentation du ratio SNCA/RPS18 à 1,5 indiquant la présence de 3 copies du gène (Figure 16). Le sujet P59/04 serait donc à un stade préclinique de la MP présentant quelques signes moteurs avec une surexpression de SNCA. Pour confirmer cette donnée, nous avons recherché la duplication de SNCA par une autre technique.

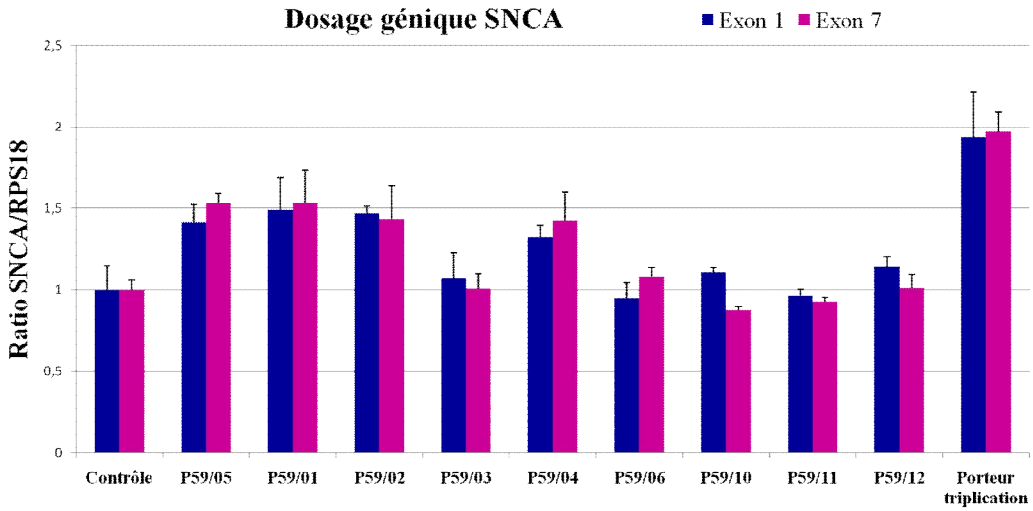


Figure 16 : Dosage génique des exons 1 et 7 de SNCA.
Le dosage est normalisé par rapport à celui du gène ribosomal 18S. Le ratio expression relatif SNCA/RPS18 est fixé à 1 pour les témoins. Un ratio de 1,5 indique la présence de 3 copies du gène (duplication) ; un ratio de 2 la présence de 4 copies (triplication). L'ADN d'un porteur d'une triplication de SNCA (Famille Iowa, http://ccr.coriell.org/) est utilisé comme contrôle positif.

2.2.2 FISH (Fluorescent in situ hydridization)

Une analyse en FISH a été réalisée dans les lignées lymphoblastoïdes immortalisées par Epstein-Barr Virus (EBV) de chaque membre de la famille. Le FISH a utilisé les clones BAC (bacterial artificial chromosome) de la banque RP11 : RP11-115D19 (comprenant une partie du gène SNCA), RP11-77E12 (comprenant une partie de SNCA et MMRN1) et RP11-347P22 (comprenant le gène FAM190A). A nouveau, une duplication du locus de SNCA a été retrouvée pour les individus P59/01, P59/02, P59/04 et P59/05. Pour évaluer si cette duplication présentait un mosaïcisme, les signaux des sondes de FISH ont été scorés sur au moins 100 noyaux en interphase dans les lymphocytes non immortalisés de P59/04. La duplication est retrouvée chez P59/04 dans au moins 80% des cellules (Figure 17).

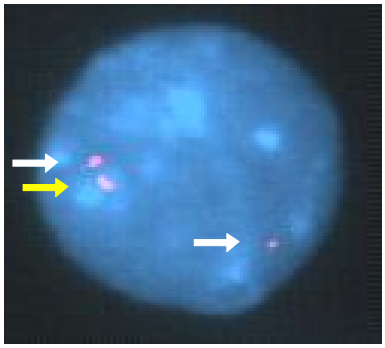


Figure 17 : FISH sur un noyau en interphase de leucocyte de P59/04 montrant les 3 sondes (3 copies = duplication de SNCA).

2.2.3 Puce CGH (comparative genomic hybridization)

Une analyse en puces CGH de haute densité (244K, Agilent) a permis de définir les bornes de la duplication avec plus de précision que l'analyse par marqueurs microsatellites réalisée précédemment (Ibáñez *et al*., 2009). La duplication s'étend sur 4,928 Mb et comporte 31 gènes connus ou supposés. La localisation des sondes de CGH aux extrémités de la duplication montre que l'extrémité centromérique se situe entre les exons 10 et 11 du gène MAPK10 et que l'extrémité télomérique se situe à l'intérieur du gène FAM190A (KIAA1680) (Figure 18).

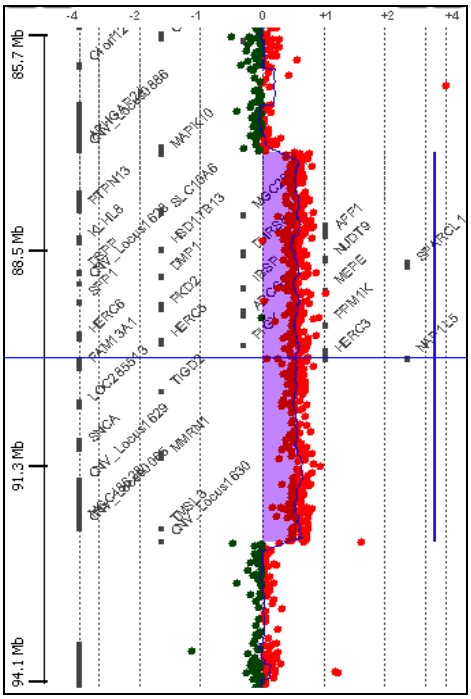


Figure 18 : Identification du segment dupliqué en CGH du sujet P59/04 montrant la duplication surlignée en violet au locus 4q21.3-q22.1, comprenant 31 gènes.

2.3 Analyse génomique de la duplication

2.3.1 Séquençage des points de jonction

Pour déterminer les points de jonction exacts du segment dupliqué, nous avons utilisé une stratégie de marche par PCR. Il a été suggéré que ce type de réarrangement se produit entre des séquences répétitives d'ADN comme des répétitions de type *Alu* ou LINE (long interspersed nuclear elements) (Ross *et al*., 2008). Les séquences du locus ont été obtenues sur la base UCSC assemblage de mars 2006 (www.genome.ucsc.edu). Les limites du segment dupliqué observé en

CGH comportent 2 LINE-1 (L1PA2 en 5' et L1PA4 en 3') qui ont été sélectionnés pour le séquençage. Les amorces de PCR ont été créées pour amplifier le point de jonction théorique. L'expérience a été répétée jusqu'à obtenir un fragment amplifié d'environ 500 bp pour le séquençage réalisé sur le séquenceur automatique 3730 (Applied Biosystems) avec le kit ABI BigDye Terminator V.3.1.

La jonction entre les segments comporte une délétion de 349 bases (301 de L1PA4 et 48 de LIPA2) (Figure 19). L'analyse des séquences des 2 LINE retrouve 95% de similarité pour 751 bp (BLAST, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/), suggérant que la duplication a été générée par recombinaison non allélique homologue (NAHR) entre les LINE (Inoue & Lupski, 2002).

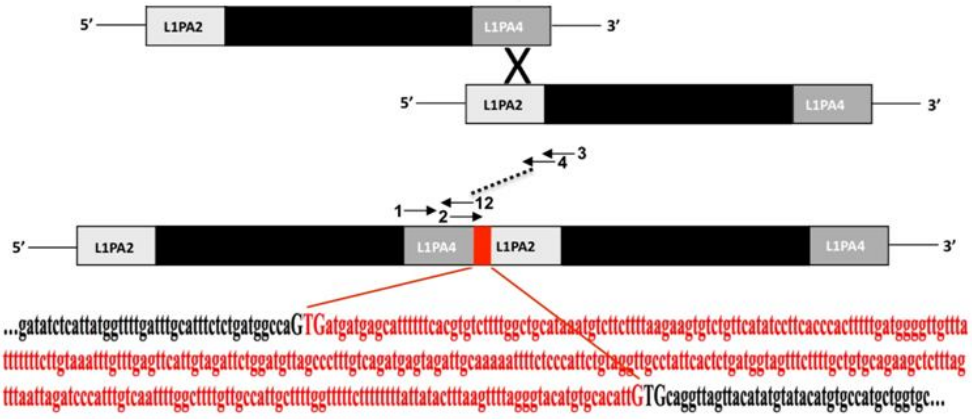


Figure 19 : Représentation schématique du réarrangement entre les 2 LINE avec position des 12 amorces utilisées pour la PCR et le séquençage.
Le segment manquant de 349 bases est représenté en rouge.

2.3.2 Mécanisme de la duplication

Le segment dupliqué est encadré par 2 LINE avec une homologie de séquence > 750 bases avec plusieurs zones de parfaite similitude, ce qui est requis pour une recombinaison non allélique homologue (Inoue & Lupski, 2002 ; Conrad *et al.*, 2010). Parmi les éléments transposables du génome humain, les LINE sont l'une des principales contraintes à l'origine de l'expansion génomique (Babushok & Kazazian, 2007). Un LINE-1 actif comprend une région non traduite en 5' (5'-UTR, untranslated region), deux cadres ouverts de lecture (ORF) impliqués dans l'intégration au génome et une région 3'-UTR. Le plus souvent, les LINE-1 sont tronqués en 5' et ne comportent qu'une partie 3'-UTR. L'analyse de la séquence des 2 LINE-1 (L1PA2 et L1PA4) de la duplication montre qu'ils ont des ORF inactifs (L1Base, Penzkofer *et al.*, 2005). Néanmoins, même si ces transposons ne sont pas actifs, ils peuvent être à l'origine de pathologies humaines en créant des mutations lors de leur insertion dans le génome et en contribuant à

l'instabilité génomique par des NAHR à l'origine de réarrangements comme des duplications (Belancio *et al.*, 2009).

2.4 Expression des gènes dupliqués

2.4.1. RT-PCR dans les lymphocytes immortalisés et les PBMC

Afin d'étudier les conséquences de la duplication du locus de SNCA, nous avons mesuré le taux d'expression des différents gènes contenus dans la duplication ; nous nous sommes intéressés d'abord au gène SNCA. Nous avons comparé l'expression normalisée de SNCA par 3 gènes de référence dans les cellules lymphoblastoïdes immortalisées de (i) un membre de la famille Iowa avec une triplication de SNCA (4 copies), (ii) deux sujets de la famille P59 porteurs de la duplication de SNCA (3 copies) et (iii) sept sujets contrôles (3 membres de P59 sans duplication et 4 contrôles non apparentés ; 2 copies). Le niveau d'expression de SNCA montre un gradient d'expression corrélé au nombre de copies de SNCA (Figure 20A).

Comme l'expression des gènes des cellules en culture peut être modifiée par l'immortalisation par EBV (Lee *et al.*, 2010), nous avons confirmé ces résultats dans les PBMC nouvellement prélevés de P59/04 (P59/02 étant décédée entre temps). A nouveau, nous avons observé une surexpression de 2,38 ± 0,41 fois de SNCA dans le PBMC de P59/04 comparé à 15 contrôles sains en utilisant RPS18 comme gène de référence (Figure 20B).

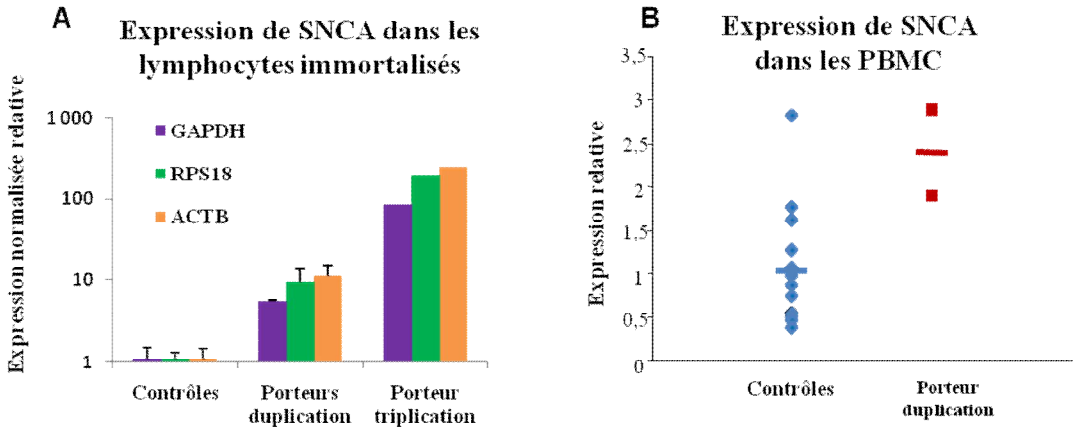


Figure 20 : Expression de SNCA dans les lignées immortalisées et les PBMC.
A. Niveaux d'expression normalisée par rapport aux contrôles et selon 3 gènes de ménage différents dans les lymphocytes immortalisés de sujets porteurs de multiplication de SNCA. Les porteurs de la duplication sont P59/02 et P59/04. B. Niveaux d'expression normalisée sur l'expression de RPS18 de SNCA dans les PBMC de 15 sujets sains et de P59/04 en dupliqué. Les barres indiquent les valeurs moyennes, fixée à 1 pour les témoins.

2.4.2 Puces d'expression Agilent

Afin d'étudier l'implication des gènes de la duplication dans le phénotype clinique, nous avons analysé leur expression par une technique de puces d'expression Agilent one-color Whole Human Genome 44K. L'expérience a inclus le sujet P59/04 (en tripliqué, ARN déposé sur 3 puces différentes) et 20 témoins sains (âge moyen 58,9 ± 13,4 ans). L'analyse des données par le logiciel Genespring a comparé l'expression des gènes présents dans la duplication entre le sujet dupliqué et les témoins avec un seuil de significativité fixé à un ratio d'expression ≥ 1,2 et un t-test de Welch (p<0,05).

Parmi les 31 gènes présents dans la duplication, neuf n'étaient pas exprimés à un niveau suffisant dans les PBMC, sept n'étaient pas significativement dérégulés et un gène n'était pas représenté. La surexpression de SNCA chez le dupliqué a été confirmée par 2 sondes (2,81 ± 0,46). Par ailleurs, 13 autres gènes de la duplication présentent une surexpression significative comprise entre 1,36 et 3,13 par rapport aux témoins (Tableau 11). Pour déterminer si ces gènes étaient surexprimés chez d'autres patients parkinsoniens, nous avons comparé nos données avec les gènes significativement dérégulés (t-test de Welch, p<0,05) de 2 études transcriptomiques de la littérature issues des bases de données GEO (Gene Expression Omnibus ; www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gds) (i) analyse Affymetrix de PBMC entre 50 parkinsoniens et 22 témoins (GEO dataset GDS2519 ; Scherzer *et al.*, 2007) et (ii) analyse Affymetrix de substance noire entre 16 parkinsoniens et 9 témoins (GDS2821 ; Lesnick *et al*., 2007).

Nous avons identifié 3 gènes significativement dérégulés dans les PBMC des parkinsoniens issus de GDS2519 (Tableau 11). De façon intéressante, ces gènes ne sont pas surexprimés dans les PBMC d'autres patients parkinsoniens et leur surexpression dans notre étude semble directement liée à leur présence dans le segment dupliqué. Par ailleurs, 10 gènes de la duplication sont significativement dérégulés dans la SN des parkinsoniens de GDS2821 suggérant que ces gènes pourraient contribuer au développement de la maladie. Néanmoins, nous n'avons pas identifié de différence notable dans le phénotype clinique des porteurs de la duplication par rapport aux autres parkinsoniens. Notamment nous n'avons pas noté de différence sur le plan cognitif ce qui ne permet pas de conclure que les autres gènes dupliqués jouent un rôle clinique prépondérant. Il semble donc que ce soit la surexpression de SNCA qui explique le phénotype clinique. D'autres mécanismes peuvent exister notamment un effet sur la stabilité de l'ARN, un épissage préférentiel ou la présence d'un ARN non codant. En effet, il existe une sous-expression de SNCA d'un facteur 0,6 à 0,7 à la fois dans les PBMC et la SN d'autres parkinsoniens (Tableau 11) alors que SNCA est surexprimé chez le porteur de duplication. Les mécanismes à l'origine de

la MP doivent donc être différents chez le porteur de duplication et chez les sujets sporadiques même si le phénotype clinique est similaire.

2.5 Discussion

La famille P59 qui présente une duplication du locus de SNCA nous a permis de décrire les relations entre le génotype et le phénotype d'une forme rare de MP. Le tableau clinique est celui d'une MP classique avec un début à l'âge moyen et une démence tardive. Nous avons par ailleurs identifié un sujet à un stade pauci-symptomatique de la maladie porteur de la duplication et présentant un déficit dopaminergique asymétrique au DaTSCAN. D'autres sujets porteurs de cette anomalie génétique ne présentent pas cette hypofixation (Ahn *et al*., 2008) ; possiblement du fait d'un âge plus jeune (44-51 ans) que notre sujet. Vraisemblablement, le sujet P59/04 développera prochainement le phénotype complet de MP.

Dans cette étude, nous avons montré que le taux d'expression de SNCA dans les cellules lymphoblastoïdes immortalisées des sujets dupliqués était corrélé avec le nombre de copies de SNCA et donc le dosage génique avec un taux supérieur dans la lignée issue d'un sujet porteur d'une triplication. De plus, nous avons confirmé cette surexpression chez P59/04 sur des PBMC non immortalisés avec un ratio d'expression moyen de 2,38 par rapport aux témoins. Comme la substance noire n'est pas accessible du vivant du sujet, nous avons montré que les lignées lymphoblastoïdes ou les PBMC *ex vivo* des sujets permettent l'étude de l'effet fonctionnel de la duplication. L'étude de ces cellules a permis de montrer que la mutation ponctuelle A53T de SNCA est également associée à une surexpression de SNCA avec un effet de déséquilibre allélique et à une régulation épigénétique (Voutsinas *et al*., 2010). La surexpression de SNCA contribue également à certaines formes sporadiques en raison de l'association entre les polymorphismes REP1 du promoteur de SNCA qui contrôle son taux d'expression et le risque de MP (Maraganore *et al*., 2006). Toutes ces données montrent l'intérêt de l'étude des cellules sanguines périphériques.

En plus de SNCA, nous avons montré que 30 autres gènes connus ou supposés sont présents dans la duplication qui s'étend sur 4,928 Mb. Il s'agit donc de la plus longue décrite à ce locus à l'origine d'une MP. Afin d'étudier leur implication potentielle dans le phénotype de la maladie, nous avons analysé leur expression par une approche transcriptomique dans les PBMC du porteur de la duplication. Nous avons démontré que 13 autres gènes de cette région étaient significativement surexprimés ; en particulier FAM13A, MMRN1 et NAP1L5 avec un ratio d'expression d'au moins 2. Nous avons également comparé ces résultats avec les données de 2 études transcriptomiques à partir de PBMC et de substance noire issues du site GEO. Certains des

gènes de la duplication étaient dérégulés, mais seuls FAM13A, HERC3, HERC5, KLHL8, NUDT9, SPP1 étaient surexprimés au niveau cérébral. Aucun autre gène de la duplication n'était surexprimé dans les PBMC des autres sujets parkinsoniens. Leur surexpression chez notre sujet semble donc être en rapport avec leur présence dans le segment dupliqué mais leur rôle biologique reste à confirmer dans l'étiologie de la MP.

Il a été suggéré que la présence de MMRN1 dans le segment dupliqué soit à l'origine d'une partie du tableau neurologique notamment de l'atteinte cognitive (Nishioka *et al.*, 2006). Nous avons donc analysé le profil neuropsychologique des membres de cette famille. Les tests ont démontré que P59/02 présentait les critères de démence parkinsonienne 17 ans après le début de la maladie (Emre *et al.*, 2007) et que P59/04 et P59/10 avaient une plainte cognitive et des troubles neuropsychologiques. Hors, seules P59/02 et P59/04 portent la duplication de SNCA. Ces données vont à l'encontre d'un rôle des autres gènes de la duplication sur le phénotype cognitif.

En conclusion, nous avons identifié la séquence exacte des points de jonction d'une duplication du locus de SNCA et démontré l'implication de LINE dans la genèse de ce réarrangement génomique. Cette duplication est à l'origine d'une surexpression de SNCA identifiable dans les cellules mononucléées sanguines et vraisemblablement responsable du tableau clinique. Nous avons montré que la scintigraphie cérébrale au DaTSCAN, les cellules lymphoblastoïdes et les PBMC étaient des outils intéressants dans l'étude des caractéristiques précliniques et biologiques de la MP.

Tableau 11 : Liste des 31 gènes présents dans le locus dupliqué.
Les gènes sont représentés selon leur symbole, leur numéro d'accession RefSeq et les sondes Agilent. RE1 correspond au ratio d'expression (ratio d'expression=RE) des gènes significativement dérégulés entre P59/04 et les témoins de notre étude Agilent. RE2 correspond au RE des gènes significativement dérégulés des PBMC issus du GDS2519 et RE3 à celui issu de la SN du GDS2821. NS = différence non significative ; A = absent.

Symbole	Nom du gène	RefSeq	Sonde Agilent	RE1	RE2	RE3
ABCG2	ATP-binding cassette G, member 2	NM_004827	A_23_P18713	NS	NS	NS
AFF1	AF4/FMR2 family, member 1	NM_005935	A_24_P414332	1.44	NS	NS
C4ORF36	chromosome 4 open reading frame 36	NM_144645	A_23_P377339	A		A
DMP1	dentin matrix acidic phosphoprotein 1	NM_004407	A_23_P133153	NS	A	A
DSPP	dentin sialophosphoprotein	NM_014208	A_23_P373541	A	NS	NS
FAM13A	family with sequence similarity 13, member A	NM_014883	A_23_P370651	2.24	0.85	1.51
			A_23_P7132	A		
FAM13AOS	FAM13A opposite strand	NR_002806	A_24_P614362	1.63		A
FAM190A	family with sequence similarity 190, A	NM_001145065	A_32_P306678	A		A
GPRIN3	GPRIN family member 3	NM_198281	A_24_P76649	1.36		0.65
HERC3	hect domain and RLD 3	NM_014606	A_23_P121586	A	NS	1.41
HERC5	hect domain and RLD 5	NM_016323	A_23_P110196	NS	NS	1.40
HERC6	hect domain and RLD 6	NM_017912	A_23_P250353	1.38	NS	0.68
HSD17B11	hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 11	NM_016245	A_23_P21644	1.65	NS	NS
			A_23_P408271	1.58		
HSD17B13	hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 13	NM_178135	A_24_P362969	A		
IBSP	integrin-binding sialoprotein	NM_004967	A_23_P144549	A	NS	A
KLHL8	kelch-like 8	NM_020803	A_23_P328729	1.53		1.38
			A_24_P54808	1.44		1.25
MAPK10	mitogen-activated protein kinase 10	NM_002753	A_23_P45025	A	NS	NS
MEPE	matrix extracellular phosphoglycoprotein	NM_020203	A_23_P155931	A	A	A
MMRN1	multimerin 1	NM_007351	A_23_P18539	2.98	NS	A
NAP1L5	nucleosome assembly protein 1-like 5	NM_153757	A_23_P144369	2.46		0.54
			A_24_P166073	1.76		
NUDT9	nudix type motif 9	NM_024047	A_23_P94860	1.57	NS	1.45
PIGY	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class Y	NM_032906	A_24_P140391	1.63		NS
			A_24_P120380	1.60		
PKD2	polycystic kidney disease 2	NM_000297	A_24_P106112	1.63	0.77	NS
			A_23_P167324	NS		
PPM1K	protein phosphatase 1K	NM_152542	A_24_P214598	NS		NS
PTPN13	protein tyrosine phosphatase, non-receptor 13	NM_080683	A_23_P18493	1.55	A	NS
			A_24_P586264	1.26		
SLC10A6	solute carrier family 10, member 6	NM_197965				
SNCA	synuclein, alpha	NM_000345	A_23_P29939	2.48	0.70	0.64
			A_32_P109653	3.13		0.57
SPARCL1	SPARC-like 1	NM_004684	A_23_P113351	A	NS	NS
SPP1	secreted phosphoprotein 1	NM_001040058	A_23_P7313	NS	NS	1.42
TIGD2	tigger transposable element derived 2	NM_145715	A_32_P20523	NS		NS
TMSL3	thymosin-like 3	NM_183049	A_24_P143189	NS	NS	NS

3. Etude de la duplication de SNCA : conséquences au niveau cellulaire

Nos précédentes analyses ont montré que le sujet porteur de la duplication présentait dans les PBMC une surexpression de 14 gènes du locus dupliqué dont SNCA. Les données de la littérature indiquent chez les parkinsoniens sporadiques une sous-expression de SNCA tant au niveau périphérique (PBMC ; Scherzer *et al.,* 2007) que cérébral (Substance noire ; Lesnick *et al.,* 2007). Ces données suggèrent que le taux d'expression de SNCA pourrait servir de marqueur biologique au niveau périphérique. Néanmoins, les études ayant mesuré le taux d'alpha-synucléine au niveau périphérique (sang total, plasma, PBMC) montrent des résultats contradictoires (Kim *et al.,* 2004 ; Tan *et al.,* 2005 ; Li *et al.,* 2007 ; Duran *et al.,* 2010). La présence de plusieurs isoformes de SNCA pourrait expliquer ces différences. En effet, un épissage altératif est à l'origine de 4 isoformes de SNCA (SNCA140, SNCA126, SNCA112 et SNCA98) (Beyer *et al.,* 2008). SNCA140 correspond au transcrit entier ; SNCA126, SNCA112 et SNCA98 sont des transcrits plus courts résultant de la délétion des exons 3, 5 et 3+5, respectivement. Il est donc intéressant de mesurer l'expression de chacun de ces transcrits et de déterminer si une isoforme est prépondérante. Par ailleurs, la MP n'est pas une entité homogène puisque des causes environnementales et génétiques coexistent et son diagnostic est parfois difficile à poser avec certitude. Les formes génétiquement déterminées permettent l'étude de sujets dont le diagnostic est plus sûr. Nous avons donc mesuré l'expression des isoformes de SNCA dans les PBMC de patients présentant une MP sporadique et une MP génétiquement déterminée (1) avec mutation G2019S de LRRK2 qui est la plus fréquente en population caucasienne (Healy *et al.,* 2008) et (2) avec duplication de SNCA. Nous avons utilisé la technique de RT-PCR en temps réel puis une validation par puces d'expression. De plus, pour étudier les conséquences cellulaires de la présence de la duplication de SNCA, nous avons étudié le profil d'expression génique dans les PBMC de ce sujet en le comparant avec l'analyse transcriptomique réalisée chez les parkinsoniens de forme sporadique et porteurs de la mutation G2019S de LRRK2.

3.1 Expression des isoformes de SNCA

Les amorces de PCR pour amplifier spécifiquement les 4 isoformes de SNCA ont été conçues grâce au logiciel Oligo Primer Analysis 5.0 (Molecular Biology Insights, Inc). Leurs positions exoniques et les conditions de PCR sont détaillées Tableau 12.

Tableau 12 : Conditions de RT-PCR en temps réel avec les séquences des amorces et leurs positions.

Gene	Isoforme	Séquences des amorces (5'-3')	Position des amorces	Température d'hybridation	Taille du produit
SNCA	SNCA140	CCAAAACCAAGGAGGGAGTG	Exon 3	58°C	194 pb
		TCCTTCTTCATTCTTGCCCA	Exon 4/5		
	SNCA126	ATGTAGTGGCTGAGAAGACC	Exons 2/4	56°C	157 pb
		TCTTCATTCTTGCCCAAC	Exons 4/5		
	SNCA112	CCAAAACCAAGGAGGGAGTG	Exon 3	60°C	191 pb
		ATACCCTTCCTTGCCCAACT	Exons 4/6		
	SNCA98	CTCTATGTAGTGGCTGAGAA	Exons 2/4	45°C	162 pb
		ATACCCTTCCTTGCCCTTA	Exons 4/6		
RPS18		CCTGGATACCGCAGCTAGGA		60°C	112 pb
		GCGGCGCAATACGAATGCCCC			

3.1.1 Chez le porteur de la duplication (P59/04)

Nous avons comparé l'expression des 4 isoformes de SNCA par RT-PCR en temps réel entre le porteur de la duplication P59/04 et 15 sujets sains (Figure 21). Seule l'isoforme SNCA112 est surexprimée (ratio d'expression 2,38) chez P59/04, ce qui en fait l'isoforme prépondérante.

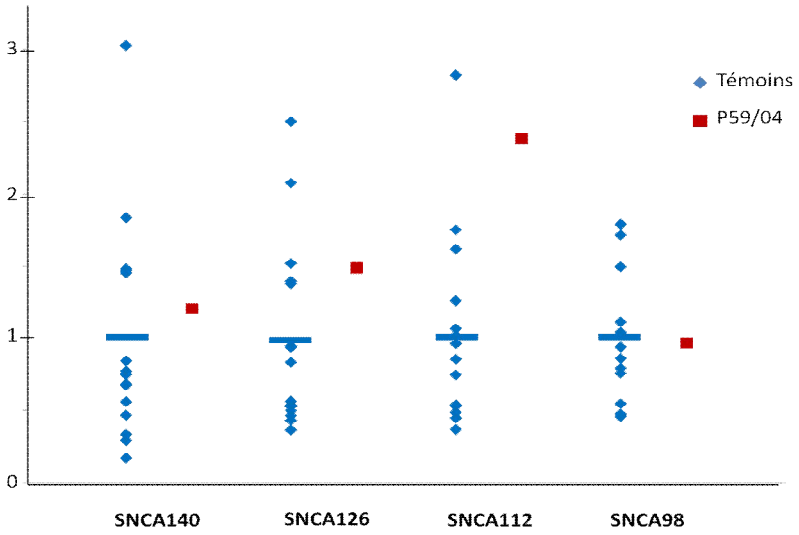


Figure 21 : Ratio d'expression normalisée des isoformes de SNCA chez P59/04 et les témoins. La barre correspond à la moyenne des témoins fixée à 1. La normalisation a été effectuée avec l'expression du gène RPS18.

3.1.2 Comparaison avec les autres parkinsoniens

3.1.2.1 RT-PCR en temps réel

Nous avons mesuré les ratios d'expression de chaque isoforme de SNCA dans les PBMC de parkinsoniens sporadiques et de sujets porteurs de la mutation G2019S de LRRK2 (dont le sujet à

un stade présymptomatique) par RT-PCR en temps réel. Nous avons comparé les ratios d'expression (normalisés avec l'expression de RPS18) de 20 parkinsoniens sporadiques (âge moyen 62,3 ± 8 ans) avec celle des 15 témoins (61,3 ± 10 ans) et de 9 sujets LRRK2 (66,1 ± 17 ans) avec 8 témoins appariés (70,1 ± 11 ans). Il a en effet été évoqué une augmentation de l'expression d'alpha-synucléine avec l'âge dans les PBMC (Kim *et al.*, 2004).

Les 4 isoformes de SNCA présentent une sous-expression significative de 36 à 64% aussi bien chez les sujets sporadiques que les porteurs de la mutation de LRRK2 par rapport au gène de référence (Figure 22).

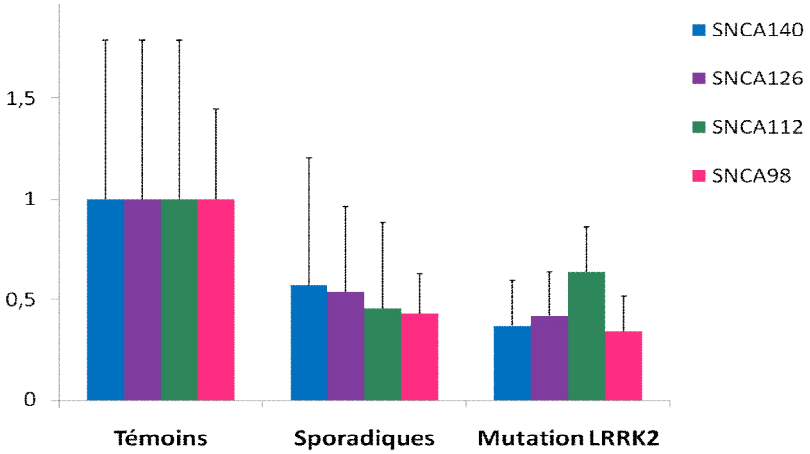


Figure 22 : Ratio d'expression des 4 isoformes de SNCA en RT-PCR chez les sujets parkinsoniens sporadiques et ceux porteurs de la mutation G2019S de LRRK2.
Le ratio moyen est fixé à 1 chez les témoins.

3.1.2.2 Puces d'expression Agilent

Nous avons validé ces résultats obtenus par RT-PCR en temps réel par les puces d'expression Agilent pour 20 témoins (âge moyen 58,9 ± 13 ans), 17 parkinsoniens sporadiques (62,4 ± 8 ans) et 9 porteurs de la mutation G2019S de LRRK2 (dont un sujet asymptomatique ; 66,1 ± 17 ans). Le gène SNCA est représenté par 2 sondes (A_23_P29939 and A_32_P109653) s'hybridant avec la partie 3'-UTR de SNCA et mesurant donc l'expression de toutes les isoformes. Chez le porteur de la duplication, SNCA est surexprimé d'un facteur moyen de 2,8 dans les PBMC (Tableau 11 de la partie 2.4.2). Concernant les parkinsoniens sporadiques et les porteurs de la mutation de LRRK2, une sous-expression significative de SNCA (de 34 à 54%) est à nouveau observée (Figure 23). Nous avons donc confirmé par 2 techniques la surexpression de SNCA chez le dupliqué (avec l'isoforme SNCA112 prépondérante) et la sous-expression de l'ensemble des isoformes chez les autres parkinsoniens.

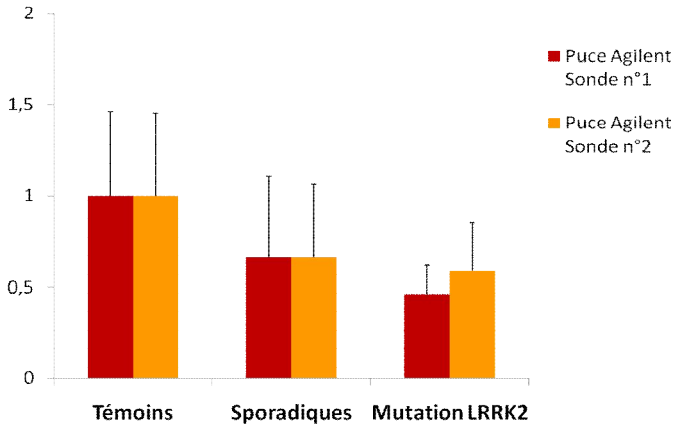


Figure 23 : Ratios d'expression de SNCA en puces d'expression chez les sujets parkinsoniens sporadiques et porteurs de la mutation G2019S de LRRK2.
Le ratio est fixé à 1 chez les témoins.

3.2 Etude transcriptomique des PBMC chez le dupliqué

3.2.1 Puces d'expression Agilent

Afin d'étudier les conséquences cellulaires (voies moléculaires dérégulées) en présence de la duplication de SNCA dans les PBMC, nous avons réalisé une étude transcriptomique par puces d'expression Agilent. Le logiciel Genespring a identifié une liste de 1787 sondes significativement dérégulées entre le sujet P59/04 en tripliqué et les 20 témoins (ratio d'expression ≥1,2 ; t-test de Welch avec correction de Benjamini & Hochberg pour tests multiples, p<0,05). Cette liste a été téléchargée dans le logiciel IPA dont la base de données a identifié 1463 gènes dérégulés (dont 116 gènes représentés par 2 sondes, 10 par 3 sondes, 1 par 5 sondes et 1 par 6 sondes). Toutes les sondes correspondant aux mêmes gènes montrent une dérégulation dans la même direction (sur ou sous-expression) sauf pour 7 gènes, soulignant la bonne reproductibilité de la procédure de micro-puces.

Notre analyse des voies canoniques a permis d'identifier 15 voies moléculaires canoniques significatives dans la liste de gènes (test exact de Fisher, p<0,05) incluant notamment la signalisation p53, l'extravasation leucocytaire, le métabolisme du glutathion, la régulation du cycle cellulaire et l'endocytose cavéolaire (Tableau 13). Nous avons comparé nos résultats avec l'analyse transcriptomique réalisée chez des souris transgéniques exprimant la mutation A53T de SNCA (Miller *et al.*, 2007). Sur les 1688 sondes dérégulées (ratio d'expression ≥1,2 ; t-test de Welch p<0,05) entre le tronc cérébral de 3 souris transgéniques A53T comparées aux contrôles, le logiciel IPA reconnait 1454 gènes. Notre analyse des voies canoniques retrouve chez la souris toutes les voies canoniques identifiées chez le sujet humain dupliqué dont 4 voies significatives

(signalisation IL-8, activation LXR/RXR, biosynthèse des glycosphingolipides et endocytose cavéolaire) (Tableau 13).

Par ailleurs, parmi les gènes dérégulés dans les PBMC de P59/04, nous avons identifié la surexpression de 20 histones (HIST1H2AD, HIST1H2AG, HIST1H2AJ, HIST1H2AM, HIST1H2BB, HIST1H2BD, HIST1H2BE, HIST1H2BF, HIST1H2BI, HIST1H2BK, HIST1H2BL, HIST1H2BN, HIST1H3D, HIST1H4F, HIST2H2AA, HIST2H2AC, HIST2H2BE, HIST2H4B, HIST3H2A, HIST3H2BB) avec un ratio d'expression entre 1,59 et 2,69. Ces données sont en bonne concordance avec la sous-expression des histones HIST1H2BD, HIST1H3B et HIST2H2BE dans l'étude transcriptomique de la lignée cellulaire dopaminergique de neuroblastome invalidée pour SNCA par RNA interférence et la sous-expression de l'histone HIST1H3F dans le cerveau des souris knock-out pour SNCA (Häbig *et al.*, 2009).

Tableau 13 : Liste des voies canoniques dérégulées chez P59/04 avec comparaison avec les souris transgéniques A53T et la plateforme Illumina.
Les valeurs indiquées correspondent aux valeurs de *p* du test exact de Fisher.

Voies canoniques	PBMC P59/04 Agilent	Souris transgénique A53T	PBMC P59/04 Illumina
Signalisation IL8	**0,0055**	**0,013**	0,26
Phagocytose macrophagique par récepteur Fcγ	**0,0076**	0,05	**0,0077**
Signalisation p53	**0,01**	0,46	**0,05**
Métabolisme du glutathion	0,01	0,38	0,49
Activation LXR/RXR	**0,012**	**0,002**	0,23
Signalisation récepteur aryl hydrocarbone	0,014	0,46	0,37
Biosynthèse glycosphingolipides - ganglioseries	**0,015**	**0,037**	0,31
Signalisation cellule Natural Killer	**0,016**	0,13	**0,0036**
Activation TR/RXR	0,018	0,14	0,07
Cycle cellulaire : Régulation G1/S	0,024	0,26	0,45
Endocytose cavéolaire	**0,027**	**0,025**	0,41
Régulation réponse immunitaire par NFAT	0,033	0,08	0,10
Signalisation carcinome rénal	**0,036**	0,09	**0,047**
Activation RAR	**0,042**	0,21	**0,00059**
Signalisation extravasation leucocytaire	0,05	0,49	0,30

3.2.2 Comparaison avec la plateforme Illumina

Pour justifier de la validité de ces résultats, nous avons réalisé une autre étude transcriptomique sur une plateforme génomique différente : plateforme Illumina avec les puces d'expression Human HT-12 v4. Nous avons comparé de la même façon le profil d'expression génique des PBMC entre P59/04 porteur de la duplication (en tripliqué, ARN déposé sur 3 puces différentes) et 18 contrôles sains (âge moyen 60,5 ± 12 ans). Le logiciel Genespring GX 11.0 a permis d'identifier 4937 sondes significativement dérégulées (ratio d'expression ≥1,2 ; t-test de

Welch avec correction de Benjamini & Hochberg pour tests multiples, $p<0,05$) avec 3967 gènes identifiés par le logiciel IPA (dont 277 gènes représentés par 2 sondes, 30 par 3 sondes, 6 par 4 sondes, 3 par 5 sondes et 1 par 7 sondes). La concordance de sur ou sous-expression entre les sondes représentant un même gène est moins bonne que pour la plateforme Agilent avec une concordance exacte dans 81,6% des cas.

Le logiciel IPA a permis d'identifier dans cette liste de gènes toutes les voies canoniques significatives identifiées par les puces Agilent chez P59/04 avec 5 d'entre elles significatives en test exact de Fisher $p<0,05$ (voie de la phagocytose par le récepteur Fcγ, signalisation p53, signalisation des cellules Natural Killer, signalisation carcinome rénal et activation RAR) (Tableau 13). En plus des voies canoniques moléculaires, le logiciel IPA permet d'identifier des listes toxicologiques constituées de gènes impliqués dans les voies de détoxification de xénobiotiques notamment (test exact de Fisher, $p<0,05$). Parmi les listes toxicologiques significatives dans la liste issue de la plateforme Illumina, on retrouve la voie p53 ($p=0,035$), la voie pro-apoptotique ($p=0,016$), la voie de diminution du potentiel de membrane mitochondriale ($p=0,025$). Il est intéressant de noter que la voie p53 est également significativement dérégulée au sein de la liste des gènes dérégulés chez le même sujet avec les puces Agilent ($p=0,01$). De même, la voie pro-apoptotique est à la limite de la significativité ($p=0,05$).

Enfin, pour juger de la validité des puces, nous avons identifié les gènes significativement dérégulés dans les PBMC de P59/04 communs entre les 2 plateformes Agilent et Illumina (Tableau 25 en Annexe 5). La dérégulation de ces 373 gènes évolue dans le même sens (sur ou sous-expression) dans 78,3% des cas.

3.2.3 Comparaison avec les autres sujets parkinsoniens

De la même façon, nous avons étudié le profil transcriptomique des PBMC des autres sujets parkinsoniens sporadiques et porteurs de la mutation G2019S de LRRK2 par les puces de la plateforme Agilent. Le logiciel Genespring (ratio d'expression $\geq 1,2$, t-test de Welch avec correction de Benjamini & Hochberg, $p<0,05$) a identifié chez les 9 sujets LRRK2 *versus* 20 témoins, 2370 sondes dérégulées dont 1765 gènes reconnus par le logiciel IPA. Chez les 17 parkinsoniens sporadiques *versus* les 20 témoins, le logiciel Genespring (ratio d'expression $\geq 1,2$, t-test de Welch avec correction de Benjamini & Hochberg, $p<0,05$) a identifié 1434 sondes dérégulées, dont 1053 gènes reconnus par la base de données IPA.

Grâce au logiciel IPA, nous avons mis en évidence les voies canoniques moléculaires présentes dans ces 2 listes. Les voies significatives et communes (test exact de Fisher, $p<0,05$) sont représentées Tableau 14 et correspondent notamment à la perturbation du fonctionnement

mitochondrial, de la phosphorylation oxydative et la signalisation du cytosquelette d'actine qui sont classiquement associés à la pathogénie de la MP.

Tableau 14 : Voies canoniques significativement dérégulées dans les PBMC communes entre les sujets porteurs de la mutation G2019S de LRRK2 et les parkinsoniens sporadiques avec correction de Benjamini & Hochberg.

Voies canoniques	**PBMC LRRK2**	**PBMC Sporadiques**
Biosynthèse des N-glycanes	0,043	0,009
Dysfonctionnement mitochondrial	0,00003	0,025
Phosphorylation oxydative	0,028	0,000008
Signalisation cancer de prostate	0,013	0,03
Signalisation cytosquelette d'actine	0,006	0,015

Ensuite, en raison du faible nombre de voies canoniques dérégulées dans la liste de PBMC des sujets sporadiques, en rapport avec un nombre plus faible de gènes dans cette analyse et de la plus grande variabilité entre ces individus non porteurs d'une même forme génétique, nous avons réalisé chez ces mêmes sujets une seconde analyse sans la correction pour tests multiples, soit 4840 sondes identifiées par Genespring et 3580 gènes par le logiciel IPA. Nous avons à nouveau comparé les voies canoniques significatives entre les parkinsoniens sporadiques et les porteurs de la mutation LRRK2 (Tableau 15) et notamment identifié activation PPARα/RXR, mécanismes moléculaires des cancers, rôle neuroprotecteur de THOP1 dans la maladie d'Alzheimer, signalisation IGF1, signalisation intégrines, signalisation JAK/STAT, signalisation neuregulin, signalisation oncostatin M, signalisation phospholipase C, signalisation PI3K/AKT, signalisation Rac, signalisation récepteur des œstrogènes et signalisation RhoA. Une de ces voies mérite d'être détaillée ; il s'agit de la voie neuregulin qui est dérégulée chez les sujets sporadiques et les LRRK2. Par ailleurs, le gène NRG1 (neuregulin 1) est significativement sous-exprimé chez le porteur de la duplication P59/04. Il est intéressant de noter que l'administration de neuroregulin1 protège de la toxicité de la 6-OHDA dans un modèle murin et cellulaire de MP (Carlsson *et al*., 2011).

Enfin, nous nous sommes intéressés aux listes toxicologiques du logiciel IPA dérégulées dans les PBMC des autres sujets parkinsoniens. A nouveau, nous avons identifié un dérèglement de la voie p53 (p=0,008) et un dysfonctionnement de la voie mitochondriale (p=0,00004) chez les porteurs de la mutation G2019S de LRRK2. Chez les sujets sporadiques, on note des perturbations du fonctionnement mitochondrial (p=0,021), de la voie de diminution du potentiel de membrane mitochondrial (p=0,019 et 0,025), de la voie pro-apoptotique (p=0,035). La voie p53 est présente, mais n'est pas significativement dérégulée (p=0,33).

Tableau 15 : Voies canoniques significativement dérégulées dans les PBMC communes entre les sujets porteurs de la mutation G2019S de LRRK2 et les parkinsoniens sporadiques sans correction de Benjamini & Hochberg.

Voies canoniques	**PBMC LRRK2**	**PBMC Sporadiques**
Activation PPARα/RXRα	0,032	0,02
Mécanismes moléculaires des cancers	0,019	0,0018
Rôle neuroprotecteur de THOP1 dans Alzheimer	0,023	0,025
Signalisation FLT3 dans les progéniteurs hématopoïétiques	0,034	0,039
Signalisation IGF1	0,011	0,023
Signalisation intégrine	0,0088	0,022
Signalisation JAK/STAT	0,03	0,01
Signalisation leucémie myéloïde chronique	0,038	0,011
Signalisation neuregulin	0,004	0,02
Signalisation oncostatine M	0,033	0,02
Signalisation phospholipase C	0,028	0,0014
Signalisation PI3K/AKT	0,0048	0,026
Signalisation Rac	0,039	0,004
Signalisation récepteur œstrogènes	0,0019	0,048
Signalisation RhoA	0,005	0,034

3.3 Discussion

Dans cette étude, nous avons montré une sous-expression des 4 isoformes de SNCA (SNCA140, SNCA126, SNCA112 et SNCA98) en RT-PCR en temps réel dans les PBMC de patients parkinsoniens sporadiques. Ces résultats ont été confirmés par une approche transcriptomique par micro-puces montrant une sous-expression de SNCA chez ces individus. Ces données sont en accord avec la diminution des taux d'alpha-synucléine dans le plasma et les PBMC de parkinsoniens (Li *et al*., 2007 ; Scherzer *et al*., 2007). Néanmoins, toutes les études n'ont pas montré ces résultats (Tan *et al*., 2005 ; Brighina *et al*., 2010 ; Duran *et al*., 2010). Une des explications à ces différences est que nous nous sommes intéressés à l'expression de l'ARN de SNCA dans les PBMC et non pas aux taux protéique ou plasmatique. De plus, nous avons validé nos résultats par une seconde technique de micro-puces et nous avons mesuré le taux de 4 isoformes. Une autre explication à cette discordance est la difficulté du diagnostic de MP surtout à un stade précoce (Tolosa *et al*., 2006). C'est pour cette raison que nous avons mesuré l'expression de ces isoformes dans une forme génétiquement déterminée par la mutation G2019S de LRRK2. A nouveau, nous avons observé une sous-expression de l'ensemble des isoformes de SNCA et même chez le sujet à un stade pré-symptomatique. Ceci indique un effet périphérique de la mutation LRRK2 dès le stade précoce et nous fait considérer l'expression de SNCA dans les PBMC comme un marqueur biologique de la MP.

Dans les PBMC du porteur de la duplication de SNCA, nous n'avons pas détecté de variation d'expression pour les isoformes SNCA140, SNCA126 et SNCA98, mais une surexpression

significative de l'isoforme SNCA112 en RT-PCR en temps réel. SNCA112 semble être l'isoforme prépondérante puisque la procédure de puces montre une surexpression de SNCA totale. Ces données sont à mettre en rapport avec la surexpression spécifique de SNCA112 dans les cerveaux de démence à corps de Lewy (Beyer *et al.*, 2004) et l'épissage alternatif induit par le MPP+ ou la roténone conduisant préférentiellement à l'isoforme SNCA112 qui exacerbe la mort cellulaire (Kalivendi *et al.*, 2010). La pathogénie spécifique de l'isoforme SNCA112 peut être rapportée à une propension accrue à l'agrégation en raison de la perte du site de phosphorylation sur la sérine 129 et la perte du site de reconnaissance dans l'exon 5 d'un inhibiteur de la fibrillation de l'alpha-synucléine (Beyer, 2006). L'agrégation de l'alpha-synucléine est sous la dépendance de son interaction avec les histones et la surexpression de l'alpha-synucléine est associée avec sa localisation nucléaire et sa liaison aux histones (Goers *et al.*, 2003). De façon intéressante, nous observons la surexpression de 20 histones dans les PBMC du porteur de la duplication de SNCA. L'expression de SNCA et des histones semble être corrélée, puisque l'inhibition de l'expression de SNCA chez la souris et dans des cellules humaines dopaminergiques est à l'origine d'une sous-expression d'histones (Häbig *et al.*, 2009). En plus de sa liaison aux histones, la surexpression de l'alpha-synucléine chez la drosophile provoque une neurotoxicité en inhibant l'acétylation des histones (Kontopoulos *et al.*, 2006). Par ailleurs, les formes tronquées d'alpha-synucléine favorisent l'acétylation des histones chez la levure (Liu *et al.*, 2011). Dans les PBMC du sujet dupliqué, HDAC5 (histone deacetylase 5) est dérégulée et les deacetylases participent à l'agrégation de l'alpha-synucléine en régulant la voie de l'autophagie (Su *et al.*, 2011). Ces données renforcent l'implication des voies de l'autophagie lysosomale dans la MP en particulier de la CMA avec implication de LAMP2 (dérégulé chez le porteur de la duplication) et la macroautophagie (Cuervo *et al.*, 2010).

Les voies canoniques identifiées par le logiciel IPA dans les PBMC du porteur de la duplication de SNCA renforcent l'implication de l'endocytose et des voies lysosomales avec la dérégulation de la synthèse des glycosphingolipides et de l'endocytose cavéolaire. De plus, la signalisation p53 est impliquée dans les voies de l'autophagie (Du *et al.*, 2009) et la pathogénie de SNCA (Alves Da Costa *et al.*, 2002). Enfin, l'inflammation est un des événements clés de la pathogénie de la MP et a été impliquée dans un modèle murin de surexpression de l'alpha-synucléine par vecteurs viraux (Ulusoy *et al.*, 2010). Dans les PBMC du sujet dupliqué, on observe une dérégulation de la signalisation IL-8, des cellules Natural Killer, de l'extravasation leucocytaire et l'activation du retinoid X receptor (RXR) ; toutes ces voies en rapport avec des phénomènes inflammatoires ayant été associées à la pathogénie de SNCA ou de la MP (Ross *et al.*, 2004 ; Mihara *et al.*, 2008 ; Brochard *et al.*, 2009 ; Friling *et al.*, 2009). Ces résultats

pourraient être le fait du type cellulaire étudié. Néanmoins, ces voies ont également été mises en évidence chez la souris transgénique SNCA (Miller *et al.*, 2007).

Afin de valider ces données de transcriptomique, nous avons réalisé les mêmes analyses avec les puces de la plateforme Illumina. A nouveau, nous avons observé une perturbation de voies canoniques, dont 5 étaient communes et significatives (voie de la phagocytose par le récepteur Fcγ, signalisation p53, signalisation des cellules Natural Killer, signalisation carcinome rénal et activation RAR). De même, 373 gènes étaient significativement dérégulés chez ce même individu entre les 2 plateformes (Tableau 25 en Annexe 5) dont 78% présentaient le même sens de dérégulation (sur ou sous-expression) permettant de vérifier la validité des résultats. Parmi ces gènes, certains sont pertinents avec la pathogénie de la MP et de SNCA. Les gènes UBAP2L, UBE2J1, UBR7 et USP31 sont associés à la voie d'ubiquitination des protéines. Les gènes GSR, CPT1A et UQCRFS1 sont associés au dysfonctionnement mitochondrial. Les gènes BCL2L14, BCL2A1, HRK à l'apoptose. Les gènes GSR et GSTM1 au stress oxydant. Les gènes AKT3, GADD45B, TP63 et PIK3R1 sont associés à la voie p53 et les gènes ATG12 et LAMP2 à l'autophagie.

Enfin, nous avons comparé les résultats issus de l'analyse du transcriptome du sujet porteur de la duplication de SNCA avec des parkinsoniens sporadiques et porteurs de la mutation G2019S de LRRK2. De façon intéressante, le profil d'expression génique de ces 2 derniers groupes de sujets est consistant avec l'identification de plusieurs voies canoniques associées à la MP comme le dysfonctionnement mitochondrial, la phosphorylation oxydative et la signalisation du cytosquelette d'actine. Concernant les voies canoniques communes entre porteurs de la mutation de LRRK2 et parkinsoniens sporadiques (analyse sans la correction pour tests multiples), de nombreuses voies significatives sont communes ce qui tend à indiquer qu'il existe un pattern moléculaire commun entre ces formes. Parmi ces voies, notons des voies impliquant des récepteurs membranaires comme la signalisation intégrine, des récepteurs à l'œstrogène, IGF-1, oncostatin M et neuregulin. Ces voies dérégulées sont à l'origine d'un dérèglement de la signalisation ERK/MAPK, PI3K/AKT et JAK/STAT. On note également des perturbations de l'architecture cellulaire neuronale avec le cytosquelette d'actine, la signalisation RhoA, Rac et phospholipase C. Enfin, les gènes impliqués dans les voies de signalisation intra et intercellulaire conduisant à la cancérisation sont dérégulés. Ces différentes voies ont également été impliquées dans la pathogénie de la MP (Quesada *et al.*, 2008; Carballo-Carbajal *et al.*, 2010). D'ailleurs, une analyse bioinformatique réalisée à partir de substance noire de parkinsoniens a relié aux voies métaboliques du diabète, du cancer et de l'inflammation (Moran & Graeber, 2008). Néanmoins, ces voies canoniques ne sont pas communes à celles identifiées chez le sujet porteur de la

duplication de SNCA. En revanche, les voies toxicologiques sont similaires dans les 3 groupes et mettent en exergue la voie p53, les perturbations mitochondriales et de l'apoptose qui semblent être des voies communes à la neurodégénérescence de la MP.

Notre analyse des voies perturbées au sein des PBMC de ces différents groupes de parkinsoniens sporadiques ou porteurs de mutations pathogènes met en lumière des voies classiquement impliquées dans la pathogénie de la MP. De plus elle permet d'identifier des voies qui mériteraient d'être étudiées de façon plus approfondie. Par ailleurs, l'expression de SNCA au niveau des cellules périphériques sanguines semble être un marqueur de la maladie même si son expression est augmentée chez le porteur de la duplication de SNCA ; ce qui suggère des mécanismes initiaux à la neurodégénérescence différents, mais des voies finales communes impliquant la mitochondrie, la voie p53 et l'apoptose.

4. Etude de la MP associée à une expansion de triplets SCA2 et comparaison avec le phénotype cérébelleux

Après l'analyse du transcriptome des PBMC de sujets parkinsoniens sporadiques et porteurs de mutation G2019S de LRRK2 ou de duplication de SNCA, nous nous sommes intéressés à une troisième forme de MP génétiquement déterminée avec mutation du gène ATXN2. En effet, une expansion pathologique de triplets au sein du gène ATXN2 a été identifiée chez des parkinsoniens de forme familiale mais également sporadique. Il a été proposé que la différence entre le phénotype parkinsonien et cérébelleux classique vienne d'une expansion de triplets CAG plus courte et entrecoupée différemment par des triplets CAA dans les phénotypes parkinsoniens (Kim *et al.*, 2007). Néanmoins, les mécanismes moléculaires de la neurodégénérescence restent mal connus. Nos premières analyses de transcriptome dans les PBMC nous ont permis d'identifier les mécanismes associés à la MP et également décrits dans la pathogénie des gènes LRRK2 et SNCA. Nous avons donc utilisé cette technique pour identifier les voies moléculaires dérégulées dans les PBMC des parkinsoniens porteurs de la mutation SCA2 et pour les comparer avec les individus SCA2 porteurs d'un phénotype cérébelleux.

4.1 Epidémiologie et tableau clinique

Une expansion pathologique de triplets SCA2 a été mise en évidence chez 3 probants de notre cohorte de forme familiale autosomique dominante (3/201 ; familles P02, P19 et P107) soit 1,5% et également chez 2 parkinsoniens sporadiques (2/317) soit 0,6%. Ces individus présentent une MP typique dopasensible sans troubles cognitifs initiaux ayant débuté en moyenne à 54,2 ± 13 ans [30-63]. La patiente ayant débuté sa MP à 30 ans, présente en plus de l'expansion pathologique SCA2, une mutation hétérozygote du gène de la Parkin (c823C>T, pArg275Trp).

Pour l'étude transcriptomique, nous n'avons pas pu inclure de sujets de la famille P02, perdue de vue car non suivie au CHRU de Lille par la suite. Dans la famille P19, la probante (P19/01) était décédée entre-temps, nous avons recueilli des informations cliniques et des prélèvements sanguins pour les autres membres. Quatre sujets ont été inclus dans cette étude : P19/02 et P19/10, respectivement sœur et frère de P19/01, âgés de 81 et 76 ans ; P19/06 fille de P19/01 âgée de 55 ans à un stade pré-symptomatique (akinésie membre supérieur gauche uniquement) et P19/18, cousin de P19/01 âgé de 76 ans. Dans la famille P107, nous avons inclus la probante P107/01 âgée de 72 ans et sa fille P107/02 à un stade pré-symptomatique âgée de 52 ans (akinésie des 2 membres supérieurs prédominant à droite). Les sujets parkinsoniens de forme sporadique

comportent une femme âgée de 49 ans, dont la MP évolue depuis 19 ans ainsi qu'une autre femme âgée de 74 ans, dont la maladie évolue depuis 18 ans. Ces 2 derniers sujets avaient bénéficié d'une stimulation cérébrale profonde des noyaux sous-thalamiques.

Nous avons recueilli des informations cliniques et prélèvements biologiques pour 6 sujets présentant une ataxie spino-cérébelleuse SCA2 appartenant à 5 familles différentes (2 hommes et 4 femmes ; âge moyen 47,3 ± 13 ans [23-62]. Deux d'entre eux présentent une neuropathie sensitive détectée en électromyographie en plus de l'ataxie et un sujet présente également un syndrome parkinsonien au second plan avec dénervation dopaminergique à la scintigraphie cérébrale au DaTSCAN.

4.2 Séquence de l'expansion de triplets

En collaboration avec le Pr Sablonnière (UMR837 INSERM, JPArc, Equipe 1), nous avons effectué le séquençage du gène ATXN2, afin de déterminer la longueur de l'expansion de triplets CAG chez les sujets parkinsoniens et cérébelleux présentant cette mutation. De plus, le séquençage de l'allèle le plus court (allèle sain) a permis d'identifier par soustraction la séquence de l'allèle muté (et notamment la présence et la localisation des interruptions CAA). Les résultats sont présentés dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Séquence de l'expansion de triplets au sein du gène ATXN2 des allèles sains et mutés pour les sujets parkinsoniens et cérébelleux.

N°	Profil	Expansion	Séquences des allèles sain et muté
P19/02	Parkinsonien	22/39	(CAG)8-CAA-(CAG)4-CAA-(CAG)8 (CAG)8-CAA-(CAG)4-CAA-(CAG)4-CAA-(CAG)9-CAA-(CAG)10
P19/06	Parkinsonien	22/39	(CAG)8-CAA-(CAG)4-CAA-(CAG)8 (CAG)8-CAA-(CAG)4-CAA-(CAG)4-CAA-(CAG)9-CAA-(CAG)10
P107/01	Parkinsonien	22/35	(CAG)13-CAA-(CAG)8 (CAG)35
P107/02	Parkinsonien	22/35	(CAG)13-CAA-(CAG)8 (CAG)35
P02/01	Parkinsonien	23/37	(CAG)13-CAA-(CAG)9 (CAG)8-CAA-(CAG)4-CAA-(CAG)4-CAA-(CAG)4-CAA-(CAG)4-CAA-(CAG)8
300226	Parkinsonien	22/32	(CAG)8-CAA-(CAG)4-CAA-(CAG)8 (CAG)32
P224/01	Cérébelleux	22/38	(CAG)13-CAA-(CAG)8 (CAG)8-CAA-(CAG)29
P236/01	Cérébelleux	22/38	(CAG)13-CAA-(CAG)8 (CAG)8-CAA-(CAG)29
P238/01	Cérébelleux	22/40	(CAG)13-CAA-(CAG)8 (CAG)8-CAA-(CAG)31
P238/02	Cérébelleux	22/45	(CAG)8-CAA-(CAG)4-CAA-(CAG)8 (CAG)45
P239/01	Cérébelleux	22/37	(CAG)13-CAA-(CAG)8 (CAG)8-CAA-(CAG)28

Les sujets parkinsoniens présentent une expansion pathologique de 32 à 39 triplets ; les cérébelleux une expansion de 37 à 45 triplets. Chez les sujets parkinsoniens, plus l'expansion de triplets est importante, plus on note d'interruptions par des triplets CAA. Il n'y a pas d'interruption pour les sujets présentant les allèles mutés les plus courts (32 et 35 triplets) et 4 à 5 interruptions par des CAA pour ceux présentant les allèles mutés les plus longs (37 et 39 triplets). En revanche, chez les cérébelleux, on ne note pas d'interruption CAA chez le sujet présentant l'expansion de triplets CAG la plus longue (45 triplets) et une seule interruption CAA chez les autres sujets.

4.3 Etude transcriptomique des sujets SCA2 parkinsoniens et cérébelleux

4.3.1 Sujets inclus

Pour l'analyse transcriptomique, nous avons inclus 13 sujets porteurs de la mutation SCA2 : 7 avec un phénotype parkinsonien et 6 avec un phénotype cérébelleux. Pour chaque individu, nous avons apparié un témoin sain d'âge comparable sans antécédent neurologique personnel ou familial. Les individus sont représentés Tableau 17.

Tableau 17 : Caractéristiques des sujets SCA2 et leurs témoins appariés.
P pour parkinsonien, C pour cérébelleux. Les sujets P1 à P4 appartiennent à la famille P19 ; les sujets P5 et P6 appartiennent à la famille P107. P7 est le sujet sporadique. C4 est la fille de C3. Le sujet C6 est le sujet cérébelleux présentant un syndrome parkinsonien modéré.

Sujet	Genre	Age	Témoin	Genre	Age
P1	F	80	T1	F	80
P2	M	76	T2	M	79
P3	M	76	T3	F	70
P4	F	55	T4	F	55
P5	F	72	T5	F	72
P6	F	52	T6	F	56
P7	F	49	T7	F	49
C1	F	49	T8	F	51
C2	F	62	T9	F	66
C3	F	44	T10	F	48
C4	F	23	T11	F	44
C5	M	59	T12	M	60
C6	M	47	T13	M	48

4.3.2 Analyse des puces d'expression

4.3.2.1 Etude du transcriptome des sujets SCA2 versus les témoins

Dans un premier temps, nous avons comparé le profil d'expression génique des PBMC des sujets portant une mutation du gène ATXN2 (parkinsoniens et cérébelleux ; n=13) comparé aux 13 témoins grâce aux puces d'expression Agilent. Les listes de gènes dérégulés sont issues du logiciel Genespring GX 11.0 avec un ratio d'expression ≥1,3 et un t-test de Welch $p<0,05$. Un total de 1400 sondes est dérégulé dans les PBMC des sujets SCA2 *versus* leurs témoins appariés soit 929 gènes reconnus par le logiciel IPA. De façon intéressante, s'y trouve le gène CACNA1A codant pour le canal calcique voltage-dépendant P/Q type alpha 1A, dont l'expression est augmentée chez les sujets SCA2 (ratio d'expression 1,77). L'expansion de triplets pathologique au sein de ce gène est à l'origine de l'ataxie spino-cérébelleuse 6 (SCA6) et influencerait l'âge de début de l'ataxie chez les sujets SCA2 (Pulst *et al.*, 2005). Notre analyse des voies canoniques a mis en évidence une perturbation des voies de la réponse immunitaire et inflammatoire, de l'apoptose, de l'organisation du cytosquelette d'actine et du guidage axonal (Tableau 18).

Tableau 18 : Voies canoniques significatives identifiées dans les PBMC des sujets SCA2. *p* correspond à la valeur du test exact de Fisher.

Voies canoniques	***p***
Développement lymphocytes B	0,00000003
Signalisation immunodéficience primaire	0,00001
Signalisation apoptose	0,0036
Apoptose médiée par lymphocytes T cytotoxiques	0,0057
Signalisation SAPK/JNK	0,0065
Signalisation RhoA	0,0072
Signalisation lupus érythémateux disséminé	0,0088
Signalisation récepteur de mort cellulaire	0,013
Signalisation protéine G médiée par Tubby	0,014
Induction d'apoptose par HIV1	0,014
Biosynthèse folates	0,017
Signalisation apoptose médiée par Myc	0,018
Signalisation guidage axonal	0,027
Signalisation lymphocytaire dans polyarthrite rhumatoïde	0,031
Signalisation granzyme B	0,031
Signalisation IL-4	0,035
Signalisation rejet de greffe	0,037
Signalisation diabète de type I	0,039
Signalisation maladie thyroïdienne auto-immune	0,043

A partir de la liste des 1400 sondes dont l'expression est modifiée, nous avons identifié les 43 sondes (soit 37 gènes) dérégulées dans un sens opposé chez les sujets parkinsoniens et cérébelleux comparés aux témoins (Tableau 26 en Annexe 6). Nous avons appliqué une analyse en composante principale (ACP) et avons identifié les 3 composantes permettant de séparer les individus selon leur phénotype (parkinsonien, cérébelleux, témoin) (Figure 24). Cette ACP est réalisée sans tenir compte au préalable du statut génétique des sujets. Il existe donc dans les PBMC un profil d'expression génique permettant de séparer les sujets selon leur phénotype clinique. A nouveau, les sujets à un stade pré-symptomatique de la maladie sont classés parmi les malades.

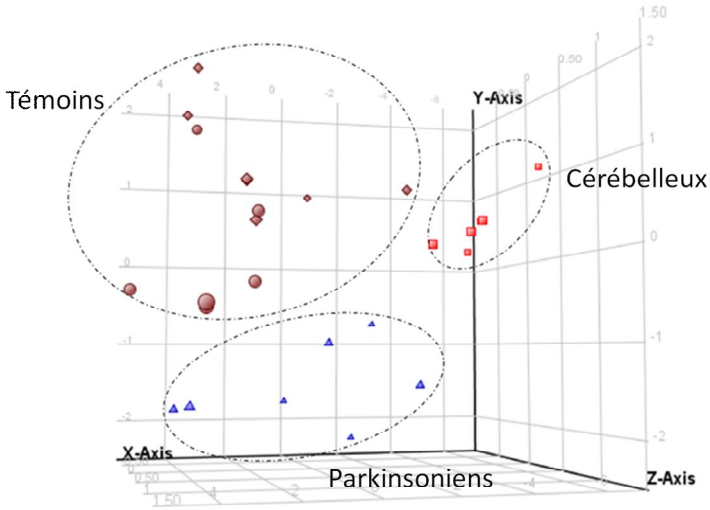


Figure 24 : Représentation en 3D de l'analyse en composante principale réalisée sur la liste des 43 sondes permettant de séparer les individus selon leur phénotype.
Les parkinsoniens SCA2 sont représentés par des triangles bleus ; les cérébelleux par des carrés rouges ; les témoins des parkinsoniens par des losanges marrons et les témoins des cérébelleux par des cercles marrons. Dans cette analyse, 67,7%, 22,1% et 10,8% de la variance des données est expliquée par les axes X, Y et Z, respectivement.

4.3.2.2 Analyse du transcriptome des parkinsoniens SCA2 versus leurs témoins appariés

L'analyse des données des puces Agilent des 7 parkinsoniens SCA2 *versus* leurs témoins appariés a permis d'identifier 1990 sondes par le logiciel Genespring GX 11.0 (ratio d'expression ≥1,3 et t-test de Welch p<0,05) soit 1306 gènes reconnus par la base de données IPA. Les gènes présents dans cette liste sont retrouvés dans des réseaux de synthèse protéique, du métabolisme lipidique, de biochimie des petites molécules, de maladies développementales, de troubles endocriniens et génétiques. Notre analyse des voies moléculaires canoniques retrouve un dérèglement de la signalisation de la sclérose latérale amyotrophique, de la réponse immunitaire, de la signalisation des cancers, de la signalisation HIF1α, de l'organisation du cytosquelette d'actine, de l'apoptose, de la signalisation VEGF, de la synthèse des folates et de la signalisation

des kinases (Tableau 27 en Annexe 7). Ces perturbations rendent donc compte de la pathogénie d'ATXN2. Par exemple, parmi les gènes dérégulés se trouve DDX6 (DEAD box polypeptide 6 ; ratio d'expression 1,31) qui est une hélicase de l'ARN qui interagit avec la protéine Ataxin-2 et est un composant des granules de stress et des P-bodies, structures cellulaires permettant le tri et le stockage des ARNm. Ataxin-2 est impliquée dans l'assemblage de ces éléments et joue ainsi un rôle dans le contrôle de la traduction (Nonhoff *et al.*, 2007). Par ailleurs, le gène PABPC4 (poly(A) binding protein cytoplasmic 4) est significativement sous-exprimé chez les parkinsoniens SCA2 (ratio d'expression 0,76) et appartient à la famille des PABP qui interagissent avec Ataxin-2 (Rasler *et al.*, 2005).

Pour valider ces données, nous avons réalisé une seconde analyse transcriptomique des PBMC de ces sujets en utilisant la plateforme Illumina. La même analyse par le logiciel Genespring (ratio d'expression ≥1,3, t-test de Welch p<0,05) a identifié 1556 sondes dont l'expression est modifiée entre les parkinsoniens SCA2 et les témoins appariés soit 1208 gènes reconnus par IPA. Notre analyse des voies canoniques retrouve les voies identifiées chez ces sujets par les puces Agilent, mais seules 2 sont significatives (Signalisation ERK5 et acide docosahexaenoïque) (Tableau 27 en Annexe 7).

Enfin, l'expression de SNCA est significativement diminuée chez les sujets parkinsoniens SCA2 dans les 2 séries de puces (ratio d'expression 0,47 et 0,50 pour les 2 sondes Agilent et ratio d'expression 0,49 et 0,50 pour les 2 sondes Illumina). De façon intéressante, l'expression de SNCA n'est pas dérégulée chez les cérébelleux SCA2 ce qui fait de sa sous-expression un marqueur périphérique de la MP même dans cette forme induite par une expansion de triplets polyglutamine.

4.3.2.3 Analyse du transcriptome des cérébelleux SCA2 versus leurs témoins appariés

De la même façon, nous avons identifié les gènes dérégulés chez les 6 sujets cérébelleux SCA2 en comparant avec leurs témoins appariés. Le logiciel Genespring a identifié 2616 sondes dérégulées (ratio d'expression ≥1,3, t-test de Welch p<0,05), soit 1841 gènes reconnus par IPA. Ces gènes sont retrouvés dans les réseaux moléculaires de l'organisation et l'assemblage cellulaire, la signalisation cellulaire, la réparation des dommages à l'ADN, les modifications post-transcriptionnelles de l'ARN, la synthèse protéique et la biochimie des petites molécules. Les voies canoniques dérégulées sont impliquées dans la réponse immunitaire, la signalisation des cancers, la mort cellulaire par apoptose, le métabolisme inositol phosphate, la signalisation MAPK et le métabolisme des ARN (Tableau 28 en Annexe 8). Parmi les gènes de la voie du métabolisme inositol phosphate, se trouvent les gènes ITPR3 (inositol 1,4,5-triphosphate receptor

3, ratio d'expression 0,69), ITPKC (inositol 1,4,15-triphosphate 3 kinase C, ratio d'expression 1,3 et 1,4) et ITPRIPL2 (inositol 1,4,5-triphosphate receptor interacting protein-like 2, ratio d'expression 1,65, 1,96 et 2). Cette voie est impliquée dans la pathogénie d'Ataxin-2 en raison de son interaction avec la portion C-terminale d'ITPR1 (inositol triphosphate receptor 1), un canal calcique. La présence d'une mutation du gène ATXN2 entraîne la libération de calcium au sein des cellules de Purkinje qui expriment de façon abondante ce récepteur (Liu *et al*., 2009). Par ailleurs, la voie de clivage et de polyadénylation des pré-ARNm (comportant les gènes CSTF1 à 3 = cleavage stimulation factor et CPSF1 = cleavage and polyadenyaltion specific factor 1) est également perturbée.

Nous avons également comparé ces résultats avec l'analyse réalisée chez les mêmes sujets par les puces Illumina. Le logiciel Genespring a identifié 2196 sondes soit 1866 gènes reconnus par la base de données IPA. Notre analyse des voies canoniques perturbées a identifié les voies communes avec l'analyse de la plateforme Agilent. Parmi celles-ci, notons les voies de signalisation des cancers, la signalisation p53, les signalisations kinases p70S6K et ERK/MAPK, le cycle cellulaire et la réponse immunitaire et inflammatoire (Tableau 28 en Annexe 8).

4.3.2.4 Gènes dérégulés chez les porteurs de mutation SCA2

Pour finir, nous nous sommes intéressés aux gènes des voies et fonctions associées à la mutation SCA2 et à leur variation d'expression dans les 2 plateformes Agilent et Illumina (Tableau 29 en Annexe 9). De façon intéressante, les gènes correspondant au métabolisme des ARN, au métabolisme inositol phosphate et au cancer sont représentés en nombre dans les PBMC des sujets SCA2 cérébelleux. En revanche, les gènes correspondant au cytosquelette d'actine, à la signalisation sclérose latérale amyotrophique, HIF1α et VEGF sont représentés en nombre dans les PBMC des sujets SCA2 parkinsoniens. Les gènes relatifs à l'apoptose sont représentés dans les 2 groupes.

4.4 Discussion

Nous avons mis en évidence une expansion pathologique de triplets CAG du gène ATXN2 chez 1,5% des sujets parkinsoniens de forme autosomique dominante de notre cohorte et chez 0,6% des sujets parkinsoniens de forme sporadique. Ces valeurs sont proches de celles retrouvées dans la littérature en population caucasienne (Furtado *et al*., 2004 ; Shan *et al*., 2004). L'âge de début de la MP est en moyenne de 54,2 ans (avec un sujet ayant débuté à 30 ans, mais présentant également une mutation hétérozygote de la Parkin, ce qui peut être un facteur explicatif). Cet âge moyen est donc plus âgé que celui des sujets SCA2 cérébelleux (en moyenne 47,3 ans pour les 6 sujets de notre étude). Dans la littérature, l'âge moyen de début de l'ataxie spino-cérébelleuse de

type 2 se situe dans la 4ème décade. Pour les sujets parkinsoniens présentant une mutation SCA2, nous avons effectué la revue de 22 cas publiés retrouvant un âge moyen de 52,1 ± 11 ans [34-73] (Gwinn-Hardy *et al*., 2000 ; Furtado *et al*., 2002 ; Payami *et al*., 2003 ; Shan *et al*., 2004 ; Lu *et al*., 2004, Momeni *et al*., 2005 ; Lim *et al*., 2006 ; Kim *et al*., 2007 ; Modoni *et al*., 2007 ; Charles *et al*., 2007 ; Wang *et al*., 2009). A noter que la famille P19 de la cohorte PARKFANORD a été décrite sous le nom SAL-722 (Charles *et al*., 2007).

Nous avons montré que l'expansion de triplets CAG est plus courte chez les sujets avec un phénotype parkinsonien [32-39] par rapport au phénotype cérébelleux [37-45], ce qui est retrouvé dans la littérature. L'autre élément intéressant est que l'interruption potentielle des triplets CAG par des CAA diffère entre cérébelleux et parkinsoniens. Les allèles normaux les plus représentés comportent 22 triplets avec la conformation 8-1-4-1-8 et 13-1-8 (nombre de triplets CAG interrompus par un triplet CAA souligné) (Sobczak & Krzyzosiak, 2005). Dans notre étude, sur l'allèle muté, chez les sujets cérébelleux, on note principalement un triplet CAA après 8 triplets CAG ou aucune interruption pour le sujet avec la plus longue expansion (45 triplets). En revanche, chez les parkinsoniens, on retrouve soit 4 ou 5 interruptions CAA soit aucune interruption pour les 2 sujets avec l'expansion la plus courte (32 et 35 triplets). Ces données ont également été retrouvées chez les parkinsoniens SCA2 d'origine caucasienne (Furtado *et al*., 2002 ; Payami *et al*., 2003 ; Charles *et al*., 2007 ; Modoni *et al*., 2007). En revanche, pour les populations asiatiques, on note souvent une seule interruption CAA avant les 8 derniers triplets CAG ou aucune interruption (Lu *et al*., 2004, Momeni *et al*., 2005 ; Lim *et al*., 2006 ; Kim *et al*., 2007 ; Wang *et al*., 2009) (Figure 25).

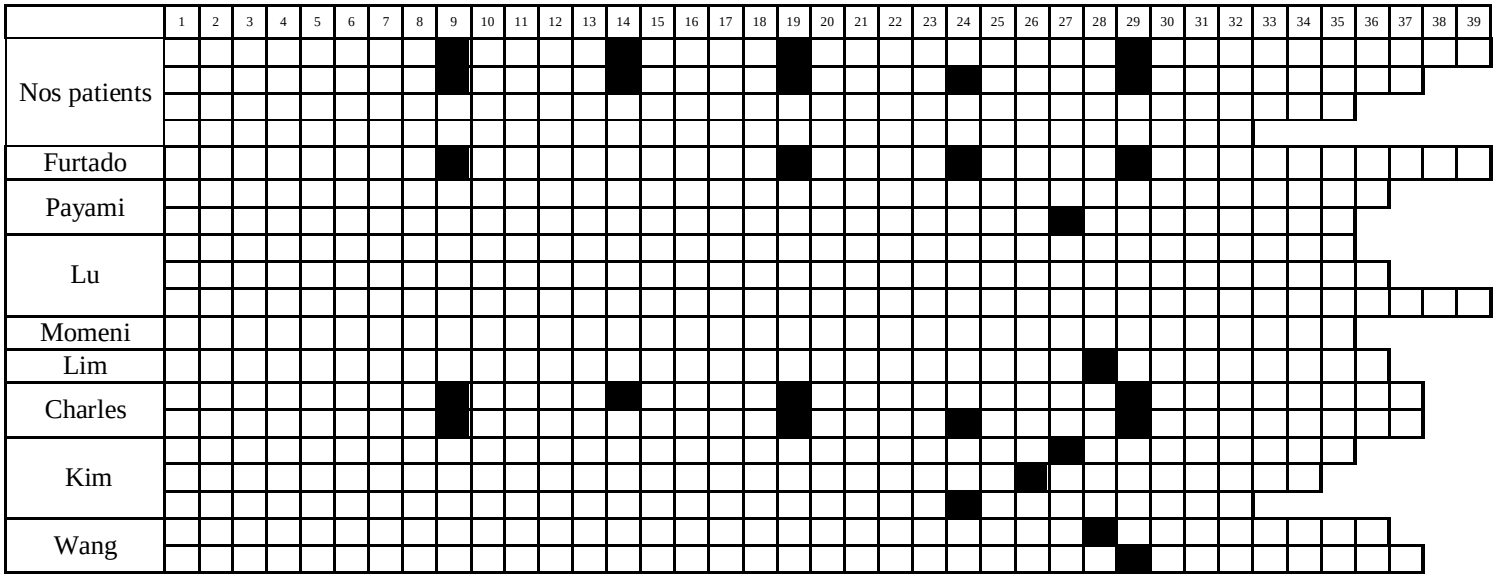


Figure 25 : Représentation schématique des expansions pathologiques de triplets CAG avec les interruptions CAA (en noir) pour nos patients parkinsoniens et les données de la littérature.

De plus, les expansions avec 4 interruptions CAA chez les parkinsoniens semblent se transmettre de façon stable à la génération suivante à la différence des sujets cérébelleux. Enfin, même si les triplets CAG et CAA codent pour des glutamines, ces différences sont susceptibles d'entraîner une conformation de l'ARN d'ATXN2 en simple épingle pour les formes sans interruption et avec plusieurs branches pour les formes interrompues. Il a été suggéré que cette conformation interagirait différemment avec les protéines se liant à l'ARNm et serait impliquée dans une modulation différente de la transcription et de la traduction (Sobczak & Krzyzosiak, 2005).

Nous avons ensuite utilisé une approche transcriptomique pour rechercher si ces différences génomiques entraînaient au sein des PBMC une dérégulation différente de l'expression génique. L'analyse de tous les sujets SCA2 a permis d'identifier des voies de signalisation dérégulées communes et rendant compte de la pathogénie d'ATXN2. Notamment, Ataxin-2 a été impliquée dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Satterfield *et al.*, 2002) et sensibilise les cellules de neuroblastome à l'apoptose (Wiedemeyer *et al.*, 2003). Par ailleurs, à nouveau, nous avons identifié dans les PBMC une dérégulation des voies de l'inflammation et de la réponse immunitaire qui semble être en rapport avec l'implication des cellules mononucléées sanguines dans la neurodégénérescence. Par ailleurs, il a été rapporté un lien entre des polymorphismes d'ATXN2 et des maladies inflammatoires comme la maladie cœliaque ou la polyarthrite rhumatoïde (Zhernakova *et al.*, 2011). Néanmoins, il serait intéressant de réaliser une étude transcriptomique à partir de cerveaux de sujets présentant une mutation SCA2, d'une part pour comparer à nos résultats, mais également pour s'assurer que la dérégulation des voies de l'inflammation observée au niveau périphérique n'est pas due uniquement au type cellulaire utilisé pour l'analyse. Enfin, on note une dérégulation de la voie de signalisation SAPK/JNK qui fait partie des voies des MAPK qui, par une cascade intracellulaire de phosphorylation en réponse à des stimuli de stress, cytokines inflammatoires et facteurs de croissance, régulent de multiples facteurs de transcription. Cette donnée est à rapprocher de la production de ROS et de la modulation de la voie Ras et ERK1/2 induite par l'expansion polyglutamine Ataxin-2 en culture cellulaire à l'origine de sa toxicité (Bertoni *et al.*, 2011).

Concernant l'étude du transcriptome dans les PBMC des sujets SCA2 cérébelleux, nous avons utilisé 2 plateformes de puces d'expression Agilent et Illumina. Nous avons constaté une concordance dans les voies canoniques dérégulées pour ces 2 plateformes pour 17 d'entre elles. Ces voies sont impliquées dans les signalisations des kinases, du cycle cellulaire et de la mort cellulaire. A noter pour la plateforme Agilent, une dérégulation du métabolisme inositol phosphate et des ARN avec de nombreux gènes dérégulés dans ces 2 voies (21 et 19,

respectivement, Tableau 29 en Annexe 9). Ces données sont en rapport avec la pathogénie d'ATXN2 (Lastres-Becker *et al.*, 2008 ; Liu *et al.*, 2009). Concernant l'étude du transcriptome des sujets parkinsoniens SCA2, seules 2 voies canoniques dérégulées sont communes entre les 2 plateformes (signalisation acide docosahexaenoïque et signalisation ERK5). L'acide docosahexaenoïque est un composant abondant des membranes neuronales et favorise la formation d'oligomères toxiques d'alpha-synucléine (De Franceschi *et al.*, 2011). La signalisation ERK5, autre MAPK est impliquée dans la survie et la différentiation neuronale et mériterait une étude plus approfondie dans la MP (Obara & Nakahata, 2010). Néanmoins, nous n'avons pas observé de concordance élevée en termes de voies de signalisation entre les 2 plateformes. Ce constat peut être mis en relation avec la moins bonne concordance dans le sens de dérégulation (sur ou sous-expression) des gènes représentés par plusieurs sondes sur la plateforme Illumina. En effet, pour la plateforme Agilent, on observe une concordance entre les sondes correspondant au même gène dans 90% des cas et uniquement dans 64% des cas pour la plateforme Illumina. Ces données nous font considérer la plateforme Agilent comme plus reproductible et donc plus fiable. Si nous regardons les résultats des voies canoniques dérégulées pour cette plateforme, certains sont pertinents pour la pathogénie d'ATXN2 comme la signalisation sclérose latérale amyotrophique (SLA). Cette voie est la plus significative et est représentée par 16 gènes dérégulés. Récemment, des liens entre SLA et ATXN2 ont été établis en raison de cas associant ataxie spino-cérébelleuse liée à l'ATXN2 et maladie du motoneurone et même un sujet SCA2 de phénotype parkinsonien qui a développé les signes cliniques d'une SLA avec une expansion de 33 triplets (Furtado *et al.*, 2004 ; Infante *et al.*, 2004 ; Nanetti *et al.*, 2009). Par ailleurs, quelques rares patients présentant une SLA sans aucun signe cérébelleux ou parkinsonien présentent une expansion de triplets CAG de taille intermédiaire avec interruption CAA. Ceci constitue le 3ème phénotype neurologique possible de cette mutation SCA2 et fait envisager la mutation SCA2 comme un facteur de risque de SLA (Odd-ratio de 5,57) (Elden *et al.*, 2010 ; Corrado *et al.*, 2011 ; Ross *et al.*, 2011). Il a été suggéré que le lien entre ces pathologies proviendrait de l'interaction entre l'Ataxin-2 et TDP-43, protéine majeure des inclusions neuronales identifiées dans la SLA. De plus, des inclusions TDP-43 ont été mise en évidence chez un sujet ataxique (Toyoshima *et al.*, 2011). Enfin, les résultats du transcriptome nous poussent à envisager d'autres voies d'intérêt dans la pathogénie d'ATXN2 comme la signalisation VEGF (vascular endothelial growth factor) et HIF1α (hypoxia inducible factor 1, alpha), qui n'ont pas été associées à ce jour à ATXN2, mais qui mériteraient des investigations complémentaires en raison de leur implication dans la MP et la SLA (Moreau *et al.*, 2011 ; Falk *et al.*, 2011). En effet, la majorité des modèles expérimentaux SCA2 utilisent des constructions

avec un grand nombre de triplets CAG (>45) ; il serait intéressant de réaliser des constructions plus courtes et avec interruptions CAA comme c'est le cas des sujets avec un phénotype parkinsonien.

En conclusion, le transcriptome des PBMC des sujets porteurs de mutation du gène ATXN2 apporte également des données intéressantes sur la pathogénie de ce gène en lien avec les anomalies génomiques à l'origine de phénotypes cliniques différents. Il permet également d'identifier des voies moléculaires prometteuses nécessitant d'autres investigations.

5. Etude de l'expression génique selon le stade évolutif de la MP

Après avoir étudié le profil transcriptomique des PBMC de différentes formes de MP sporadiques et génétiquement déterminées (mutations des gènes LRRK2, SNCA et ATXN2), nous avons pu confirmer notre hypothèse ; à savoir que la MP est associée à une dérégulation de l'expression génique identifiable au niveau périphérique. En raison de la présence de cette dérégulation chez des sujets porteurs de mutation à un stade préclinique de la maladie, nous nous sommes intéressés au profil d'expression génique non plus selon le statut génétique, mais selon le stade clinique évolutif de la maladie. Nous nous sommes notamment intéressés à des sujets pré-symptomatiques afin d'identifier les voies moléculaires précocement dérégulées qui pourraient servir de cibles thérapeutiques prometteuses.

5.1 Sujets inclus

Nous avons inclus les sujets en 4 groupes :

- Stade 1 : sujets pré- ou pauci-symptomatiques avec mutations délétères ou sujets parkinsoniens *de novo* (MP débutante sans encore de traitement dopaminergique)
- Stade 2 : sujets parkinsoniens avec traitement dopaminergique à un stade Hoehn & Yahr <3
- Stade 3 : sujets parkinsoniens évolués avec traitement dopaminergique à un stade Hoehn & Yahr ≥3
- Témoins : sujets témoins sains, sans antécédent neurologique personnel ou familial.

Nous avons séparé les individus parkinsoniens selon leur stade de Hoehn & Yahr en choisissant le stade 3 comme seuil de tournant vers une maladie évoluée en raison de l'apparition de troubles de l'équilibre.

Parmi ces individus, se trouvent des sujets parkinsoniens sporadiques (n=18), parkinsoniens *de novo* (n=3), de forme familiale sans mutation identifiée (n=3), avec mutation pathogène de type EIF4G1 (n=3), LRRK2 (n=9), PRKN (Parkin, n=5), ATXN2 (n=2), SNCA (n=1) et des témoins (n=11). Les sexes, âges lors des prélèvements et formes génétiques de ces sujets sont indiqués Tableau 19.

Tableau 19 : Détail des sujets selon leur sexe, âge et forme génétique inclus dans les 4 groupes. T-1 correspond au Pool40. EIF4G1, LRRK2, SNCA, ATXN2, PRKN correspondent aux sujets porteurs de ces mutations. SPO pour les parkinsoniens sporadiques, NOVO pour les parkinsoniens *de novo*, FAM pour les parkinsoniens de forme familiale sans mutation identifiée.

	Stade 1			**Stade 2**			**Stade 3**			**Témoins**		
	Nom	**Sexe**	**Age**	**Nom**	**Sexe**	**Age**	**Nom**	**Sexe**	**Age**	**Nom**	**Sexe**	**Age**
Agilent 1	EIF4G1-1	F	73	EIF4G1-3	F	78	LRRK2-6	F	78	T-1		53
	EIF4G1-2	H	75	LRRK2-3	F	67	LRRK2-7	F	84	T-2	H	79
	LRRK2-1	H	24	LRRK2-4	F	60	LRRK2-8	H	78	T-3	F	80
	LRRK2-2	F	74	LRRK2-5	H	65	LRRK2-9	F	65	T-4	F	82
	SNCA	F	55	PRKN-1	H	45	PRKN-2	H	51	T-5	H	75
				SPO-1	F	51	ATXN2-1	F	49	T-6	F	66
				SPO-2	F	77	SPO-8	H	73	T-7	F	72
				SPO-3	H	60	SPO-9	F	76	T-8	F	56
				SPO-4	F	67	SPO-10	F	69			
				SPO-5	H	60						
				SPO-6	F	61						
Agilent 2	NOVO-1	H	66	FAM-1	H	63	FAM-3	F	73	T-1		53
	NOVO-2	H	67	FAM-2	H	70	PRKN-3	F	77	T-2	H	79
	NOVO-3	H	55	SPO-11	H	72	PRKN-4	H	57	T-3	F	80
	SNCA	F	55	SPO-12	F	59	SPO-14	H	48	T-4	F	82
				SPO-13	F	57	SPO-15	H	64	T-5	H	75
							SPO-16	F	68	T-6	F	66
							SPO-17	H	56	T-7	F	72
							SPO-18	F	55	T-8	F	56
Illumina	EIF4G1-2	H	75	EIF4G1-3	F	78	LRRK2-6	F	78	T-1		53
	LRRK2-1	H	24	LRRK2-3	F	67	LRRK2-8	H	78	T-2	H	79
	LRRK2-2	F	74	LRRK2-4	F	60	PRKN-2	H	51	T-3	F	80
	ATXN2-2	F	55	LRRK2-5	H	65	PRKN-3	F	77	T-6	F	66
	SNCA	F	55	PRKN-1	H	45	PRKN-5	H	78	T-7	F	72
				SPO-1	F	51	ATXN2-1	F	49	T-9	F	71
				SPO-2	F	77	SPO-8	H	73	T-10	F	79
				SPO-3	H	60	SPO-9	F	76	T-11	H	74
				SPO-4	H	60	SPO-10	F	69			
				SPO-6	F	61	SPO-15	H	64			

5.2 Analyse transcriptomique

Nous avons réalisé une étude transcriptomique comparant les profils d'expression génique des PBMC entre les sujets malades de chaque groupe et les témoins. Nous avons réalisé 3 expériences différentes. Les 2 premières expériences avec les puces d'expression Agilent en utilisant les 8 mêmes témoins pour limiter la variabilité des résultats. La 3ème série d'analyse a été réalisée avec les puces de la plateforme Illumina en reprenant seulement en partie les sujets de la première série Agilent (Tableau 19). Les gènes dérégulés ont été obtenus grâce au logiciel Genespring GX en utilisant un ratio d'expression ≥1,3 et un t-test de Welch (p<0,05) et ont été soumis au logiciel IPA pour y identifier les voies métaboliques canoniques significatives. Nous avons analysé chaque groupe de sujets de chaque plateforme initialement de façon séparée, car

Genespring ne permet pas d'analyser dans une même expérience des puces issues de plateformes différentes (Agilent et Illumina).

5.2.1 Gènes et voies dérégulés selon le stade de la maladie pour chaque expérience

Pour chacune des 3 expériences (Agilent 1, Agilent 2 et Illumina), nous avons analysé les gènes dérégulés en comparant le profil d'expression génique de chaque stade clinique avec celui des témoins. Nous avons ainsi obtenu 9 listes de gènes dérégulés, que nous avons téléchargées dans la base de données du logiciel IPA. Pour l'expérience Agilent 1, notre analyse avec Genespring a identifié 4049 sondes dérégulées (2962 gènes reconnus par IPA) pour le stade 1 ; 5094 sondes dérégulées soit 3843 gènes reconnus pour le stade 2 et 3214 sondes dérégulées soit 2417 gènes reconnus pour le stade 3. Pour l'expérience Agilent 2, notre analyse avec Genespring a identifié 6030 sondes dérégulées (4374 gènes reconnus par IPA) pour le stade 1 ; 8078 sondes dérégulées soit 6039 gènes reconnus pour le stade 2 et 8023 sondes dérégulées soit 5981 gènes reconnus pour le stade 3. Pour l'expérience Illumina, notre analyse avec Genespring a identifié 3195 sondes dérégulées (2548 gènes reconnus) pour le stade 1 ; 1270 sondes dérégulées soit 949 gènes reconnus pour le stade 2 et 1297 sondes dérégulées soit 990 gènes reconnus pour le stade 3.

5.2.1.1 Voies canoniques dérégulées

Nous nous sommes intéressés aux voies canoniques significatives communes aux 3 expériences pour chaque stade clinique qui sont représentées Tableau 20. Parmi celles-ci, notons la dérégulation de la signalisation RhoA/guidage axonal à tous les stades de la maladie, celle des voies de l'inflammation (avec extravasation leucocytaire, IL-10, récepteurs Toll-like), des voies associées aux cancers et à la survie/croissance cellulaire ainsi que celles modulant la traduction et la transcription.

Tableau 20 : Voies canoniques dérégulées présentes dans chaque expérience (Agilent et Illumina) selon le stade clinique.

Stade 1	Stade 2	Stade 3
Signalisation AMPK	Extravasation leucocytaire	Développement des cellules B
Signalisation cancer pulmonaire	Mécanismes moléculaires des cancers	Signalisation ATM
Signalisation EIF2	Signalisation guidage axonal	Signalisation IL-10
Signalisation RhoA	Signalisation ILK	Signalisation Récepteur glucocorticoïdes
Signalisation Wnt/β-caténine	Signalisation cancer colorectal	Signalisation RhoA
	Signalisation NF-κB	
	Signalisation p38 MAPK	
	Signalisation Récepteur aryl hydrocarbone	
	Signalisation Récepteur Toll-like	

5.2.1.2 Gènes dérégulés

Nous avons également repéré les gènes dérégulés pour chaque stade présents dans les plateformes. Nous avons identifié 96 gènes communs entre les 3 expériences pour le stade 1, 73 gènes communs pour le stade 2 et 90 gènes pour le stade 3 (Tableau 30 en annexe 10). Néanmoins, seuls 3 gènes sont présents pour les 3 stades cliniques, dont 2 montrent une surexpression dans tous les cas. Il s'agit d'AKT3 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3) et de SKP1 (S-phase kinase-associated protein 1). Ces gènes pourraient ainsi constituer des marqueurs biologiques de la maladie au niveau périphérique. De plus, leur dérégulation apporte des éléments sur la pathogénie. En effet, AKT3 ou protéine kinase b, gamma fait partie de la famille des AKT, sérine/thréonine kinases qui régulent la signalisation cellulaire par la voie PI3K/AKT en réponse à l'insuline et à des facteurs de croissance en particulier IGF-1 et qui sont impliquées dans la prolifération cellulaire, la différentiation, l'apoptose et la cancérisation (Matheny & Adamo, 2009). L'alpha-synucléine sauvage se lie à AKT en réponse à IGF-1 et la surexpression et les mutants de l'alpha-synucléine inhibent l'activation de AKT (Chung *et al*., 2011). SKP1 est l'un des composants du complexe ubiquitine E3 ligase et est significativement sous-exprimé dans la substance noire des parkinsoniens (Grünblatt *et al*., 2004). De plus, l'invalidation de SKP1A dans des lignées cellulaires dopaminergiques murines les rend susceptibles au MPP+ et reproduit les caractéristiques moléculaires de la MP (Fishman-Jacob *et al*., 2009 ; Mandel *et al*., 2009).

5.2.2 Gènes et voies dérégulés communs présents dans toutes les analyses

Afin d'avoir une représentation plus complète des voies perturbées, nous avons regroupé les listes de gènes dérégulés de chaque expérience pour chaque stade clinique. Pour le stade 1, 13274 sondes sont regroupées, soit 7262 gènes uniques reconnus par le logiciel IPA. Pour le stade 2, 14442 sondes sont regroupées, soit 7452 gènes uniques reconnus par le logiciel IPA. Pour le stade 3, 12534 sondes sont regroupées, soit 6802 gènes uniques reconnus par le logiciel IPA.

Ces 3 listes de gènes ont été soumises à IPA ce qui nous a permis d'identifier les 3070 gènes communs aux 3 stades correspondant aux gènes dérégulés dans les PBMC quel que soit le stade de la MP. L'analyse des voies canoniques par IPA à partir de ces 3070 gènes est présentée Tableau 31 en Annexe 11. De façon intéressante, s'y trouvent à nouveau la voie Ephrin/Rac/RhoA/cytosquelette d'actine/guidage axonal, des voies d'inflammation et d'activation leucocytaire (présentation d'antigènes, intégrines, extravasation leucocytaire), la régulation du cycle cellulaire (signalisation Cdc42, régulation G1/S, régulation des cyclines), les voies de mort cellulaire et d'apoptose, la signalisation p53, la signalisation PTEN, PI3K/AKT et

mTOR, la signalisation p38 MAPK et ERK5, l'ubiquitination des protéines, le dysfonctionnement mitochondrial et la signalisation neuregulin.

De la même façon, nous avons identifié les voies toxicologiques dérégulées dans les PBMC à tous les stades cliniques. Celles-ci comportent le dysfonctionnement mitochondrial, la signalisation p53 et les voies apoptotiques.

5.3 Discussion

Les analyses transcriptomiques des PBMC selon le stade de la MP ont mis en évidence une dérégulation des voies de signalisation RhoA/guidage axonal, de l'inflammation, du cycle cellulaire, de l'apoptose, des voies de survie et croissance cellulaire notamment MAPK dans les différents stades des analyses réalisées. Ces résultats semblent robustes puisque retrouvés chez différents sujets parkinsoniens à des stades différents de leur maladie et dans 3 expériences réalisées à partir de 2 plateformes de micro-puces différentes (Agilent et Illumina). A ce jour, peu d'études transcriptomiques se sont intéressées au profil d'expression selon le stade évolutif de la maladie. En effet, la majorité des études chez l'homme a porté sur l'étude de la substance noire ou d'autres aires cérébrales, uniquement accessibles *post-mortem*. En revanche, une équipe a analysé chez le macaque le profil d'expression génique cérébral (substance noire, cortex pré-frontal, *globus pallidus* et *putamen*) à différents temps d'une intoxication chronique au MPTP (Bassilana *et al*., 2005 ; Storvik *et al*., 2010). La symptomatologie parkinsonienne apparaît après 15 jours d'administration et 3 groupes d'animaux correspondant à 3 stades évolutifs différents ont été constitués (prélèvements cérébraux après 6 jours, 12 jours et 25 jours d'intoxication). L'analyse des listes de gènes dérégulés a été réalisée par le logiciel d'annotation DAVID qui est un autre outil bioinformatique d'analyse des données transcriptomiques (http://david.abcc.ncifcrf.gov/) et a permis d'identifier les voies de signalisation KEGG (http://www.genome.jp/kegg/pathway.html). Les résultats sont indiqués Tableau 21 et montrent un profil d'expression génique globalement similaire pour les animaux à un stade présymptomatique (J6 et J12) et un profil différent au stade avancé (J25). De façon intéressante, dans notre étude dans les PBMC pour le stade 1, nous observons comme chez le macaque MPTP au stade précoce, une dérégulation des voies de signalisation de différents cancers qui impliquent les voies de prolifération cellulaire et le cycle cellulaire avec notamment les gènes MAP2K1, MAP2K2 et CDC42. Par ailleurs, au stade plus tardif, est observé un dérèglement de la voie des MAPK dans le modèle animal, également retrouvée dans le stade 2 des PBMC humains. Enfin, à tous les stades, est notée une altération de la signalisation de l'inflammation indiquant qu'il s'agit bien d'un événement relié à la pathogénie de la maladie puisqu'identifié dans les analyses du

transcriptome cérébral et pas uniquement spécifique des PBMC comme cela a pu être une critique à nos premiers résultats sur les sujets porteurs de mutation de LRRK2 (Greene, 2011).

Tableau 21 : Voies métaboliques dérégulées dans différentes aires cérébrales chez le macaque intoxiqué par le MPTP à différents temps d'exposition (6 jours, 12 jours et 25 jours).
Nous n'avons pas indiqué les résultats issus de la substance noire car seule l'analyse à J25 a montré des voies KEGG dérégulées (maladie de Parkinson et infection à E Coli).

	Cortex préfrontal	**Globus Pallidus**	**Putamen**
J6	Cancer pancréatique Cancer vessie Cancer pulmonaire Gliome Potentialisation à long terme Signalisation VEGF Carcinome rénal Dépression à long terme Signalisation Fc epsilon Ri Adhésion focale Cancer colorectal Signalisation ErbB Mélanogénèse Signalisation GnRH Jonction GAP		Infection E Coli Maladies neurodégénératives Maladie de Parkinson Maladie d'Alzheimer
J12	Potentialisation à long terme Mélanogénèse Signalisation GnRH Dépression à long terme Leucémie aigüe myéloïde Jonction GAP Gliome Signalisation VEGF Carcinome rénal Cancer pancréatique Cancer vessie Cancer pulmonaire Formation axe dorso-ventral Cancer thyroïde	Métabolisme glutathion Métabolisme xénobiotiques cytochrome P450 Présentation antigènes	Maladies neurodégénératives Diabète de type I Maladie à prion Molécules d'adhésion cellulaire
J25	Signalisation MAPK	Ribosome Maladie d'Alzheimer	Potentialisation à long terme Jonction GAP Molécules d'adhésion cellulaire Cytotoxicité médiée par cellules NK Signalisation GnRH Diabète de type I

Dans l'analyse des 3070 gènes communs aux 3 stades qui correspondent aux gènes dérégulés quel que soit le stade de la MP, nous observons les voies canoniques et toxicologiques qui ont déjà été mises en évidence chez les sujets parkinsoniens de forme sporadique et porteurs de la mutation LRRK2. Une critique à notre analyse est que ces individus (sporadiques et LRRK2)

sont retrouvés en grand nombre dans les sujets inclus dans l'étude par stades évolutifs (44 parkinsoniens au total dont 18 sporadiques et 9 porteurs de mutation LRRK2). Néanmoins, les résultats sont concordants quand on rajoute d'autres types de MP (parkinsoniens *de novo* et avec mutation d'autres gènes EIF4G1, PRKN ou ATXN2) et semblent témoigner d'une dérégulation robuste de ces voies dans les PBMC de sujets atteints par la MP. Nous avons ainsi mis en évidence une dérégulation au sein des PBMC des voies Ephrin/Rac/RhoA/cytosquelette d'actine/guidage axonal, des voies de l'inflammation, de régulation du cycle cellulaire, de la mort cellulaire (apoptose, p53, mitochondrie), des voies de survie et croissance cellulaire PTEN/PI3K/AKT/mTOR et ERK/MAPK. Ces différentes voies ont récemment été associées à la MP (voir discussion générale en Vème partie du manuscrit).

Enfin, l'objectif principal de cette étude était d'identifier les voies moléculaires précocement dérégulées en utilisant des sujets parkinsoniens *de novo* sans traitement dopaminergique et des sujets porteurs de mutations délétères à un stade présymptomatique (Stade 1). L'analyse des 3 expériences de puces réalisée sur les 2 plateformes Agilent et Illumina nous a permis d'identifier 5 voies communes (Tableau 20). Ces voies semblent particulièrement intéressantes en raison de leur implication potentielle dans la pathogénie de la MP.

(1) La voie AMPK (AMP-activated protein kinase) constitue une voie majeure dans la régulation métabolique stimulant la production d'ATP en réponse à de nombreux stimuli. Elle contrôle le métabolisme glucidique et lipidique, la synthèse protéique et mitochondriale. Elle joue également un rôle dans le contrôle de l'autophagie et de la croissance cellulaire via la voie mTOR. Cette voie AMPK est activée lors d'une exposition au MPTP/MPP+ dans des modèles murins et cellulaires de MP et jouerait un rôle protecteur (Choi *et al.*, 2010). De plus, l'expression de l'alpha-synucléine dans les cellules entériques est sous la dépendance de l'AMPc et de la voie ERK (Paillusson *et al.*, 2010).

(2) La voie de signalisation du cancer pulmonaire à petites cellules implique des altérations des gènes MYC, PTEN, TP53 et RB. Ces différents gènes et leurs produits sont également impliqués dans la MP. En effet, l'expression de la Parkin est régulée par n-Myc (West *et al.*, 2004) et une surexpression de Myc a été observée dans les astrocytes de la SN de sujets parkinsoniens (Ferrer & Blanco, 2000). La voie de signalisation PI3K/AKT est régulée par le gène suppresseur de tumeur PTEN qui est lui-même régulé par DJ-1 (Kim *et al.*, 2005). p53 est une protéine clé dans le contrôle de la mort cellulaire et de l'apoptose dans la MP et son action est modulée par la Parkin (Alves Da Costa *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2011). La phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRb), protéine clé du cycle cellulaire, a été identifiée dans les neurones dopaminergiques de la SN de sujets parkinsoniens (Jordan-Sciutto *et al.*, 2003) et la

voie pRb/E2F du cycle cellulaire est impliquée dans la mort cellulaire de la MP (Höglinger *et al*., 2007).

(3) La protéine EIF2 (eukaryotic initiation factor 2) est impliquée dans la reconnaissance du site d'initiation de la traduction et l'adressage de l'ARNt de la méthionine au ribosome. De plus, LRRK2 est impliquée dans la répression traductionnelle via les micro-ARN et notamment s'associe à l'homologue de drosophile de EIF2C1 (Gehrke *et al*., 2010).

(4) RhoA est un membre de la superfamille des GTPases, qui joue un rôle central dans de nombreux processus biologiques comme l'organisation du cytosquelette d'actine, la dynamique des microtubules, la transcription, le cycle cellulaire et l'adhésion cellulaire. Cette voie de signalisation joue un rôle majeur dans la pathogénie de la MP et notamment est associée à LRRK2 (Chan *et al*., 2011).

(5) Enfin, la signalisation Wnt (Wingless/integration) participe à l'organisation du cytosquelette via RhoA, la transcription via la voie MAPK, l'ubiquitination des protéines et le cycle cellulaire via les β-caténines. De plus, les phosphoprotéines de la famille dishevelled (DVL) interagissent avec le domaine GTPase de LRRK2 et ce sont des protéines régulatrices de la voie Wnt nécessaires au guidage axonal, à la formation des synapses et au maintien des neurones (Sancho *et al*., 2009). Récemment la découverte de mutations au sein du gène VPS35 a également mis en avant cette voie de signalisation en raison de son inhibition en cas de mutations de VPS35, de la perturbation du recyclage des protéines membranaires et du trafic avec les endosomes (George *et al*., 2007 ; Vilariño-Güell *et al*., 2011).

Au total, nous avons identifié pour ces stades cliniques des voies dérégulées qui sont le reflet au niveau des PBMC de la pathogénie de la MP. Certaines de ces voies sont dérégulées dès les stades précoces et pourraient être intéressantes à analyser plus en détail. Ces voies sont impliquées dans la survie, la croissance et la prolifération cellulaire. L'analyse des listes de gènes a permis d'isoler certains gènes (notamment AKT3 et SKP1) qui présentent une dérégulation quel que soit le stade de la maladie et pourraient ainsi être considérés comme des biomarqueurs potentiels à côté de l'expression de l'alpha-synucléine. A noter que SNCA n'est pas retrouvé dérégulé en raison de la présence dans le stade 1 du porteur de la duplication de SNCA qui présente une surexpression.

IV. TRAVAUX COLLABORATIFS

1. Identification d'un nouveau gène EIF4G1 impliqué dans les formes autosomiques dominantes de la MP

Au sein de la cohorte PARKFANORD, 9 familles ont un intérêt particulier car elles présentent une MP de transmission autosomique dominante multi-générationnelle touchant de nombreux individus permettant des analyses de liaison (Farrer *et al*., 2000). Pour 2 de ces familles, une mutation a été identifiée (duplication de SNCA pour la famille P59 (Chartier-Harlin *et al*., 2004) et expansion pathologique de triplets SCA2 pour la famille P19).

Au sein de la famille P30, 10 individus présentent une MP de début tardif (âge moyen 64 ± 10 ans, de 50 à 80 ans). La maladie débute progressivement par un tremblement de repos ou un syndrome akinéto-rigide asymétrique. L'évolution est relativement lente, sans troubles cognitifs proéminents. Le syndrome parkinsonien est dopasensible, mais beaucoup de patients restent longtemps sans traitement ou seulement sous agonistes dopaminergiques. Les individus atteints présentent une déplétion dopaminergique asymétrique à la scintigraphie cérébrale au DaTSCAN.

Après exclusion des gènes connus, une analyse de liaison a été réalisée au sein de cette famille identifiant la région 3q26-27 (θ=0, mLOD=3,01). L'haplotype retrouvé en 3q26-27 est porté par tous les malades. En collaboration avec le Dr Farrer, cette région comportant 159 gènes, a été séquencée chez 3 cousins de la famille P30, permettant d'identifier la mutation faux-sens c.3612G>A (p.R1205H) du gène EIF4G1 (eukaryotic translation initiation factor 4, gamma 1) qui ségrège avec la MP chez tous les membres de la famille (n=10). Cette mutation est absente chez 146 sujets sains issus de notre cohorte et chez 370 sujets témoins nord-américains. La mutation R1205H d'EIF4G1 a été recherchée chez 4708 sujets parkinsoniens et 4050 contrôles issus de plusieurs pays ; elle a été identifiée chez 9 autres malades issus de 7 familles (2 USA, 1 Canada, 1 Irlande, 2 Italie, 1 Tunisie).

D'autres mutations du gène EIF4G1 ont été recherchées chez d'autres sujets par séquençage (95 probants de famille de MP autosomique dominante, 130 cas de DCL définies sur le plan anatomo-pathologique et 185 témoins). Quatre nouvelles mutations faux-sens ont été identifiées chez 4 patients (2 avec une MP et 2 cas avec un profil de DCL à l'autopsie) (c.1505C>T (p.A502V), c.2056G>T (p.G686C), c.3490A>C (p.S1164R) and c.3589C>T (p.R1197W)). Ces 4 variants ont ensuite été génotypés chez 4483 patients parkinsoniens et 3865 contrôles. Les mutations ont été uniquement identifiées chez les malades (A502V pour un cas des Etats-Unis et un cas polonais et G686C pour 2 patients de notre cohorte PARKFANORD appartenant à la famille P141).

La protéine eIF4G1 est requise pour initier notamment la traduction des ARNm codant pour des protéines mitochondriales, de survie et de croissance cellulaire (Figure 26) (Ramirez-Valle *et al*., 2008). En situation de stress, les analyses de co-immunoprécipitation réalisées dans les lignées cellulaires HEK293 transfectées avec eIF4G1 sauvage ou avec les mutations R1205H et A502V montrent que la mutation R1205H perturbe la liaison de eIF4G1 à eIF3e et que la mutation A502V perturbe la liaison de eIF4G1 à eIF4E. Ces 2 mutations altèrent donc la formation du complexe eIF4F. Par ailleurs, la présence de ces mutations rend les cellules plus vulnérables au stress oxydant induit par le traitement par H_2O_2 à l'origine d'une perte du potentiel de membrane mitochondrial.

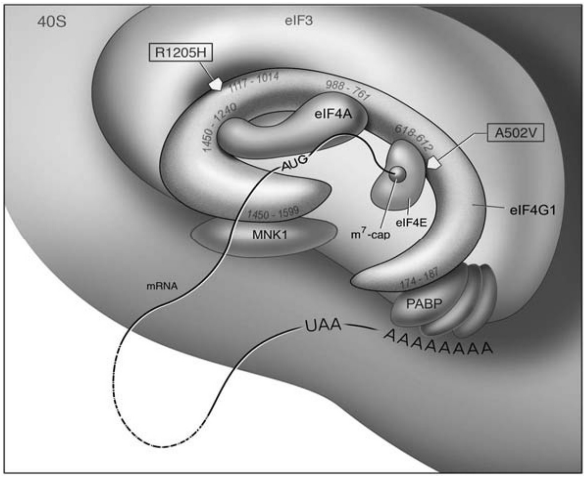


Figure 26 : Représentation schématique d'eIF4G1 au sein du complexe initiant la traduction avec localisation des mutations R1205H et A502V.
La partie N terminale d'eIF4G1 se lie à eIF4E et PAPB (polyadenine binding protein) afin de rendre l'ARNm circulaire. Sa partie centrale se lie à eIF4A qui expose le codon départ AUG.

La disponibilité d'eIF4E est l'étape limitante de l'initiation de la traduction et est déterminée par la phosphorylation des protéines 4E-BP (eIF4E-binding proteins) par la voie mTOR (mechanistic target of rapamycin) (Ramirez-Valle *et al*., 2008). En condition normale, l'activation de la signalisation mTOR entraîne une phosphorylation de 4E-BP qui déplace eIF4E et permet ainsi l'assemblage du complexe eIF4F qui initie la traduction des ARNm (Sonenberg & Hinnebusch, 2009). De façon intéressante, les mutations de LRRK2 provoquent une hyper-phosphorylation de 4E-BP à l'origine d'une résistance moindre au stress oxydant (Gehrke *et al*., 2010). Nos données suggèrent que les mutations A502V et R1205H d'EIF4G1 entraînent une perturbation de l'assemblage du complexe protéique eIF4F et en conséquence la faculté des cellules à répondre rapidement au stress vraisemblablement par perturbation de la traduction de certains ARNm. Ces résultats confortent également l'implication de la traduction et de la voie mTOR/4E-BP dans la pathogénie de la MP.

2. Etude des variants exoniques de LRRK2 et susceptibilité pour la MP

Notre équipe fait partie du consortium GEO-PD (Genetic Epidemiology Of Parkinson's Disease) financé par la fondation Michael J Fox et contribue ainsi à des études sur l'épidémiologie génétique de la MP.

Dans le cadre d'une étude internationale cas-témoins étudiant la fréquence et l'effet pathogène de 121 variants exoniques du gène LRRK2 dans 3 ethnies (Caucasiens, Asiatiques et Maghrébins), nous avons fourni les données cliniques et les échantillons d'ADN de 581 patients parkinsoniens et de 145 témoins sains. Nous avons vérifié les données cliniques de chaque sujet pour s'assurer que le diagnostic retenu lors de l'évolution était bien celui d'une MP probable.

Notre cohorte a été incluse au sein des 8611 patients et des 6929 contrôles de l'étude. L'ensemble des variants polymorphiques a été génotypé sur la plateforme Sequenom MassArray iPLEX. Parmi les 121 variants analysés, 48 n'ont pas été observés dans la population dont 4 des 7 mutations pathogènes reconnues (N1437H, R1441G, Y1699C, I2020T) illustrant leur rareté. Une nouvelle association avec la MP a été trouvée pour 2 variants (M1646T en population caucasienne et A419V en population asiatique). De plus, un haplotype protecteur (N551K-R1398H-K1423K) a été observé avec une fréquence >5% dans les 3 populations. Cette étude a démontré que le seul gène LRRK2 présente un grand nombre de variants qui confèrent une susceptibilité pour la MP dans diverses populations. De plus, les variations génétiques de LRRK2 peuvent avoir des effets indépendants sur le risque de développer la maladie. Ces résultats indiquent que LRRK2 est important dans la pathogénie de la MP dans un nombre de cas plus important que prévu.

3. Polymorphismes de SNCA et MAPT et susceptibilité pour la MP

Dans le cadre du consortium du GEO-PD, notre équipe a participé à une autre étude cas-témoins d'épidémiologie génétique de la MP. Notre groupe a fourni les informations cliniques et les échantillons d'ADN pour 563 sujets parkinsoniens et 143 contrôles. Nous avons vérifié les données cliniques de chaque sujet pour s'assurer que le diagnostic retenu lors de l'évolution était bien celui d'une MP probable.

Ces sujets ont été inclus parmi les 5302 cas et 4161 témoins de l'étude visant à étudier les effets de polymorphismes de SNCA et MAPT dans la MP.

Quatre polymorphismes (SNP) de SNCA (rs2583988, rs181489, rs356219, rs11931074) et 2 de MAPT (rs1052553, rs242557) ont été génotypés chez l'ensemble des participants. Les SNP de SNCA et l'haplotype H1 de MAPT (rs1052553) sont significativement associés avec la MP après ajustement pour comparaisons multiples. Pour SNCA, les associations les plus fortes sont observées pour les SNP situés en 3'. En revanche, il n'a pas été mis en évidence d'effet associatif cumulé entre la MP d'un part et les SNP de SNCA et MAPT d'autre part, indiquant un effet indépendant de ces 2 gènes sans effet conjoint.

V. DISCUSSION GENERALE

Dans ce travail, nous avons principalement utilisé la technique d'analyse transcriptomique par micro-puces dans les cellules mononucléées périphériques de sujets porteurs d'une MP sporadique ou génétiquement déterminée. Cette technique nous a permis d'identifier un profil d'expression génique associé à la maladie décelable au niveau périphérique et en grande partie comparable aux données issues des études cérébrales humaines et de modèles expérimentaux. Nous avons ainsi obtenu des listes de gènes et des voies moléculaires dérégulés, dont certains associés directement à la pathogénie de la maladie ou des gènes étudiés.

1. Les PBMC comme modèle d'étude de la MP

Nous avons utilisé une approche transcriptomique à partir des PBMC de sujets parkinsoniens recueillis par une simple prise de sang. Les PBMC sont impliquées dans la pathogénie de la MP en raison de leur infiltration dans la substance noire (SN) (Miklossy *et al.*, 2006 ; Brochard *et al.*, 2009). Par ailleurs, elles expriment des marqueurs du métabolisme dopaminergique comme le transporteur de la dopamine et la tyrosine hydroxylase (Amenta *et al.*, 2001), des anomalies du système ubiquitine-protéasome (Blandini *et al.*, 2006 ; Ullrich *et al.*, 2010) ainsi que des perturbations mitochondriales (Shinde & Pasupathy, 2006). Cette analyse du transcriptome des PBMC a été réalisée dans d'autres maladies notamment neurologiques (comme la maladie d'Alzheimer, la sclérose en plaques, la neurofibromatose,…) permettant également d'identifier des gènes, fonctions et voies moléculaires impliqués dans la maladie étudiée (Bomprezzi *et al.*, 2003 ; Tang *et al.*, 2004 ; Maes *et al.*, 2007).

L'intérêt de l'étude de ces cellules est qu'elles sont accessibles du vivant du patient à la différence de la SN. De nombreuses études se sont intéressées au profil d'expression génique de la SN de parkinsoniens (Grünblatt *et al.*, 2004 ; Mandel *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2005 ; Hauser *et al.*, 2005 ; Duke *et al.*, 2006 ; Miller *et al.*, 2006), qui est la structure classiquement impliquée, mais qui n'est pas la première à dégénérer (Braak *et al.*, 2003). Cette approche permet de recueillir des informations chez des sujets dont le diagnostic de MP est certain grâce à l'étude neuropathologique. Néanmoins, ces études sont réalisées *post-mortem* et le tissu cérébral prélevé peut être endommagé selon le délai de recueil après le décès, mais également selon la cause du décès. Par ailleurs, ces études sont réalisées chez des sujets au stade tardif ou terminal de leur maladie et donc ne reflètent pas les mécanismes précoces de la neurodégénérescence.

D'autres études transcriptomiques ont été réalisées dans des modèles expérimentaux de MP comme des lignées cellulaires de neuroblastome humain de type SH-SY5Y exprimant ou invalidées pour SNCA et LRRK2 (Häbig *et al.*, 2008 ; Häbig *et al.*, 2009). Ces analyses ont également identifié des perturbations de voies associées au rôle de ces gènes. Néanmoins, ces

résultats nécessitent d'être interprétés avec prudence. En effet, ces lignées cellulaires sont des cellules cancéreuses où les voies de signalisation de survie et croissance cellulaires sont altérées, comme c'est le cas également pour les cellules lymphocytaires humaines transformées par l'EBV (Lee *et al.*, 2010). Des études transcriptomiques ont également été réalisées dans les modèles expérimentaux animaux de MP, que ce soit des modèles toxiques (MPTP, 6-OHDA) ou des modèles génétiques (surexpression des gènes humains contenant ou non une mutation pathogène, invalidation par knock-out) (Miller *et al.*, 2004 ; Bassilana *et al.*, 2005 ; Miller *et al.*, 2007 ; Häbig *et al.*, 2009). Ces études ont également permis d'identifier des voies moléculaires associées à la MP et ses déterminants. Néanmoins, les modèles animaux ne rendent pas compte de toutes les caractéristiques cliniques et neuropathologiques de la MP. Par ailleurs, tous les gènes humains n'ont pas d'homologues dans les modèles animaux et la machinerie cellulaire de certains modèles n'a pas toute la complexité des cellules humaines.

L'étude des PBMC humains nous permet d'avoir accès à des cellules impliquées dans la pathogénie de la maladie, ce d'autant que des voies impliquées dans les réactions inflammatoires, immunitaires et d'extravasation leucocytaire sont dérégulées chez les sujets parkinsoniens sporadiques, porteurs de la mutation G2019S de LRRK2, de duplication de SNCA et de mutation SCA2. Néanmoins, peut se poser la question de savoir si l'identification d'une régulation du système immunitaire et des voies l'inflammation dans les PBMC est uniquement le fait de l'étude de ce type cellulaire ou si elle est associée à la maladie (Greene, 2011). En effet, l'implication des voies de l'inflammation a également été mise en évidence dans les PBMC de sujets parkinsoniens (Scherzer *et al.*, 2007 ; Soreq *et al.*, 2008). Cependant, ces voies sont aussi dérégulées dans les études transcriptomiques d'échantillons cérébraux humains et de modèles cellulaires et animaux confirmant leur dérégulation dans la pathogénie de la MP (Grünblatt *et al.*, 2004 ; Miller *et al.*, 2007 ; Häbig *et al.*, 2008 ; Moran & Graeber, 2008 ; Ohnuki *et al.*, 2010 ; Vanbesien-Mailliot *et al.*, communication écrite, 2011). Pour aller plus loin dans l'étude des PBMC dans la MP, il serait intéressant d'étudier les sous-types cellulaires les plus impliqués que sont les lymphocytes T CD4+ et CD8+ (Brochard *et al.*, 2009) et voire même les lymphocytes T CD4+ CD25+ qui auraient une effet protecteur, mais qui sont en faible nombre dans le sang des sujets parkinsoniens rendant leur étude transcriptomique délicate (Baba *et al.*, 2005 ; Reynolds *et al.*, 2007).

Les PBMC nous apparaissent comme un modèle d'étude prometteur de la MP. Il doit être confirmé par d'autres modèles, comme nous l'avons fait avec les études de transcriptome issues de la SN de parkinsoniens ou de modèles cellulaires et animaux de MP. D'autres tissus et cellules issus de sujets parkinsoniens apparaissent intéressants. Parmi les échantillons cérébraux, en raison de la dégénérescence hétérogène au sein de la SN, certains auteurs ont réalisé une étude

transcriptomique à partir des neurones dopaminergiques recueillis par microdissection laser pour y identifier des voies spécifiquement dérégulées (Cantitu-Castelvetri *et al*., 2007 ; Simunovic *et al*., 2009). Néanmoins, ces analyses ne peuvent être réalisées que sur des prélèvements autopsiques et ne reflètent donc que des phénomènes tardifs. D'autres tissus semblent plus intéressants comme les terminaisons nerveuses du derme et le système nerveux entérique qui présente des altérations dès le début de la maladie et qui serait ainsi une fenêtre ouverte sur des mécanismes précoces étudiés *in vivo* (Ikemura *et al*., 2008 ; Lebouvier *et al*., 2010). Récemment, le développement de lignées de cellules souches pluripotentes différentiables en neurones issues de fibroblastes ou de la muqueuse olfactive de sujets parkinsoniens avec ou sans mutation génétique a ouvert la voie vers d'autres types cellulaires particulièrement intéressants notamment pour de nouvelles études transcriptomiques (Devine *et al*., 2011 ; Matigian *et al*., 2010 ; Soldner *et al*., 2011).

2. Intérêts et limites de l'étude du transcriptome

Le développement de stratégies thérapeutiques modifiant le cours évolutif de la maladie nécessite une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine de la MP. La majorité des études fondamentales sont sous-tendues par une approche de type 'mécanisme-candidat' s'attachant à approfondir nos connaissances sur des mécanismes déjà identifiés. L'identification de nouveaux mécanismes pathogéniques est néanmoins nécessaire pour envisager de nouvelles hypothèses sur les événements concourant à la mort neuronale. Le développement de techniques plus globales comme l'étude du profil d'expression génique (transcriptome) permet de proposer de nouvelles hypothèses en raison d'une approche globale et sans *a priori* du fonctionnement d'un type cellulaire ou tissulaire lors d'une circonstance pathologique donnée. Cette technique, grâce à l'utilisation de puces représentant un grand nombre de transcrits du génome, permet d'identifier les gènes, fonctions et voies métaboliques dérégulés par comparaison avec des témoins en mesurant l'intensité relative de chaque sonde déposée sur une lame de verre.

2.1 Considérations techniques

L'étude du transcriptome est à l'origine d'un grand nombre d'informations qui nécessitent un traitement bioinformatique adéquat mais également de nombreux contrôles de qualité. En effet, de nombreux paramètres entrent en ligne pour juger de la validité des résultats. Tout d'abord, l'ARN utilisé doit être de qualité correcte ; nous avons choisi de ne retenir que les ARN ayant un RIN (RNA integrity number) >9 dans nos expériences pour limiter la dégradation et donc les données aberrantes. De plus, le temps après le prélèvement sanguin pour procéder au recueil des

PBMC joue aussi sur la qualité de l'ARN et sur l'expression génique (Baechler *et al.*, 2004). La majorité des prélèvements a été traitée dans l'heure ayant suivie leur recueil sauf dans de rares cas où nous nous sommes déplacés dans la région Nord-Pas de Calais ou en France pour obtenir les échantillons (notamment pour les sujets avec mutation, délai <6h). Toutes les étapes expérimentales (extraction de l'ARN, marquage, hybridation, lecture des spots) peuvent entraîner des biais et nécessitent des contrôles ; comme le sont les 'spike-in' qui sont des ARN servant de contrôles lors des étapes de marquage et d'hybridation (Yang, 2006). L'analyse des données nécessite au préalable une normalisation des intensités de fluorescence au sein de chaque puce et entre les différentes puces afin de pallier à certains biais expérimentaux. Le choix des témoins est également capital pour interpréter les données. Dans nos expériences, en plus des témoins individuels, nous avons utilisé un assemblage d'ARN équimolaire nous servant ainsi de référence entre les expériences de puces et de RT-PCR en temps réel et pour limiter la variabilité des contrôles. En effet, il existe une variabilité importante entre les sujets comme nous avons pu l'observer sur les analyses en composantes principales pour les expériences LRRK2 et SCA2 où les sujets du groupe témoin présentent un nuage de points plus vaste que les sujets porteurs de mutation (Figures 13 et 24) (Storey *et al.*, 2007).

L'analyse des données a été réalisée grâce au logiciel Genespring GX qui permet d'identifier les gènes significativement dérégulés au sein des différents groupes étudiés. Nous avons utilisé à la fois un test statistique de type t-test de Welch (test paramétrique autorisant les variances inégales) avec ou sans correction pour tests multiples (Benjamini & Hochberg) et une mesure des ratios d'expression (RE) pour chaque sonde. Nous avons choisi des limites pour les RE faibles (entre 1,2 et 1,3) pour ne pas éliminer par excès les gènes, dont la variation d'expression était peu importante, comme c'est le cas pour les facteurs de transcription ou les autres gènes vitaux au fonctionnement cellulaire, dont on peut supposer qu'une forte dérégulation serait létale pour la cellule. L'amélioration de la technique de bio-puces a permis à d'autres équipes de choisir également des RE faibles (Scherzer *et al.*, 2007 ; Ohnuki *et al.*, 2010). Le logiciel Genespring a également été utilisé pour réaliser les analyses en composante principale permettant de déterminer si la liste de gènes dérégulés pouvait séparer les individus sans *a priori*. Enfin, l'interprétation des résultats a principalement utilisé le logiciel IPA qui permet d'identifier au sein d'une liste de gènes, les fonctions, réseaux moléculaires et voies canoniques impliqués. D'autres logiciels existent comme DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; Dennis *et al.*, 2003) ou WebGestalt (Web-based Gene Set Analysis Toolkit; http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt). Cependant, l'avantage d'IPA est qu'il génère des réseaux moléculaires à partir de la connectivité entre les gènes présents dans sa base de

données, qu'il donne accès aux références bibliographiques ayant permis d'identifier ces liens et qu'il présente les résultats des analyses sous un format agréable.

2.2 Validation des données transcriptomiques

Les résultats des études du transcriptome par puces d'expression nécessitent d'être validés par une seconde technologie. Nous avons d'abord validé l'expression de certains gènes d'intérêt significativement dérégulés par RT-PCR en temps réel, méthode largement utilisée et gold standard pour les mesures d'expression génique (Wang *et al.*, 2006). Cette seconde technique permet d'établir une corrélation avec les ratios d'expression issus des puces. Néanmoins, cette corrélation n'est pas parfaite tant en sens de variation (sur ou sous-expression) que sur les niveaux des ratios. Les données de la littérature estiment qu'une corrélation est correcte si elle est supérieure à 0,8 pour des ratios d'expression d'au moins 1,4 (Morey *et al.*, 2006). Cette technique nécessite également une normalisation avec un ou plusieurs gènes de ménage dont l'expression est stable pour les différents individus et un choix des amorces de PCR idéalement à proximité de la sonde de micro-puces (Etienne *et al.*, 2004). Nous avons ainsi pu valider l'expression des isoformes de SNCA par cette technique. La validation par RT-PCR en temps réel nécessite un temps expérimental important en raison des mises au point et doit être renouvelée pour chaque analyse identifiant d'autres gènes d'intérêt. Par ailleurs, le choix de quelques gènes, dont l'expression est validée en RT-PCR en temps réel, apporte moins d'informations sur la pathogénie de la maladie que les aspects fonctionnels issus des voies métaboliques dérégulées.

C'est pourquoi par la suite nous avons décidé de valider les données de la plateforme Agilent par une autre plateforme de puces Illumina. Dans les différentes expériences ayant utilisées les 2 plateformes (études duplication SNCA, expansion SCA2 et stades cliniques), les pourcentages de gènes dérégulés communs entre les 2 plateformes étaient faibles (entre 11 et 27%) ; en particulier pour l'analyse des sujets SCA2 parkinsoniens ce qui pourrait expliquer la moins bonne concordance des voies canoniques entre les 2 plateformes (Paragraphe 4.3.2.2). De plus, les sens de variation des ratios d'expression peuvent être opposés (par exemple, concordance pour 78% des 373 gènes communs entre les plateformes Agilent et Illumina pour l'analyse du transcriptome du sujet dupliqué P59/04, Paragraphe 3.2.2). Ces données indiquent que la concordance entre les plateformes n'est pas parfaite, mais ces chiffres ont déjà été évoqués dans la littérature. En effet, les pourcentages des gènes dérégulés communs entre les plateformes (Affymetrix, Agilent, Illumina, Applied Biosystems et GE Healthcare) évoluent entre 9 et 34% alors que les fonctions et voies métaboliques dérégulées se recoupent dans 47 à 70% des cas dans une analyse par le logiciel IPA réalisée à partir des échantillons du projet MAQC (MicroArray Quality Control ; Shi

et al., 2006). De même, la concordance entre les listes de gènes générées par les plateformes Affymetrix, Agilent et Illumina est en moyenne de 22,8% (Cheadle *et al*., 2007). Ces auteurs concluent donc sur l'intérêt d'utiliser des plateformes différentes apportant des informations sur la fonctionnalité et non pas uniquement sur les listes de gènes dérégulés (Li *et al*., 2009). De plus, les différentes plateformes apportent des visions complémentaires des processus biologiques impliqués et permettent ainsi d'identifier des différences plus subtiles dans l'expression des gènes (Pedotti *et al*., 2008). Ces données nous ont confortés dans le choix d'une seconde plateforme pour la validation des puces Agilent. Toutefois, elles nous incitent à la prudence dans l'interprétation des résultats. La plateforme Illumina nous semble de qualité moindre en raison d'une concordance moins bonne entre les sens de variations des ratios d'expression (sur et sous-expression) pour les transcrits représentés par plusieurs sondes (par exemple, concordance de 64% pour Illumina *versus* 90% pour Agilent dans l'expérience SCA2 et 81% *versus* 94% dans l'expérience portant sur le dupliqué SNCA). De plus, hormis pour cette dernière expérience qui comportait de réels réplicats biologiques (ARN du sujet P59/04 déposé sur 3 puces différentes), aucune autre analyse réalisée avec les puces Illumina ne permettait d'obtenir des gènes significativement dérégulés en appliquant une correction pour tests multiples de Benjamini & Hochberg ce qui indique une plus grande variabilité des résultats obtenus que sur la plateforme Agilent. De plus, il a été montré une moins bonne corrélation entre les résultats des puces Illumina et les RT-PCR en temps réel utilisant le SYBR® Green (Arikawa *et al*., 2008). Néanmoins, les puces Illumina présentent l'avantage d'utiliser une technique d'hybridation différente et de comporter des sondes représentant des ARN non codants comme les miRNA. Ainsi, l'utilisation de 2 plateformes permet d'obtenir des résultats plus exhaustifs sur le même processus biologique.

Au total, toutes ces données nous poussent envisager l'analyse du transcriptome comme une technique intéressante pour identifier des fonctions et voies métaboliques dérégulées, mais qu'elle ne peut être suffisante à elle seule pour identifier des biomarqueurs de la maladie qui nécessitent des tests plus stricts et d'autres techniques.

3. Apport du transcriptome des PBMC des formes sporadiques et génétiques de MP

3.1 Stade précoce de la maladie

3.1.1 Sujets à un stade précoce

L'intérêt majeur de l'étude transcriptomique des PBMC est qu'elle peut s'adresser à des sujets à différents stades de la MP et notamment à un stade précoce comme chez les sujets *de novo,* mais également à un stade pré-moteur voire préclinique chez les sujets porteurs de mutation. De tels sujets ont été inclus dans nos différentes analyses, comme un sujet asymptomatique âgé de 23 ans porteur de la mutation G2019S de LRRK2 et un sujet porteur d'une expansion de triplets du gène ATXN2 ne présentant qu'une discrète akinésie. Nous avons démontré que ces sujets présentaient le même profil d'expression génique que les sujets ayant une MP probable puisqu'ils étaient classés parmi les malades lors des ACP (Figures 13 et 24). De plus, le sujet porteur de la duplication de SNCA était à un stade précoce de la maladie, puisqu'elle présentait une dénervation dopaminergique à la scintigraphie au DaTSCAN alors que le diagnostic de MP n'était pas encore posé. Le profil d'expression génique des PBMC de ce sujet a montré une dérégulation de l'expression de voies cellulaires associées au gène SNCA.

L'étude des stades précoces de la maladie chez l'Homme pourrait permettre d'identifier des mécanismes moléculaires supposés précoces dans la neurodégénérescence. Notre étude du transcriptome des PBMC selon différents stades de la maladie nous a permis d'identifier 5 voies moléculaires communes précocement dérégulées chez des parkinsoniens *de novo* et des porteurs de mutation à un stade préclinique. Nous avons pu discuter l'impact potentiel de ces 5 voies (signalisations AMPK, cancer pulmonaire à petites cellules, EI2F, RhoA et Wnt/β-caténine) dans la MP. Une autre façon de s'intéresser au stade préclinique de la MP est de réaliser des analyses transcriptomiques sur des échantillons cérébraux présentant des corps de Lewy incidents (incidental Lewy pathology). Ce concept vient de la constatation que 5 à 20% des sujets sains présentent des corps de Lewy à l'autopsie avec une distribution évoquant celle décrite par Braak pour la MP (Gibb & Lees, 1988 ; Braak *et al*., 2003). Il a été suggéré que la présence de CL incidents correspondrait à un stade préclinique de la MP. En effet, ces sujets présentent une diminution de l'activité de la tyrosine hydroxylase (TH) et du vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) au sein du striatum corrélée avec la perte neuronale nigrée (DelleDonne *et al*., 2008). Cette diminution d'activité est moindre (33 et 42%, respectivement) que dans les cerveaux de MP (73 et 96%, respectivement). A notre connaissance, une seule étude transcriptomique a été

réalisée chez de tels sujets (Zheng *et al.*, 2010). Ces auteurs ont constaté que les voies issues des gènes dérégulés à partir de la substance noire de sujets avec CL incidents étaient comparables avec celles des sujets parkinsoniens et comprenaient notamment les voies mitochondriales et de la phosphorylation oxydative. D'autres études nous semblent nécessaires comparant les données issues de la SN de sujets CL incidents à celles des PBMC des sujets à un stade pré-symptomatique de la maladie. Ces analyses pourraient permettre d'identifier des voies moléculaires précocement impliquées dans la MP et sur lesquelles de nouveaux agents thérapeutiques pourraient agir.

Enfin, la découverte de la présence de dépôts d'alpha-synucléine dans d'autres tissus ouvre de nouvelles perspectives dans l'étude des mécanismes précoces de la maladie (Ikemura *et al.*, 2008 ; Lebouvier *et al.*, 2010). Ces tissus (système nerveux cutané et entérique) sont accessibles du vivant du patient pour des analyses transcriptomiques et pourraient livrer d'autres informations sur la pathogénie de la MP qui est désormais considérée comme une maladie systémique. Une comparaison avec les données issues des PBMC permettrait d'identifier les dérèglements moléculaires présents en périphérie.

3.1.2 Marqueurs de la maladie

Les analyses transcriptomiques permettent d'identifier avec une bonne concordance des voies moléculaires dérégulées. En revanche, l'identification de gènes isolés est plus sujette à caution. En effet, les différentes études cérébrales n'ont pas permis d'identifier de gènes communs à toutes les analyses (Sutherland *et al.*, 2009). De plus, au niveau des PBMC, seuls 2 gènes (AKT3 et SKP1) sont significativement surexprimés dans les 3 stades de la maladie que nous avons définis. L'analyse du transcriptome ne doit pas être la seule technique à utiliser pour identifier des biomarqueurs de la maladie. Néanmoins, l'analyse des listes de gènes a mis en avant un dérèglement de certains gènes qui pourrait être relié aux modifications induites par la maladie dans les PBMC. En particulier, une sous-expression de SNCA et de ses isoformes a été notée chez l'ensemble des sujets parkinsoniens étudiés (forme sporadique, mutations des gènes LRRK2 et ATXN2), à l'exception du porteur de duplication de SNCA. Une analyse des données brutes des puces Agilent a également retrouvé cette sous-expression chez les sujets porteurs de mutation d'EIF4G1 (ratio d'expression de 0,42 et 0,41 avec les témoins pour les 2 sondes). Hormis chez le sujet dupliqué, la sous-expression de SNCA apparaît comme un marqueur de la maladie identifiable dans les PBMC. Cette sous-expression est également retrouvée dans d'autres puces de PBMC d-e parkinsoniens (Scherzer *et al.*, 2007). L'analyse de ces puces réalisée par la suite (ratio d'expression >1,5 et ANOVA $p<0,05$) a identifié 4 autres gènes significativement

dérégulés entre les sujets parkinsoniens et les témoins sains (Soreq *et al.*, 2008). De façon intéressante, deux d'entre eux (ALAS2 et SELENBP1) font partie des gènes dont nous avions validé l'expression par RT-PCR en temps réel pour l'étude sur les sujets LRRK2. Le troisième gène ST13 (suppression of tumorigenicity 13) a été proposé par Scherzer et collaborateurs comme biomarqueur de la MP. L'expression du 4ème gène (RPS4Y1, Ribosomal protein S4, Y-linked 1) n'est pas analysable, car il n'est exprimé que chez les individus masculins. Nous avons donc regardé l'expression de ces gènes dans nos différentes listes de gènes dérégulés. Les gènes ALAS2 et SELENBP1 présentent une sous-expression chez les parkinsoniens de forme sporadique, avec mutation LRRK2, ATXN2 et duplication de SNCA (liste sans correction de Benjamini & Hochberg pour cette dernière forme). Ils sont également sous-exprimés dans la liste commune des stades cliniques. Le gène ST13 est sous-exprimé uniquement chez les sujets de forme sporadique et porteurs de mutation LRRK2. La dérégulation de l'expression de ces gènes semble donc être la conséquence de la maladie identifiable au niveau des PBMC. Il serait intéressant de mesurer l'expression de ces gènes dans d'autres populations comportant un syndrome parkinsonien dégénératif (type AMS ou PSP) pour vérifier que ces perturbations soient spécifiques de la MP.

3.2 Voies moléculaires associées à la pathogénie de la MP

L'étude du transcriptome des PBMC nous a permis d'identifier des voies moléculaires dérégulées associées à la MP et également à la pathogénie des différents gènes étudiés. De plus, ces voies sont également retrouvées dans la littérature. Depuis nos premières études, plusieurs synthèses des voies moléculaires issues d'analyses transcriptomiques à partir de la SN de sujets parkinsoniens sont parues (Sutherland *et al.*, 2009 ; Zheng *et al.*, 2010 ; Greene, 2011). De façon intéressante, nos résultats issus des PBMC sont comparables avec ces résultats. La synthèse réalisée par Greene a regroupé les voies moléculaires à partir de 9 études transcriptomiques issues de la SN (Bossers *et al.*, 2009 ; Duke *et al.*, 2006 ; Grünblatt *et al.*, 2007 ; Hauser *et al.*, 2005 ; Miller *et al.*, 2006 ; Papapetropoulos *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2005) et de neurones dopaminergiques de la SN obtenus par microdissection laser (Cantuti-Castelvetri *et al.*, 2007 ; Simunovic *et al.*, 2009) (Tableau 22) et a mis en avant les voies classiquement impliquées dans la MP.

Tableau 22 : Voies moléculaires dérégulées représentées dans les études du transcriptome de SN de parkinsoniens d'après Greene, 2011.

Voies moléculaires
Mitochondrie/chaîne respiratoire
Dégradation des protéines
Transmission synaptique/axones/trafic vésiculaire
Signalisation cellulaire/transduction du signal
Signalisation dopaminergique
Apoptose/mort cellulaire
Facteurs neurotrophiques

Par ailleurs, une méta-analyse des données de puces de SN réalisées sur la plateforme Affymetrix (Hauser *et al*., 2005 ; Moran *et al*., 2006 ; Zhang *et al*., 2005 ; Lesnick *et al*., 2007) a également identifié grâce au logiciel IPA des voies canoniques communes avec nos données issues des PBMC (Sutherland *et al*., 2009). Ces mêmes auteurs ont également ré-analysé les résultats des puces issus d'échantillons cérébraux hors de la SN (Zhang *et al*., 2005 ; Moran *et al*., 2006 ; Vogt *et al*., 2006) et issus de PBMC (Scherzer *et al*., 2007) par le logiciel IPA. Dans cette méta-analyse, il n'a pas été trouvé de gènes dérégulés communs entre les différentes données de puces confirmant ainsi la complexité de la MP et l'hétérogénéité des échantillons et des plateformes. En revanche, les voies de signalisation issues des listes de gènes dérégulés offrent plus de similarités. De façon particulièrement intéressante, nos données issues des différentes analyses des PBMC présentent de grandes similarités (Tableau 23).

En effet, un nombre important de ces voies a été identifié chez les sujets parkinsoniens de forme sporadique et porteurs de mutations (LRRK2 et SCA2) et également dans l'étude des stades cliniques. En revanche, aucune de ces voies n'est commune avec celles du sujet porteur de la duplication du locus SNCA, confirmant à nouveau sa spécificité. Ces analyses démontrent que les PBMC présentent effectivement une dérégulation des principales voies métaboliques et cellulaires identifiées au niveau cérébral à l'exception de la voie de signalisation dopaminergique. Même si les PBMC expriment les marqueurs du métabolisme dopaminergique, ils ne présentent pas de modifications d'expression de ces gènes, n'étant pas dans le contexte cellulaire cérébral. De plus, l'étude transcriptomique à partir des cellules dopaminergiques de la SN n'a pas non plus trouvé de dérégulation de l'expression de ces marqueurs dopaminergiques tels TH (tyrosine hydroxylase), DAT (transporteur dopamine) et DDC (dopa decarboxylase) (Simunovic *et al*., 2009). La voie IL-2 n'est pas retrouvée dans les PBMC, mais de nombreuses autres voies impliquant des interleukines le sont (IL-10, IL-15, IL-17 et IL-22 dans les stades cliniques, IL-4, IL-6 et IL-10 chez les sujets LRRK2, IL-4 chez les sujets SCA2 et IL-8 chez le dupliqué SNCA).

Tableau 23 : Comparaison entre nos données de transcriptome de PBMC avec la méta-analyse des échantillons cérébraux par le logiciel IPA d'après Sutherland *et al.*, 2009.
Les voies indiquées sont retrouvées dans les échantillons de SN sauf pour # uniquement dans le tissu cérébral hors SN. Les voies marquées de * sont en plus retrouvées dans le tissu cérébral hors SN. La colonne PBMC correspond aux voies retrouvées dans nos analyses avec LRRK2, SCA2C, SCA2P pour l'analyse des sujets porteurs de mutations LRRK2, SCA2 forme cérébelleuse et parkinsonienne respectivement, SPO pour les sujets sporadiques et STADES pour l'analyse des stades cliniques.

Voies moléculaires	**PBMC**
Signalisation ERK/MAPK*	SCA2P/SCA2C
Signalisation récepteur dopamine	
Signalisation IGF-1*	LRRK2/SPO/SCA2P
Signalisation PTEN*	STADES
Signalisation JAK/STAT*	LRRK2/SPO
Signalisation récepteur glucocorticoïdes	STADES
Signalisation maladie de Huntington	STADES
Signalisation PPAR	LRRK2/SPO
Signalisation récepteur ephrin*	STADES
Signalisation VEGF*	SCA2P/STADES
Signalisation guidage axonal*	STADES/LRRK2/SCA2P
Signalisation PI3K/AKT	STADES
Signalisation récepteur insuline	STADES
Signalisation BMP	STADES
Dépression synaptique à long terme	
Signalisation PDGF	SCA2C
Potentialisation synaptique à long terme*	SCA2C
Signalisation récepteur cellules B	STADES
Dégradation lysine	
Signalisation récepteur œstrogènes	LRRK2/SPO
Signalisation récepteur couplé aux protéines G	
Métabolisme inositol phosphate	SCA2C
Signalisation IL-2	
Signalisation calcique #	LRRK2

Un grand nombre de ces voies (Signalisation IGF-1, PTEN, JAK/STAT, récepteur glucocorticoïdes, récepteur ephrin, VEGF, guidage axonal, BMP, PDGF, récepteurs cellules B, récepteur œstrogènes, récepteur couplé aux protéines G et IL-2) communes entre le transcriptome cérébral et des PBMC, font intervenir les voies de signalisation cellulaire ERK/MAPK et PI3K/AKT qui sont ainsi des voies pivots dérégulées chez les parkinsoniens. Ces voies seront discutées dans un paragraphe ultérieur. Certaines de ces voies méritent un commentaire particulier.

Tout d'abord, une dérégulation des voies de l'inflammation et de l'immunité est à nouveau mise en évidence dans cette méta-analyse confirmant les données des PBMC et validant leur rôle dans la MP. Il est intéressant de constater que les voies des récepteurs aux glucocorticoïdes et PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) sont perturbées chez les parkinsoniens. Ces résultats confirment des données expérimentales impliquant ces voies dans la MP avec notamment la régulation de la dégénérescence des neurones dopaminergiques par les récepteurs aux glucocorticoïdes de la microglie (Ros-Bernal *et al*., 2011) et l'augmentation de l'expression de ces récepteurs lors de la surexpression d'alpha-synucléine induisant l'apoptose (Kim *et al*., 2004). De même, la modulation des récepteurs PPAR a démontré un effet neuroprotecteur sur des modèles expérimentaux de MP (Iwashita *et al*., 2007) et les sujets avec mutation de la Parkin présentent une surexpression de PGC-1α (PPAR gamma-coactivator 1 alpha) qui stimule la biogénèse mitochondriale (Pacelli *et al*., 2011). Les gènes contrôlant la chaîne respiratoire mitochondriale exprimés sous la dépendance de PGC-1α sont sous-exprimés dans une autre étude ré-analysant les données des puces de SN de parkinsoniens (Zheng *et al*., 2010). Toutes ces données incitent à nous intéresser aux molécules pharmacologiques modulant ces 2 voies que sont les anti-inflammatoires et les statines qui sont de potentiels agents modifiant le cours évolutif de la maladie même si à ce jour, les études ne l'ont pas démontré (Asanuma & Miyazaki, 2007 ; Chaturvedi & Beal, 2008 ; Mutez *et al*., 2009).

La voie de signalisation guidage axonal est l'une des voies les plus représentées dans la méta-analyse de l'équipe de Sutherland, tout comme dans nos différentes expériences (Tableau 23). D'autres études de transcriptomique ou de GWAS ont retrouvé ces données (Papapetropoulos *et al*., 2006 ; Lesnick *et al*., 2007 ; Bossers *et al*., 2009). De plus, une étude a intégré les résultats de puces d'expression cérébrale avec les résultats de GWAS et a identifié la voie de guidage axonal comme la plus représentée (Edwards *et al*., 2011). Le guidage axonal représente le processus par lequel les axones en croissance vont suivre un chemin déterminé vers leur cible. Ce processus est sous la dépendance de 4 classes de ligands (ephrin, netrin, semaphorin et slit) qui, par activation de leurs récepteurs respectifs, vont entraîner une activation d'une cascade de signalisation cellulaire à partir de Rho GTPases. Nous avons identifié une dérégulation de l'expression de certains de ces gènes en particulier EFNA2 (ephrin-A2), EPHA3 (EPH receptor A3), SEMA4B (semaphorin 4B), SLIT3 (slit homolog 3) chez les sujets porteurs de mutation LRRK2 (Tableau 24 en Annexe 4). La méta-analyse de Sutherland a également mis en avant la signalisation récepteur ephrin, qui recouvre partiellement la voie de guidage axonal. Il reste maintenant à élucider si la dérégulation de l'expression des gènes de la voie guidage axonal dans la MP représente un mécanisme compensatoire ou est la conséquence de la neurodégénérescence. De

même, si on peut difficilement impliquer les PBMC dans ces mécanismes neuro-développementaux, l'expression des gènes composant ces voies est dérégulée dans les PBMC, faisant de ces cellules le reflet de manifestations centrales. Enfin, la signalisation ephrin mériterait d'être plus étudiée dans la MP car elle pourrait comporter des molécules d'intérêt diagnostique ou thérapeutique.

Les voies de signalisation impliquant des facteurs de croissance sont dérégulées tant dans les analyses transcriptomiques cérébrales que dans nos PBMC (Tableau 23). Notamment, la ré-analyse par Sutherland et collaborateurs des données issues des PBMC de Scherzer a identifié la signalisation VEGF comme également dérégulée (Sutherland *et al*., 2009 ; Scherzer *et al*., 2007). Les voies les plus significatives sont celles du VEGF et d'IGF-1. La voie IGF-1 (insulin-like growth factor 1) est l'une des voies d'activation majeure d'AKT et son activation protège de la mort neuronale induite par la surexpression de l'alpha-synucléine ou le MPP+ (Kao, 2009 ; Wang *et al*., 2010). De plus, le taux sérique d'IGF-1 apparait plus élevé chez les sujets parkinsoniens et a été proposé comme marqueur de la maladie y compris chez des sujets parkinsoniens *de novo* et des sujets avec quelques signes moteurs et une hyper-échogénicité de la substance noire (Godau *et al*., 2011). La voie VEGF (vascular endothelial growth factor) présente également un potentiel intérêt thérapeutique puisque l'administration de VEGF protège les neurones dopaminergiques des rats traités à la 6-OHDA (Yasuhara *et al*., 2005). Ces 2 voies sont reliées puisque la voie IGF-1 favorise l'expression du VEGF par activation des voies de signalisation PI3K/AKT et ERK/MAPK (Miele *et al*., 2000). Ces 2 voies ont ainsi été rattachées à la MP et ouvrent une porte vers l'identification de molécules pouvant les moduler et donc agir sur la cours évolutif de la maladie.

Enfin, tous ces résultats concernant des voies cellulaires tant au niveau cérébral qu'au niveau des PBMC posent la question de savoir si la dérégulation de ces voies est un reflet au niveau cellulaire des modifications liées à la MP et aux mutations pathogènes et/ou si elle est la réponse des cellules à la dégénérescence qui essayent de mettre en place des mécanismes compensatoires comme le guidage axonal et les voies des facteurs de croissance. D'autres modèles expérimentaux seront nécessaires pour essayer de répondre à cette question.

3.3 Voies de signalisation cellulaire

3.3.1 Voies de survie, de croissance et de prolifération cellulaire

Dans les analyses que nous avons réalisées et dans nos comparaisons avec les données de la littérature, nous observons une dérégulation des voies de signalisation impliquées dans la survie, la croissance et la prolifération cellulaire (voie PI3K/AKT/mTOR, voies des MAPK et voie Wnt).

3.3.1.1 Lien MP et cancer

De façon intéressante, ces différentes voies sont associées aux processus de cancérisation (Steelman *et al*., 2011). Dans nos listes de voies canoniques, nous observons une dérégulation des voies de ces cancers (mécanismes moléculaires des cancers, cancer de prostate, cancer de l'endomètre, cancer colorectal, cancer du sein, cancer pulmonaire à petites cellules, carcinome rénal, leucémie myéloïde chronique et leucémie aigüe myéloïde). Ce lien entre la MP et le cancer a été souligné dans la littérature, en particulier avec la moindre fréquence des cancers chez les parkinsoniens hormis pour le mélanome et le cancer du sein (D'Amelio *et al*., 2009). La MP et le mélanome présentent une association épidémiologique (Liu *et al*., 2011) et des voies de signalisation dérégulées communes, puisqu'il a été proposé de cibler les voies MAPK et AKT dans les options pour traiter le mélanome (Meier *et al*., 2007 ; Madhunapantula & Robertson, 2011). Les différents gènes associés à la MP peuvent également être reliés au cancer où ils sont anormalement exprimés. Une surexpression d'alpha-synucléine a été mise en évidence dans les cancers colorectaux, les mélanomes, les cancers mammaires et ovariens (Bruening *et al*., 2000 ; Israeli *et al*., 2011 ; Matsuo & Kamitani, 2010 ; Ye *et al*., 2010). Une surexpression de LRRK2 a été notée dans les cancers thyroïdiens et papillaires rénaux (Looyenga *et al*., 2011). Par ailleurs, il semble que la présence de la mutation G2019S de LRRK2 soit associée à une augmentation du risque de cancer (Saunders-Pullman *et al*., 2010). Ce lien entre cancer et mutation de LRRK2 pourrait venir de la phosphorylation de 4E-BP1 par LRRK2 qui module le taux de prolifération cellulaire (Pons *et al*., 2011). Le gène EIF4G1 est surexprimé dans les cancers du nasopharynx et du sein inflammatoire où son taux d'expression est corrélé avec la progression tumorale (Silvera *et al*., 2009 ; Tu *et al*., 2010). Les gènes associés aux formes récessives de la MP sont des gènes suppresseurs de tumeur. Des mutations somatiques de la Parkin ont été retrouvées dans les cellules de glioblastome, de cancer colique et pulmonaire (Veeriah *et al*., 2010). Le gène PINK1 est surexprimé dans le cancer du sein où il module la croissance cellulaire (Berthier *et al*., 2011). Enfin, DJ-1 est un oncogène impliqué dans de nombreux cancers, comme par exemple dans le cancer pulmonaire où il est un marqueur de la résistance au cisplatine (Zeng *et al*., 2011). Toutes ces données confirment l'implication des gènes associés à la MP et au cancer et confortent l'hypothèse d'un chevauchement des voies cellulaires entre neurodégénérescence et cancérisation. Néanmoins, il apparaît surprenant que de mêmes mutations entraînent soit une neurodégénérescence soit un processus de cancérisation comme pour LRRK2 et Parkin. La spécificité du type cellulaire concerné pourrait être une des explications possibles. La présence d'une mutation au sein de cellules vulnérables au stress oxydant comme le sont les neurones dopaminergiques pourrait être à l'origine de la mort neuronale.

3.3.1.2 Lien MP et voies de survie, de prolifération et de croissance cellulaire

Nous avons observé dans les PBMC une dérégulation des voies de survie, prolifération et croissance cellulaire qui sont principalement la voie PI3K/AKT/mTOR, les voies des MAPK et la voie Wnt. Par exemple, chez les sujets de forme sporadique, nous observons une dérégulation des voies PI3K/AKT, ERK/MAPK, JNK et ERK5. Chez les porteurs de mutation LRRK2, nous observons une dérégulation des voies PI3K/AKT, mTOR et Wnt. Chez les sujets parkinsoniens avec mutation SCA2, une dérégulation des voies PI3K/AKT, ERK/MAPK, ERK5 et Wnt. Dans l'étude des stades cliniques, sur la liste des gènes présents à tous les stades, nous observons une dérégulation des voies PI3K/AKT, mTOR, PTEN, ERK5, p38 MAPK et Wnt. Ces différentes voies ont par ailleurs déjà été impliquées dans la pathogénie de la MP et seront détaillées ci-après.

Voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR

La voie de signalisation PI3K/AKT est une voie essentielle impliquée dans de multiples fonctions cellulaires comme la survie, la prolifération et la croissance. Les PI3K (phosphatidylinositol 3 kinases) jouent un rôle central dans la transduction des signaux en réponse aux cytokines, facteurs de croissance et autres protéines de la matrice extra-cellulaire par leur interaction avec les récepteurs tyrosine kinases ou la kinase JAK. Cette activation est à l'origine d'une activation de PDK1 qui phosphoryle AKT. La perte de fonction de PTEN active également AKT. AKT est notamment impliqué dans l'activation de la transcription via NF-κB, la survie cellulaire en inhibant Bad, le métabolisme énergétique, la progression du cycle cellulaire via p53 et Cyclin D1 et l'angiogénèse via eNOS. La voie PI3K/AKT est l'une des voies d'activation de mTOR (Mechanistic Target Of Rapamycin) par phosphorylation. mTOR phosphoryle eIF4E-BP1 (4E-BP1) modulant ainsi la traduction, phosphoryle p70S6K impliqué dans la croissance cellulaire, active HIF1α et donc la signalisation du VEGF et inhibe ATG1 et donc module l'autophagie (Figure 27).

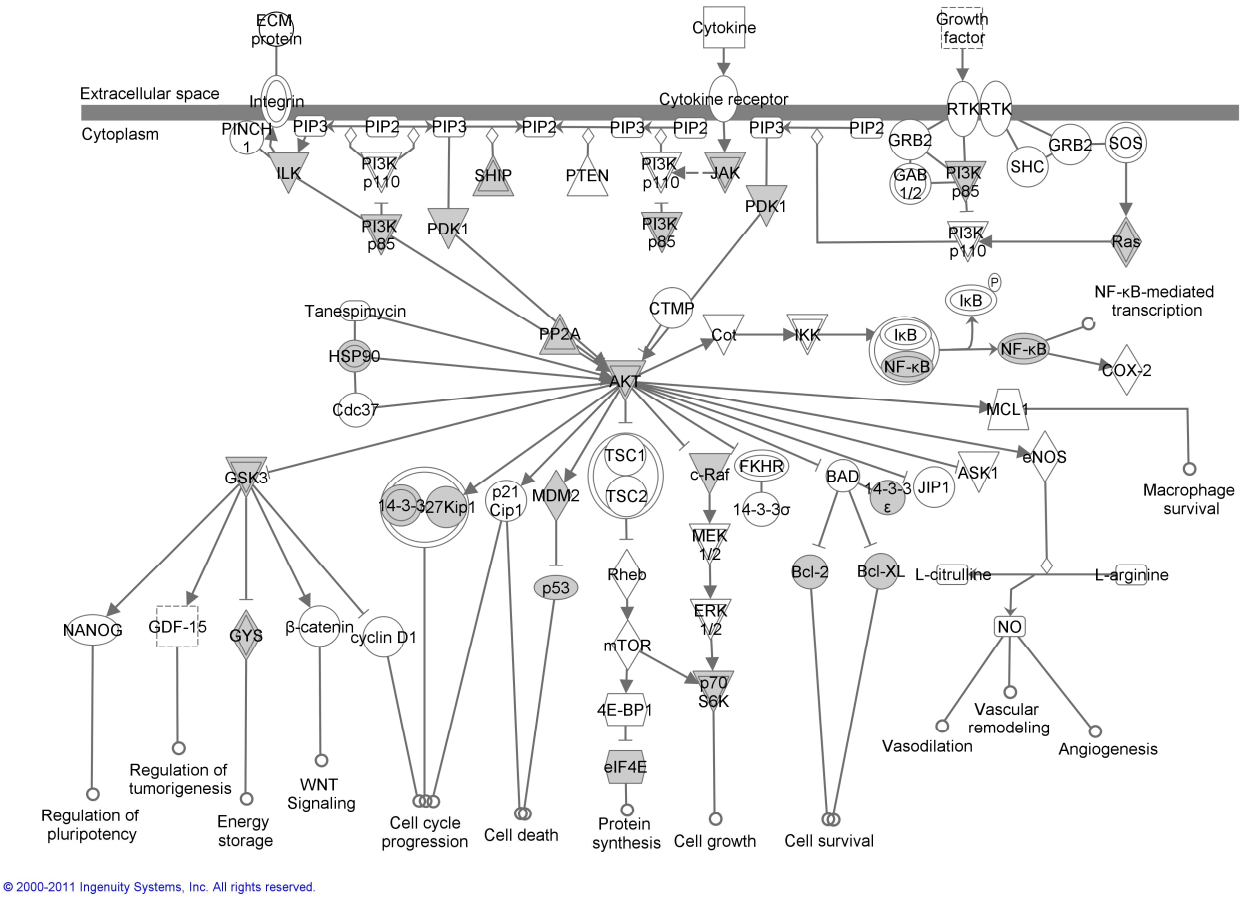


Figure 27 : Représentation de la voie PI3K/AKT issue du logiciel IPA.
Les molécules représentées en gris sont dérégulées dans la liste des 3070 gènes présents aux 3 stades de la MP.

Cette voie PI3K/AKT/mTOR semble centrale dans la pathogénie de la MP. Une diminution de l'expression d'AKT et notamment de phospho-AKT a été identifiée dans les cerveaux de sujets avec MP (Timmons *et al.*, 2009). Cette donnée est à mettre en lien avec la surexpression d'AKT3 identifiée dans les PBMC de nos sujets quel que soit leur stade clinique. L'activation de cette voie est également impliquée dans le mécanisme d'action de molécules prévenant la mort des neurones dopaminergiques que sont les œstrogènes et la voie IGF-1 dans un modèle de rat 6-OHDA (Quesada *et al.*, 2008). La caféine active également la voie PI3K/AKT et protège de la mort par apoptose les cellules SH-SY5Y dans des modèles toxiques (Nakaso *et al.*, 2008). L'effet protecteur de la rasagiline chez la souris MPTP proviendrait d'une activation d'AKT (Mandel *et al.*, 2007). Les gènes associés à la MP sont également associés à la voie PI3K/AKT. Les mutations de SNCA inhibent l'activation d'AKT induite par IGF-1 (Chung *et al.*, 2011). La réduction d'expression de PGC-1α favorise l'oligomérisation de l'alpha-synucléine et inhibe la voie de signalisation AKT/GSK3β (Ebrahim *et al.*, 2010). Dans un contexte de stress oxydant, DJ-1 active AKT et protège de la mort neuronale induite par le MPTP (Aleyasin *et al.*, 2010). De

même, la surexpression de PINK1 provoque la phosphorylation d'AKT par activation de mTORC2 (mechanistic target of rapamycin complex 2) (Murata *et al*., 2011). Par ailleurs, LRRK2 phosphoryle également AKT1 et ses mutations comme G2019S diminuent son interaction avec AKT1 (Ohta *et al*., 2011). De plus, LRRK2 tout comme mTOR, phosphorylent 4E-BP1 sur les mêmes sites. L'inactivation chronique de 4E-BP par les mutants de LRRK2 dérégule la traduction et peut conduire à la mort des neurones dopaminergiques chez la Drosophile (Imai *et al*., 2008). Enfin, l'activation de la voie AKT/mTOR est capable de favoriser la régénération axonale dans la voie nigro-striée dans un modèle utilisant des vecteur viraux (Kim *et al*., 2011). Toutes ces données confirmant l'intérêt de l'activation de cette voie pour des objectifs de neuroprotection.

Voies de signalisation des MAPK

La cascade des MAPK (mitogen-activated protein kinase) est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires, comprenant notamment la prolifération, la différentiation, la migration et la survie (Kim & Choi, 2010). On dénombre 4 groupes majeurs de signalisation MAPK : les signalisations ERK1/2 (extracellular signal-related kinases), JNK (Jun amino-terminal kinases), p38 MAPK et ERK5. Ces différentes voies sont activées par des MAPKK spécifiques de chaque voie : MEK1/2 pour la voie ERK1/2, MKK3/6 pour la voie p38 MAPK, MKK4/7 pour JNK et MEK5 pour ERK5. Chaque MAPKK est activée par plusieurs MAPKKK en réponse à différents stimuli, ce qui accroît la complexité biologique de ces voies. Ces différentes voies sont dérégulées dans les PBMC des différents groupes de parkinsoniens que nous avons étudiés. De plus, la voie des MAPK fait partie des voies dérégulées dans l'étude comparant les données transcriptomiques et de GWAS des sujets parkinsoniens (Edwards *et al.*, 2011).

La voie ERK/MAPK est la voie cellulaire clé de la transduction des informations vers le cycle cellulaire, la croissance et la différentiation en modulant des facteurs de transcription. ERK1/2 phosphoryle également des nombreuses cibles cytoplasmiques comme des protéines du cytosquelette, des canaux ioniques et des molécules régulant la traduction des protéines. Cette voie est activée le plus souvent par des facteurs de croissance qui se lient à des récepteurs tyrosine kinases membranaires ou peut être activée via les intégrines et la protéine Ras. La voie p38 MAPK est activée par divers stimuli de stress comme des cytokines pro-inflammatoires, des ligands de récepteurs de mort cellulaire ou le stress oxydant. Cette activation est à l'origine d'une cascade de phosphorylation jusque l'activation de facteurs transcriptionnels modulant les gènes impliqués dans la production de cytokines et l'apoptose. La voie JNK est également activée en réponse à des stress cellulaires comme l'irradiation, les ligands des récepteurs de mort, les

cytokines inflammatoires et les facteurs de croissance. Cette voie joue un rôle central dans la prolifération cellulaire, l'apoptose (par phosphorylation des protéines de la famille BCL2), le métabolisme et la réparation de l'ADN. Ces 2 dernières voies modulent notamment la voie p53. Enfin, la voie ERK5 est activée par de nombreux stimuli comme des facteurs de croissance ou des éléments de stress cellulaire. Cette voie est impliquée dans la prolifération, la différentiation et la survie cellulaire notamment dans les cellules neuronales en raison de son activation par les facteurs neurotrophiques (Figure 28).

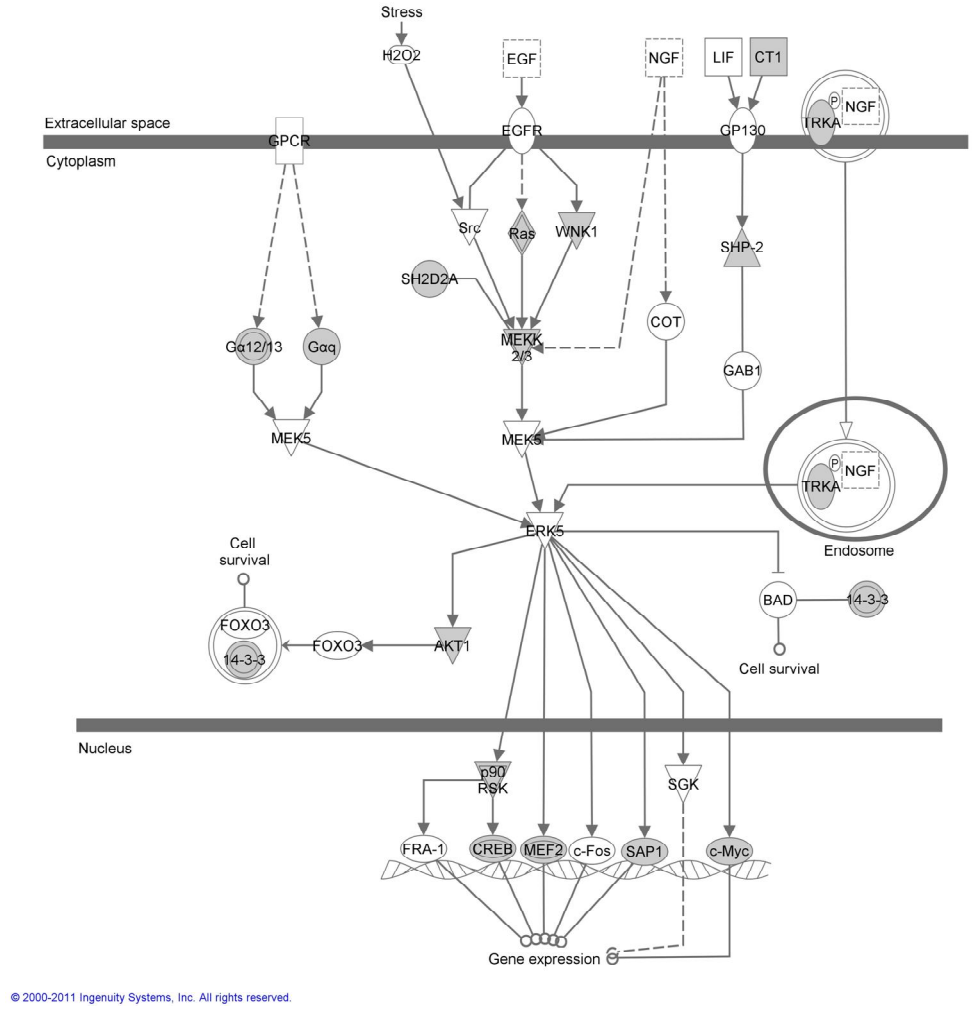


Figure 28 : Représentation de la voie ERK5 issue du logiciel IPA.
Les molécules représentées en gris sont dérégulées dans la liste des 3070 gènes présents aux 3 stades de la MP.

L'implication de ces différentes voies MAPK a également été démontrée dans la MP. Seule la voie ERK5 n'a pas été identifiée dans ce cadre, mais elle mériterait un plus grand intérêt. Même si l'expression du gène ERK5 n'est pas modifiée dans les PBMC des sujets parkinsoniens, la voie de signalisation ERK5 l'est. L'expression des formes actives et phosphorylées de ERK, JNK et p38 MAPK a été retrouvée dans des inclusions cytoplasmiques à proximité des corps de Lewy dans les neurones du tronc cérébral de sujets parkinsoniens (Ferrer *et al.*, 2001). Par ailleurs, les

protéines ERK phosphorylées sont associées aux processus d'autophagie et de dégradation des mitochondries dans la SN des parkinsoniens (Zhu *et al*., 2003). De plus, le MPP+ favorise la phosphorylation de ERK/MAPK dans les cellules SH-SY5Y (Gómez-Santos *et al*., 2002). Les cellules SH-SY5Y traitées par 6-OHDA induisent la localisation d'ERK1/2 à la mitochondrie et l'induction de l'autophagie et la dégradation mitochondriale (Dagda *et al*., 2008). La stimulation de la voie JNK par les MLK (mixed-lineage kinases) est à l'origine de la mort neuronale par apoptose en culture cellulaire (Xu *et al*., 2001). L'inhibition de la voie JNK protège de la mort neuronale dopaminergique chez la souris MPTP (Pan *et al*., 2010). Chez les souris traitées au MPTP, l'activation de la voie p38 MAPK entraîne la translocation de p53 dans les noyaux des cellules dopaminergiques et ainsi la mort cellulaire (Karunakaran *et al*., 2008).

Les voies MAPK ont également été associées aux gènes impliqués dans la MP. Par exemple, le MPP+ et la roténone favorisent l'épissage préférentiel de SNCA vers l'isoforme 112 par modulation la voie ERK/MAPK, ce qui concourt à la mort neuronale (Kalivendi *et al*., 2010). La surexpression de LRRK2 favorise l'activation de la voie ERK/MAPK et induit par là l'expression de l'alpha-synucléine (Carballo-Carbajal *et al*., 2010). De plus, LRRK2 fait partie de la famille des MLK et les variants pathologiques telles les mutations G2019S et I2020T phosphorylent les MAPKK de type MKK3, 4, 6 et 7 qui sont en amont des voies JNK et p38 MAPK (Gloeckner *et al*., 2009). De façon intéressante, une diminution de la phosphorylation de JNK, Src (récepteur pouvant activer ERK et p38 MAPK) et HSP27 (cible de p38 MAPK) a été constatée dans les PBMC de sujets porteurs de la mutation G2019S (White *et al*., 2007). La Parkin sauvage joue un rôle protecteur vis à vis des toxines dépolymérisant les microtubules en atténuant l'activation de la voie MAPK (Ren *et al*., 2009). Enfin, en réponse au stress oxydant, DJ-1 favorise l'expression de la SOD-1 en modulant la voie ERK1/2 (Wang *et al*., 2011).

Toutes ces données confirment l'implication des voies des MAPK et leur effet délétère dans la pathogénie de la MP. Elles confortent l'intérêt de l'étude des PBMC où ont pu être identifiées ces perturbations tant lors de notre étude transcriptomiques que par étude de la phosphorylation de ces protéines (White *et al*., 2007).

Voie de signalisation Wnt/β-catenin

Cette voie de signalisation est impliquée dans le développement, notamment la différentiation, la polarisation et la prolifération cellulaire. Les protéines Wnt, en se liant à leur récepteur, stabilisent β-catenin cytosolique qui peut se transloquer au noyau et activer des facteurs de transcription. En l'absence de ligands Wnt, β-catenin est phosphorylée notamment par GSK3 (glycogen synthase kinase 3). En présence de Wnt, la phosphorylation de β-catenin est

inhibée par disheveled, dont l'activité est modulée par VPS35, codé par le dernier gène impliqué dans la MP (George *et al*., 2007 ; Vilariño-Güell *et al*., 2011). La voie de signalisation Wnt est également impliquée dans le guidage axonal, la formation des synapses et la maintenance des neurones (Sancho *et al*., 2009). De plus, l'inhibition de GSK3 et donc la stabilisation de β-catenin favorise la différentiation des précurseurs mésencéphaliques en neurones dopaminergiques (Castelo-Branco *et al*., 2004). Ces données font de la voie Wnt, une cible potentielle à la neuroprotection dans la MP ce d'autant qu'il s'agit d'une voie dérégulée dès les stades précoces (Paragraphe 5.2.1.1) et de façon robuste (la seule à persister si on applique un ratio d'expression d'au moins 1,5 à ces analyses).

Toutes ces données retrouvées dans l'étude transcriptomique des PBMC et dans la littérature confortent l'implication de ces voies de survie, prolifération et croissance cellulaire dans la MP. Les molécules qui modulent ces voies (activation de la voie PI3K/AKT et inhibition des voies des MAPK) pourraient constituer des molécules modifiant le cours évolutif de la maladie (Burke, 2007). La rasagiline, qui a démontré un effet sur le cours évolutif de la MP, module AKT (Olanow *et al*., 2009). En revanche, les inhibiteurs des MLK comme le CEP-1347 n'ont pas démontré d'effet sur les essais cliniques alors qu'ils sont bénéfiques dans les différents modèles de MP (Shoulson & Parkinson Study Group, PRECEPT Investigators, 2007).

3.3.2 Cycle cellulaire et mort cellulaire

Les voies de survie, prolifération et croissance cellulaire décrites précédemment agissent sur le cycle cellulaire et les voies de mort cellulaire. Dans les PBMC des différents groupes de parkinsoniens étudiés, l'analyse des voies moléculaires et toxicologiques étudiées a mis en avant les voies p53, du cycle cellulaire et des cyclines, le dysfonctionnement mitochondrial et les voies apoptotiques. Ces différentes voies sont interconnectées et ont par ailleurs été impliquées dans la MP. Les voies p53, du cycle cellulaire et de l'apoptose seront détaillées ci-après.

Voie p53

La protéine p53 (codée par le gène suppresseur de tumeur TP53) est un facteur de transcription clé activé en réponse à de nombreux stimuli comme les dommages de l'ADN, le stress oxydant ou l'hypoxie. La régulation transcriptionnelle des gènes sous la dépendance de p53 est à l'origine d'un arrêt du cycle cellulaire ou du passage en apoptose des cellules endommagées. Par ailleurs, p53 possède des fonctions indépendantes d'une régulation transcriptionnelle, comme son interaction avec des membres de la famille Bcl2, qui contribue à la mort cellulaire par la

libération du cytochrome C de la mitochondrie dans le cytosol et donc l'activation des caspases. Une augmentation de l'expression de p53 a été mise en évidence dans le striatum des sujets parkinsoniens (de la Monte *et al*., 1998). L'inhibition de p53 protège de la perte neuronale les souris traitées au MPTP et également protège les neurones en culture des traitements par 6-OHDA, MPP+ ou inhibiteurs du protéasome (Duan *et al*., 2002 ; Nakaso *et al*., 2004 ; Biswas *et al*., 2005 ; Nair, 2006). Par ailleurs, l'inhibition du protéasome dans les neurones dopaminergiques entraîne une augmentation des taux de p53 phosphorylée et ainsi une perméabilisation de la membrane mitochondriale à l'origine d'une activation des caspases et de l'apoptose (Nair *et al*., 2006). Chez la souris traitée par ce même inhibiteur, est observée une augmentation des taux de p53 phosphorylée dans les neurones de la SN. Ces données suggèrent un lien entre le protéasome et l'apoptose dépendante de la mitochondrie par la voie p53. De plus, l'inhibition du protéasome, à l'origine d'une surexpression de p53, induit un phénomène d'autophagie (Du *et al*., 2009). L'activation de p53 inhibe l'activité de mTOR par l'activation de l'AMPK lors d'état de privation énergétique des cellules (Feng *et al*., 2005). Ces données montrent que les 2 systèmes de dégradation des protéines que sont l'autophagie et le SUP sont reliés par la voie p53.

L'alpha-synucléine contrôle également l'expression de p53 (Alves Da Costa *et al*., 2002). Les souris transgéniques exprimant la mutation A53T de SNCA présentent une accumulation de p53 sur la membrane mitochondriale externe (Martin *et al*., 2006). De plus, lors de l'inhibition du protéasome, les mutants A53T montrent une accumulation d'oligomères d'alpha-synucléine sur les membranes mitochondriales qui coïncide avec l'inhibition du complexe I respiratoire et la mitophagie (Chinta *et al*., 2010). Par ailleurs, Parkin exerce la fonction de répresseur transcriptionnel pour p53 indépendamment de sa fonction E3 ubiquitine ligase (da Costa *et al*., 2009). Les mutations de la Parkin augmentent l'expression et l'activité de p53. De même, DJ-1 inhibe la voie p53 et l'invalidation de DJ-1 chez le poisson zèbre, augmente l'expression de p53 (Bretaud *et al*., 2007). Au total, l'activation de la voie p53 conduit à l'apoptose à la fois de façon dépendante et indépendante de son activité de régulation de la transcription. La mort cellulaire indépendante de la régulation transcriptionnelle implique la translocation de p53 à la mitochondrie, sa liaison avec Bcl2 et l'activation de caspases (Mihara *et al*., 2003). L'identification de p53 comme l'un des mécanismes de la mort des neurones dopaminergiques a fait évoquer la modulation de cette voie à des fins de neuroprotection. Néanmoins son rôle de suppresseur de tumeur en limite l'intérêt.

Cycle cellulaire

Dans nos études transcriptomiques réalisées sur les PBMC de différents groupes de parkinsoniens, nous avons identifié à plusieurs reprises une dérégulation de la voie du cycle cellulaire, des cyclines et de la voie de régulation de la transition G1/S. Nous n'avons pas identifié de dérèglement de la voie de signalisation CDK5 (cyclin-dependent kinase 5) dans nos différents groupes. Cette voie est néanmoins impliquée dans la MP. CDK5 est exprimé dans les neurones où il régule les processus post-mitotiques, le développement et la croissance des neurites. Il est également exprimé dans les corps de Lewy (Brion & Couck, 1995) et est activé dans le gyrus cingulaire des parkinsoniens (Alvira *et al.*, 2008). CDK5 est un médiateur de la mort des neurones dopaminergiques chez la souris MPTP (Smith *et al.*, 2003) et est impliqué dans l'autophagie par phosphorylation de l'endophilin B1 (Wong *et al.*, 2011).

La progression des cellules dans le cycle cellulaire est sous la dépendance de CDK, dont l'activité est contrôlée par les cyclines. Les cyclines spécifiques de chaque phase du cycle cellulaire (G1, S, G2, M) activent des CDK spécifiques. Le cycle cellulaire est par ailleurs régulé par p53 et pRb (protéine du rétinoblastome). Par exemple, les complexes Cycline D-CDK4/6 et Cycline E-CDK2 interviennent pour la transition G1/S. L'une des cibles de Cycline D-CDK4/6 est pRb. Après phosphorylation par CDK4/6, pRb se dissocie du facteur de transcription E2F et active ainsi la progression du cycle cellulaire dans les cellules en division. En revanche, dans les neurones post-mitotiques, cette activation provoque l'apoptose. L'expression de pRb phosphorylée et d'E2F a été constatée dans un faible nombre de neurones de la SN de sujets parkinsoniens ainsi qu'une aneuploïdie de certains chromosomes indiquant l'activation de la machinerie de réplication de l'ADN (Höglinger *et al.*, 2007). De plus, après traitement par MPP+, les neurones mésencéphaliques en culture expriment pRb phosphorylée et E2F. La présence de pRb phosphorylée a également été identifiée dans les neurones dopaminergiques de la SN de parkinsoniens (Jordan-Sciutto *et al.*, 2003). Enfin, en culture cellulaire, la surexpression d'alpha-synucléine est à l'origine d'un passage accru des cellules en phase S avec une accumulation de la Cycline B (Lee *et al.*, 2003). De plus, les études de GWAS ont retrouvé un polymorphisme du gène GAK (Cyclin G-associated kinase) comme facteur de risque de la MP. Ce polymorphisme modifie par ailleurs l'expression de SNCA au niveau cérébral (Dumitriu *et al.*, 2011). Toutes ces données indiquent un dérèglement du cycle cellulaire et notamment de la transition G1/S, comme nous l'avons observé dans les PBMC (Figure 29).

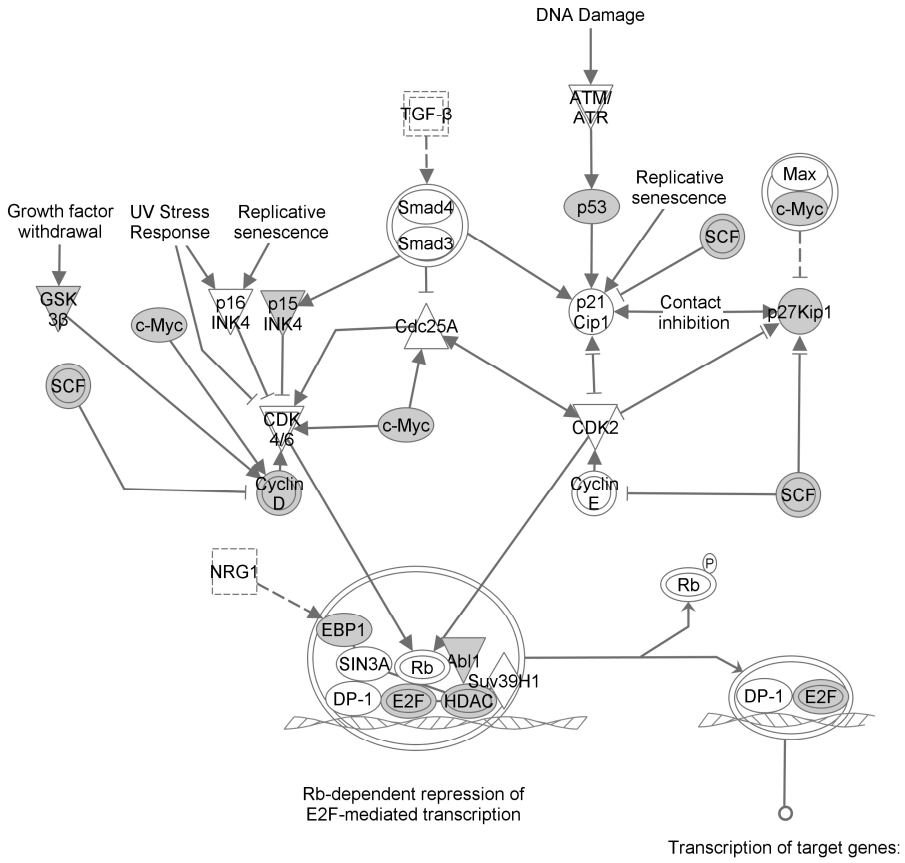
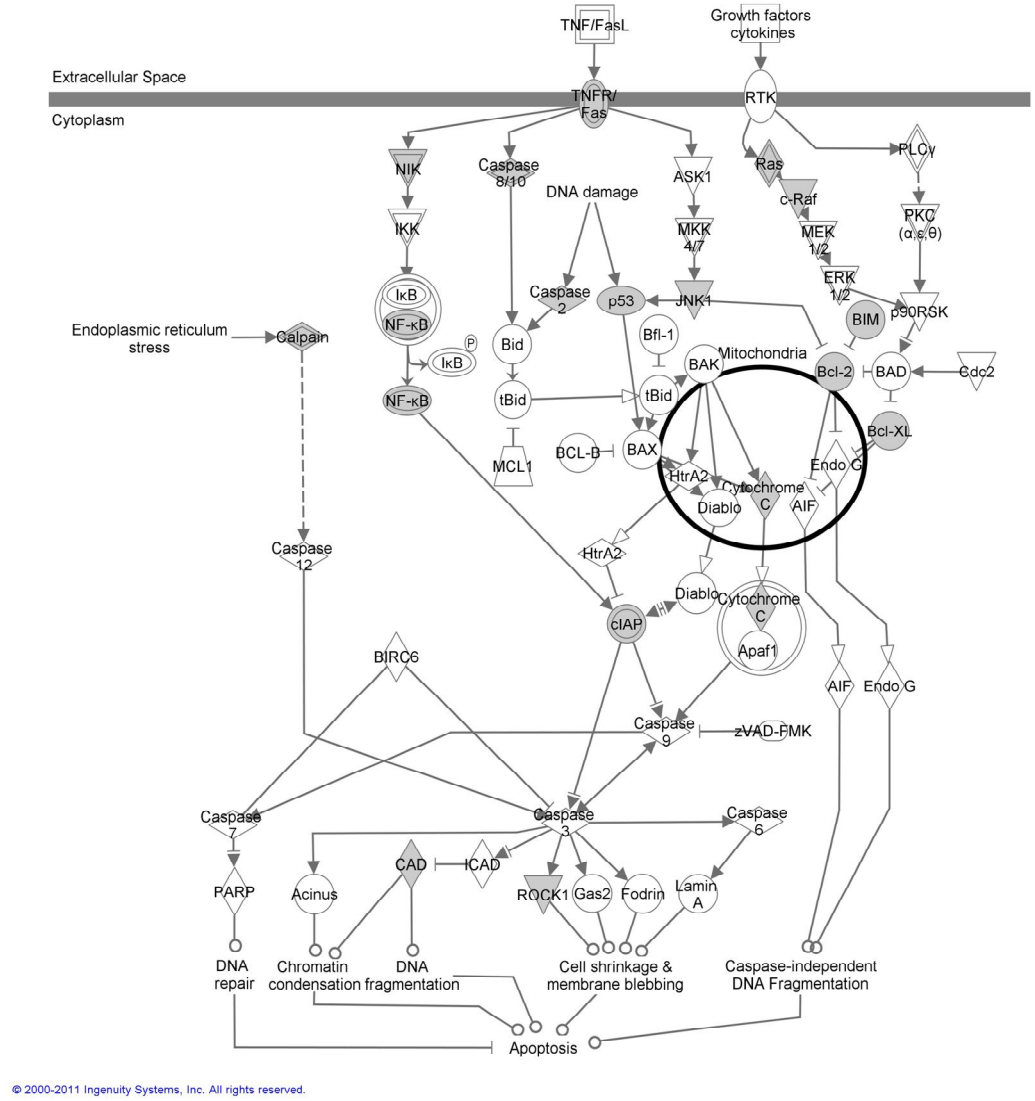


Figure 29 : Représentation de la voie de signalisation du contrôle de la transition G1/S du cycle cellulaire issue du logiciel IPA.
Les molécules représentées en gris sont dérégulées dans la liste des 3070 gènes présents aux 3 stades de la MP.

Apoptose

La dérégulation de toutes les voies que nous avons décrites, issues des résultats du transcriptome des PBMC et des données de la littérature relative à la MP, ont pour conséquence la mise en jeu de la mort cellulaire programmée par apoptose. L'apoptose est un processus ATP-dépendant impliquant une cascade d'événements qui mène à l'activation de la caspase 3. Cette activation conduit à des modifications morphologiques de la cellule avec rétrécissement, bourgeonnement, condensation de la chromatine et fragmentation de l'ADN. On distingue 3 voies menant à l'apoptose : la voie intrinsèque, la voie extrinsèque et la voie du réticulum endoplasmique. La voie intrinsèque est associée à une cascade d'évènements moléculaires impliquant la mitochondrie et les membres de la famille Bcl2, à l'origine d'une libération du cytochrome C dans le cytosol et l'activation des caspases. La voie extrinsèque implique la liaison de ligands spécifiques aux récepteurs de la famille TNF, ce qui active les caspases. La voie réticulaire implique également des caspases, mais elle se déroule dans le réticulum endoplasmique. Cette voie est activée lorsque l'UPR (unfolded protein response) n'est plus

capable de gérer l'excès de protéines mal conformées toxiques (Alves da Costa & Checler, 2011) (Figure 30).



© 2000-2011 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Figure 30 : Représentation de la voie de signalisation de l'apoptose issue du logiciel IPA.
Les molécules représentées en gris sont dérégulées dans la liste des 3070 gènes présents aux 3 stades de la MP.

Dans le cadre de la MP, la fragmentation de l'ADN a pu être repérée dans les neurones de la SN *in vivo* (Mochizuki *et al*., 1996 ; Tatton *et al*., 2003). Néanmoins, l'identification de neurones apoptotiques reste difficile en raison de la rapide disparition des cellules apoptotiques et de la relative lenteur de la dégénérescence des neurones dopaminergiques. De plus, l'activation de la caspase 3 effectrice a été montrée dans un faible nombre de neurones dopaminergiques (Tatton, 2000). L'étude transcriptomique à partir des neurones dopaminergiques a retrouvé une surexpression des marqueurs de la voie extrinsèque que sont le récepteur FAS, les membres de la famille des récepteurs TNF, la caspase 8 et TRADD. De plus, certains membres de la voie intrinsèque sont sous-exprimés tels BCL2L1 de la famille BCL2, le cytochrome C et PDCD6

(programmed cell death 6) (Simunovic *et al*., 2009). Une surexpression de Bax a été identifiée dans la SN de parkinsoniens (Tatton, 2000 ; Hartmann *et al*., 2001). Les modèles animaux et cellulaires de MP ont démontré l'activation des caspases et un aspect morphologique d'apoptose. La mort neuronale associée aux gènes SNCA, Parkin, LRRK2, PINK1 et DJ-1 impliquent également l'activation des caspases. De la même façon, les modèles toxiques avec MPTP, roténone et 6-OHDA produisent une activation des caspases et la libération de cytochrome C (Levy *et al*., 2009). Il paraît intéressant de vouloir bloquer l'apoptose à des fins thérapeutiques. Néanmoins, les molécules anti-apoptotiques risquent d'interférer avec les mécanismes physiologiques de contrôle cellulaire notamment de suppression des tumeurs. De plus, les études expérimentales ont suggéré que malgré la suppression des voies apoptotiques, les cellules exposées à des stress mourraient par d'autres mécanismes comme la nécrose. Enfin, le blocage des voies apoptotiques n'agit que sur les composants distaux de la mort cellulaire, mais ne préserve pas les fonctions neuronales.

En conclusion, nous avons identifié au sein des PBMC de sujets parkinsoniens une dérégulation des voies de signalisation cellulaire associées à la MP. Ces dérèglements semblent être le reflet au niveau périphérique des événements moléculaires cérébraux. L'étude du transcriptome nous a permis d'identifier des voies cellulaires reliées à la MP, dont certaines semblent prometteuses à des visées de neuroprotection.

3.3.3 Schéma général

Nous avons voulu synthétiser les différentes voies cellulaires dérégulées dans la MP dans un schéma les représentant dans un contexte cellulaire. Nous y avons également indiqué les gènes associés à la MP (Figure 31).

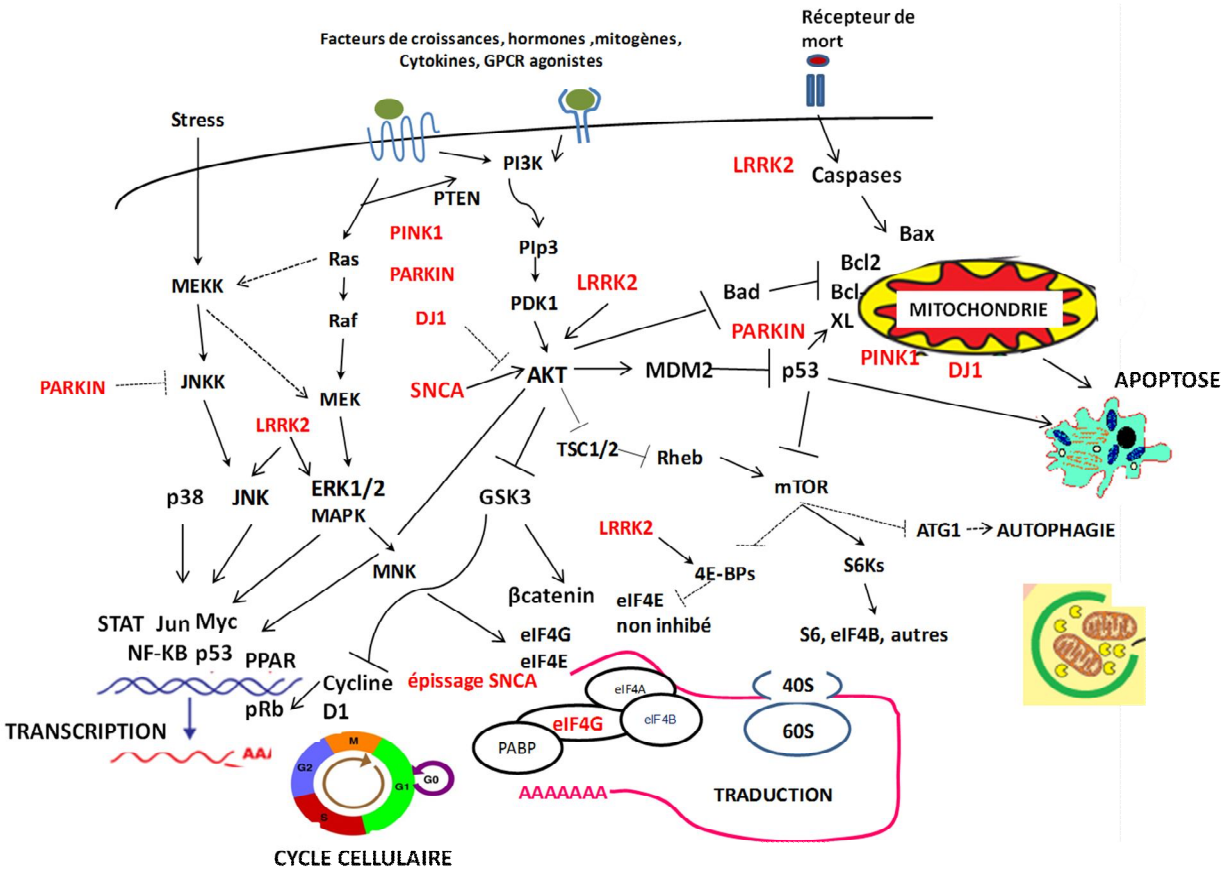


Figure 31 : Représentation schématique des voies de signalisation cellulaire dérégulées dans la MP adaptée de Mamane *et al.*, 2004.

Les gènes associés à la MP sont indiqués en rouge. Les voies représentées sont les voies de survie, croissance et profération cellulaire (PI3K/AKT/mTOR et MAPK), du métabolisme énergétique (mitochondrie) ainsi que les voies du cycle cellulaire, p53 et d'apoptose et leurs impacts sur la transcription et la traduction.

4. Perspectives

L'analyse du transcriptome permet de comparer différents groupes de sujets, d'identifier les gènes présentant un profil d'expression différent et les voies cellulaires dérégulées. Une autre approche a récemment été proposée (Mar *et al*., 2011). Cette équipe a recherché les différences de variance entre les individus au sein des données de puces d'expression. Ils ont identifié des gènes avec des profils de variance d'expression différents. Ces gènes n'étaient pas distribués de façon aléatoire parmi les voies de signalisation cellulaire. Les gènes avec de faibles variances d'expression (ou dont l'expression était hautement contrainte) étaient plus représentés dans les voies de transduction des signaux ; alors que les gènes avec une variance d'expression importante (ou faiblement contraints) correspondaient aux voies situées à l'extérieur de la cellule. En particulier, dans la MP, ils ont identifié une surreprésentation des gènes à variance d'expression importante. On peut supposer que le degré de variabilité de l'expression des gènes d'une voie moléculaire indique la plasticité de cette voie (Raser & O'Shea, 2005). Ces résultats préliminaires méritent d'être confirmés par d'autres études contenant un nombre plus important d'échantillons. Cette étude pourrait être notamment réalisée sur nos données de puces et étendue à d'autres échantillons de nos cohortes. Jusqu'à présent, la variabilité des niveaux d'expression des gènes au sein d'une population était considérée comme un biais expérimental nécessitant des mesures de normalisation. Néanmoins, les progrès dans la reproductibilité des biopuces doivent faire considérer cette variabilité comme un trait phénotypique. En effet, la variabilité phénotypique pourrait venir de différentes interactions génétiques ou épigénétiques. Les analyses génomiques se concentrent sur la variabilité en termes de séquences et de polymorphismes structuraux. Dans ce contexte, la convergence de multiples variants peut contribuer à l'apparition des maladies (Gibson, 2009). Ces aspects peuvent être interprétés selon la métaphore de « canalisation » de l'évolution du génome (Waddington, 1959). Les « canaux » représenteraient les voies dans lesquelles évoluent les systèmes génétiques vers un état de stabilité. Sous l'influence de facteurs environnementaux et génétiques, les « canaux » pourraient présenter un aplatissement (« décanalisation ») avec dégradation de cet état de stabilité ce qui pourrait occasionner les maladies. L'étude de la variance de l'expression des gènes dans la MP suggère une variabilité importante et donc un processus de « décanalisation ».

Par ailleurs, l'étude du transcriptome que nous avons réalisée s'intéresse au niveau d'expression des gènes, mais ne renseigne pas sur les niveaux protéiques. D'autres facteurs modulent l'expression des gènes, comme la présence de miRNA (microARN non codants impliqués dans la régulation de l'expression des gènes, notamment en bloquant la traduction des ARNm cibles). Les données d'expression de ces miRNA sont disponibles à partir des puces

Illumina et mériteraient une nouvelle analyse. De plus, de telles variations d'expression génique ne sont pas corrélées à la fonction des protéines, notamment pas à leur état de phosphorylation. Cet état de phosphorylation nous apparaît important à étudier dans la MP en raison de la dérégulation des voies de signalisation cellulaire impliquant des cascades de phosphorylation comme les voies PI3K/AKT et MAPK. L'utilisation de puces de phosphorylation permettrait l'étude de l'ensemble des protéines clés de ces voies de signalisation et permettrait de vérifier l'état d'activation de ces protéines dans la MP.

Par ailleurs, nous avons observé l'implication de certains variants d'épissage dans la MP. L'isoforme SNCA112 semble être le variant d'épissage responsable de la pathogénie chez le sujet porteur de duplication de SNCA (Paragraphe 3.1.1). De plus, la roténone et le MPP+ favorisent un épissage alternatif conduisant préférentiellement à la formation de ce variant (Kalivendi *et al*., 2010). Certains polymorphismes de la région 3' de SNCA associés à la MP favorisent l'expression du variant SNCA112 dans le cortex frontal des parkinsoniens (McCarthy *et al*., 2011). Une augmentation du variant d'épissage de l'exon 4 du gène PRKN a été observée chez les parkinsoniens (Tan *et al*., 2005). Des délétions au sein du gène EIF4G1 produisent une altération de l'épissage des ARN ribosomiques chez la levure (Kafasla *et al*., 2009). Ces données évoquent l'intérêt potentiel de l'étude de l'épissage dans la MP, ce d'autant que le gène SRRM2 (Serine/arginine repetitive matrix 2), qui code pour un facteur d'épissage, est dérégulé chez les parkinsoniens. De nombreux gènes présentent également un épissage alternatif plus important dans les cellules sanguines des sujets parkinsoniens en comparaison avec des témoins (Shehadeh *et al*., 2010). Le développement d'appareils de séquençage nouvelle génération (NGS) permet désormais de séquencer l'ensemble de l'ARN (RNAseq). Le NGS permet d'obtenir des informations sur le niveau d'expression des ARNm, mais également des ARN non codants, les variants d'épissage et les polymorphismes. Suite aux résultats obtenus lors de cette thèse, nous nous proposons de poursuivre ces analyses par RNAseq à partir des PBMC de sujets parkinsoniens de forme génétique et de forme sporadique. Nous nous intéresserons particulièrement aux sujets à un stade précoce afin d'augmenter nos connaissances sur les mécanismes précoces de la maladie et d'identifier des marqueurs diagnostiques et de nouvelles cibles thérapeutiques. En effet, nous pensons que seule la combinaison de différentes techniques moléculaires (études génomiques, transcriptomiques, protéomiques, *etc*…) et d'imagerie morphologique et fonctionnelle associée à l'évaluation clinique permettra de progresser dans cette voie.

VI. RÉFÉRENCES

- Aarsland D, Zaccai J, Brayne C. A systematic review of prevalence studies of dementia in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2005;20(10):1255-1263.

- Abbas N, Lücking CB, Ricard S, et al. A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. *Hum. Mol. Genet.* 1999;8(4):567-574.

- Abou-Sleiman PM, Healy DG, Quinn N, Lees AJ, Wood NW. The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 2003;54(3):283-286.

- Abou-Sleiman PM, Muqit MMK, McDonald NQ, et al. A heterozygous effect for PINK1 mutations in Parkinson's disease? *Ann. Neurol.* 2006;60(4):414-419.

- Ahn T-B, Kim SY, Kim JY, et al. alpha-Synuclein gene duplication is present in sporadic Parkinson disease. *Neurology.* 2008;70(1):43-49.

- Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 1989;12(10):366-375.

- Alexander GE, DeLong MR, Strick PL. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu. Rev. Neurosci.* 1986;9:357-381.

- Aleyasin H, Rousseaux MWC, Marcogliese PC, et al. DJ-1 protects the nigrostriatal axis from the neurotoxin MPTP by modulation of the AKT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010;107(7):3186-3191.

- Alvarez-Erviti L, Rodriguez-Oroz MC, Cooper JM, et al. Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. *Arch. Neurol.* 2010;67(12):1464-1472.

- Alves Da Costa C, Paitel E, Vincent B, Checler F. Alpha-synuclein lowers p53-dependent apoptotic response of neuronal cells. Abolishment by 6-hydroxydopamine and implication for Parkinson's disease. *J. Biol. Chem.* 2002;277(52):50980-50984.

- Alves da Costa C, Checler F. Apoptosis in Parkinson's disease: is p53 the missing link between genetic and sporadic Parkinsonism? *Cell. Signal.* 2011;23(6):963-968.

- Alvira D, Ferrer I, Gutierrez-Cuesta J, et al. Activation of the calpain/cdk5/p25 pathway in the girus cinguli in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2008;14(4):309-313.

- Amenta F, Bronzetti E, Cantalamessa F, et al. Identification of dopamine plasma membrane and vesicular transporters in human peripheral blood lymphocytes. *J. Neuroimmunol.* 2001;117(1-2):133-142.

- Angeles DC, Gan B-H, Onstead L, et al. Mutations in LRRK2 increase phosphorylation of peroxiredoxin 3 exacerbating oxidative stress-induced neuronal death. *Hum Mutat.* 2011. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21850687

- Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F, et al. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol. Histopathol.* 1997;12(1):25-31.

- Arikawa E, Sun Y, Wang J, et al. Cross-platform comparison of SYBR Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study. *BMC Genomics.* 2008;9:328.

- Asanuma M, Miyazaki I. Common anti-inflammatory drugs are potentially therapeutic for Parkinson's disease? *Exp. Neurol.* 2007;206(2):172-178.

- Ascherio A, Chen H, Weisskopf MG, et al. Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 2006;60(2):197-203.

- Baba Y, Kuroiwa A, Uitti RJ, Wszolek ZK, Yamada T. Alterations of T-lymphocyte populations in Parkinson disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2005;11(8):493-498.

- Babushok DV, Kazazian HH Jr. Progress in understanding the biology of the human mutagen LINE-1. *Hum. Mutat*. 2007;28(6):527-539.

- Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, et al. Expression levels for many genes in human peripheral blood cells are highly sensitive to ex vivo incubation. *Genes Immun.* 2004;5(5):347-353.

- Bassilana F, Mace N, Li Q, et al. Unraveling substantia nigra sequential gene expression in a progressive MPTP-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 2005;20(1):93-103.

- Batelli S, Albani D, Rametta R, et al. DJ-1 modulates alpha-synuclein aggregation state in a cellular model of oxidative stress: relevance for Parkinson's disease and involvement of HSP70. *PLoS ONE*. 2008;3(4):e1884.

- Bekris LM, Mata IF, Zabetian CP. The genetics of Parkinson disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2010;23(4):228-242.

- Belancio VP, Deininger PL, Roy-Engel AM. LINE dancing in the human genome: transposable elements and disease. *Genome Med*. 2009;1(10):97.

- Bellucci A, Navarria L, Zaltieri M, et al. Induction of the unfolded protein response by α-synuclein in experimental models of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 2011;116(4):588-605.

- Berg D, Godau J, Walter U. Transcranial sonography in movement disorders. *Lancet Neurol*. 2008;7(11):1044-1055.

- Berthier A, Navarro S, Jiménez-Sáinz J, et al. PINK1 displays tissue-specific subcellular location and regulates apoptosis and cell growth in breast cancer cells. *Hum. Pathol.* 2011;42(1):75-87.

- Bertoni A, Giuliano P, Galgani M, et al. Early and late events induced by polyQ-expanded proteins: identification of a common pathogenic property of polYQ-expanded proteins. *J. Biol. Chem.* 2011;286(6):4727-4741.

- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci*. 2000;3(12):1301-1306.

- Beyer K, Lao JI, Carrato C, et al. Differential expression of alpha-synuclein isoforms in dementia with Lewy bodies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol*. 2004;30(6):601-607.

- Beyer K. Alpha-synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers. *Acta Neuropathol*. 2006;112(3):237-251.

- Beyer K, Domingo-Sàbat M, Humbert J, et al. Differential expression of alpha-synuclein, parkin, and synphilin-1 isoforms in Lewy body disease. *Neurogenetics.* 2008;9(3):163-172.

- Bezard E, Imbert C, Gross CE. Experimental models of Parkinson's disease: from the static to the dynamic. *Rev Neurosci*. 1998;9(2):71-90.

- Bezard E, Przedborski S. A tale on animal models of Parkinson's disease. *Mov. Disord*. 2011;26(6):993-1002.

- Biskup S, Moore DJ, Celsi F, et al. Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain. *Ann. Neurol*. 2006;60(5):557-569.

- Biswas SC, Ryu E, Park C, Malagelada C, Greene LA. Puma and p53 play required roles in death evoked in a cellular model of Parkinson disease. *Neurochem. Res.* 2005;30(6-7):839-845.

- Blandini F, Sinforiani E, Pacchetti C, et al. Peripheral proteasome and caspase activity in Parkinson disease and Alzheimer disease. *Neurology*. 2006;66(4):529-534.

- Bomprezzi R, Ringnér M, Kim S, et al. Gene expression profile in multiple sclerosis patients and healthy controls: identifying pathways relevant to disease. *Hum. Mol. Genet*. 2003;12(17):2191-2199.

- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*. 2003;299(5604):256-259.

- Bossers K, Meerhoff G, Balesar R, et al. Analysis of gene expression in Parkinson's disease: possible involvement of neurotrophic support and axon guidance in dopaminergic cell death. *Brain Pathol.* 2009;19(1):91-107.

- Bouman L, Schlierf A, Lutz AK, et al. Parkin is transcriptionally regulated by ATF4: evidence for an interconnection between mitochondrial stress and ER stress. *Cell Death Differ.* 2011;18(5):769-782.

- Braak H, Del Tredici K, Rüb U, et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging*. 2003;24(2):197-211.

- Bretaud S, Allen C, Ingham PW, Bandmann O. p53-dependent neuronal cell death in a DJ-1-deficient zebrafish model of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 2007;100(6):1626-1635.

- Brighina L, Prigione A, Begni B, et al. Lymphomonocyte alpha-synuclein levels in aging and in Parkinson disease. *Neurobiol. Aging.* 2010;31(5):884-885.

- Brion JP, Couck AM. Cortical and brainstem-type Lewy bodies are immunoreactive for the cyclin-dependent kinase 5. *Am. J. Pathol.* 1995;147(5):1465-1476.

- Brochard V, Combadière B, Prigent A, et al. Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J. Clin. Invest*. 2009;119(1):182-192.

- Bruening W, Giasson BI, Klein-Szanto AJ, et al. Synucleins are expressed in the majority of breast and ovarian carcinomas and in preneoplastic lesions of the ovary. *Cancer*. 2000;88(9):2154-2163.

- Burke RE. Inhibition of mitogen-activated protein kinase and stimulation of Akt kinase signaling pathways: Two approaches with therapeutic potential in the treatment of neurodegenerative disease. *Pharmacol. Ther.* 2007;114(3):261-277.

- Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, et al. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science*. 2010;329(5999):1663-1667.

- Cannon JR, Greenamyre JT. Neurotoxic in vivo models of Parkinson's disease recent advances. *Prog. Brain Res.* 2010;184:17-33.

- Cantuti-Castelvetri I, Keller-McGandy C, Bouzou B, et al. Effects of gender on nigral gene expression and parkinson disease. *Neurobiol. Dis.* 2007;26(3):606-614.

- Carballo-Carbajal I, Weber-Endress S, Rovelli G, et al. Leucine-rich repeat kinase 2 induces alpha-synuclein expression via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Cell. Signal*. 2010;22(5):821-827.

- Carlsson T, Schindler FR, Höllerhage M, et al. Systemic administration of neuregulin-1β1 protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *J. Neurochem*. 2011;117(6):1066-1074.

- Castelo-Branco G, Rawal N, Arenas E. GSK-3beta inhibition/beta-catenin stabilization in ventral midbrain precursors increases differentiation into dopamine neurons. *J. Cell. Sci.* 2004;117(Pt 24):5731-5737.

- Chan D, Citro A, Cordy JM, Shen GC, Wolozin B. Rac1 protein rescues neurite retraction caused by G2019S leucine-rich repeat kinase 2. *J. Biol. Chem.* 2011;286(18):16140-16149.

- Chan NC, Chan DC. Parkin uses the UPS to ship off dysfunctional mitochondria. *Autophagy*. 2011;7(7):771-772.

- Charles P, Camuzat A, Benammar N, et al. Are interrupted SCA2 CAG repeat expansions responsible for parkinsonism? *Neurology*. 2007;69(21):1970-1975.

- Chartier-Harlin M-C, Kachergus J, Roumier C, et al. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet*. 2004;364(9440):1167-1169.

- Chartier-Harlin M-C, Dachsel JC, Vilariño-Güell C, et al. Translation Initiator EIF4G1 Mutations in Familial Parkinson Disease. *Am. J. Hum. Genet.* 2011;89(3):398-406.

- Chaturvedi RK, Beal MF. PPAR: a therapeutic target in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 2008;106(2):506-518.

- Cheadle C, Becker KG, Cho-Chung YS, et al. A rapid method for microarray cross platform comparisons using gene expression signatures. *Mol. Cell. Probes.* 2007;21(1):35-46.

- Cheng H-C, Ulane CM, Burke RE. Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons. *Ann. Neurol.* 2010;67(6):715-725.

- Chesselet M-F. In vivo alpha-synuclein overexpression in rodents: a useful model of Parkinson's disease? *Exp. Neurol*. 2008;209(1):22-27.

- Cheung ZH, Ip NY. The emerging role of autophagy in Parkinson's disease. *Mol Brain*. 2009;2:29.

- Chinta SJ, Mallajosyula JK, Rane A, Andersen JK. Mitochondrial α-synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy in vivo. *Neurosci. Lett.* 2010;486(3):235-239.

- Choi J-S, Park C, Jeong J-W. AMP-activated protein kinase is activated in Parkinson's disease models mediated by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010;391(1):147-151.

- Chrysostome V, Tison F. Epidémiologie. In : Defebvre L, Vérin M. La maladie de Parkinson. Paris: Masson, 2006: 3-9.

- Chung J-Y, Lee S-J, Lee S-H, et al. Direct interaction of α-synuclein and AKT regulates IGF-1 signaling: implication of Parkinson disease. *Neurosignals.* 2011;19(2):86-96.

- Clark IE, Dodson MW, Jiang C, et al. Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature*. 2006;441(7097):1162-1166.

- Clayton DF, George JM. The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci*. 1998;21(6):249-254.

- Conrad DF, Bird C, Blackburne B, et al. Mutation spectrum revealed by breakpoint sequencing of human germline CNVs. *Nat. Genet*. 2010;42(5):385-391.

- Cookson MR. alpha-Synuclein and neuronal cell death. *Mol Neurodegener*. 2009;4:9.

- Cooper AA, Gitler AD, Cashikar A, et al. Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science*. 2006;313(5785):324-328.

- Corrado L, Mazzini L, Oggioni GD, et al. ATXN-2 CAG repeat expansions are interrupted in ALS patients. *Hum. Genet.* 2011;130(4):575-580.

- Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science*. 2004;305(5688):1292-1295.

- Cuervo AM, Wong ESP, Martinez-Vicente M. Protein degradation, aggregation, and misfolding. *Mov. Disord.* 2010;25 Suppl 1:S49-54.

- da Costa CA, Sunyach C, Giaime E, et al. Transcriptional repression of p53 by parkin and impairment by mutations associated with autosomal recessive juvenile Parkinson's disease. *Nat. Cell Biol.* 2009;11(11):1370-1375.

- Dagda RK, Zhu J, Kulich SM, Chu CT. Mitochondrially localized ERK2 regulates mitophagy and autophagic cell stress: implications for Parkinson's disease. *Autophagy*. 2008;4(6):770-782.

- D'Amelio M, Ragonese P, Sconzo G, Aridon P, Savettieri G. Parkinson's disease and cancer: insights for pathogenesis from epidemiology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009;1155:324-334.

- Davidzon G, Greene P, Mancuso M, et al. Early-onset familial parkinsonism due to POLG mutations. *Ann. Neurol.* 2006;59(5):859-862.

- Dawson TM, Ko HS, Dawson VL. Genetic animal models of Parkinson's disease. *Neuron*. 2010;66(5):646-661.

- de la Monte SM, Sohn YK, Ganju N, Wands JR. P53- and CD95-associated apoptosis in neurodegenerative diseases. *Lab. Invest.* 1998;78(4):401-411.

- de Rijk MC, Launer LJ, Berger K, et al. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*. 2000;54(11 Suppl 5):S21-23.

- De Franceschi G, Frare E, Pivato M, et al. Structural and morphological characterization of aggregated species of α-synuclein induced by docosahexaenoic acid. *J. Biol. Chem.* 2011;286(25):22262-22274.

- Dehay B, Bové J, Rodríguez-Muela N, et al. Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 2010;30(37):12535-12544.

- Del Tredici K, Hawkes CH, Ghebremedhin E, Braak H. Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 2010;119(6):703-713.

- DelleDonne A, Klos KJ, Fujishiro H, et al. Incidental Lewy body disease and preclinical Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 2008;65(8):1074-1080.

- Deng H, Dodson MW, Huang H, Guo M. The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008;105(38):14503-14508.

- Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, et al. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* 2003;4(5):P3.

- Destée A, Mutez E, Kreisler A, Vanbesien-Maillot C, Chartier-Harlin MC. [Parkinson disease: genetics and neuronal death]. *Rev. Neurol. (Paris)*. 2009;165 Spec No 2:F80-85.

- Devi L, Raghavendran V, Prabhu BM, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK. Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J. Biol. Chem.* 2008;283:9089-9100.

- Devine MJ, Ryten M, Vodicka P, et al. Parkinson's disease induced pluripotent stem cells with triplication of the α-synuclein locus. *Nat Commun*. 2011;2:440.

- Dexter DT, Carayon A, Javoy-Agid F, et al. Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain*. 1991;114 (Pt 4):1953-1975.

- Di Fonzo A, Wu-Chou Y-H, Lu C-S, et al. A common missense variant in the LRRK2 gene, Gly2385Arg, associated with Parkinson's disease risk in Taiwan. *Neurogenetics*. 2006;7(3):133-138.

- Di Fonzo A, Dekker MCJ, Montagna P, et al. FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology*. 2009;72(3):240-245.

- Dickson DW, Braak H, Duda JE, et al. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol*. 2009;8(12):1150-1157.

- Dickson DW, Fujishiro H, Orr C, et al. Neuropathology of non-motor features of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat. Disord*. 2009;15 Suppl 3:S1-5.

- Do CB, Tung JY, Dorfman E, et al. Web-based genome-wide association study identifies two novel loci and a substantial genetic component for Parkinson's disease. *PLoS Genet*. 2011;7(6):e1002141.

- Du Y, Yang D, Li L, et al. An insight into the mechanistic role of p53-mediated autophagy induction in response to proteasomal inhibition-induced neurotoxicity. *Autophagy*. 2009;5(5):663-675.

- Duan W, Zhu X, Ladenheim B, et al. p53 inhibitors preserve dopamine neurons and motor function in experimental parkinsonism. *Ann. Neurol.* 2002;52(5):597-606.

- Dujardin K. Troubles cognitifs. In : Defebvre L, Vérin M. La maladie de Parkinson. Paris: Masson, 2011: 81-96.

- Duke DC, Moran LB, Kalaitzakis ME, et al. Transcriptome analysis reveals link between proteasomal and mitochondrial pathways in Parkinson's disease. *Neurogenetics*. 2006;7:139-148.

- Dumitriu A, Pacheco CD, Wilk JB, et al. Cyclin-G-associated kinase modifies α-synuclein expression levels and toxicity in Parkinson's disease: results from the GenePD Study. *Hum. Mol. Genet.* 2011;20(8):1478-1487.

- Duran R, Barrero FJ, Morales B, et al. Plasma alpha-synuclein in patients with Parkinson's disease with and without treatment. *Mov. Disord*. 2010;25(4):489-493.

- Ebrahim AS, Ko L-W, Yen S-H. Reduced expression of peroxisome-proliferator activated receptor gamma coactivator-1alpha enhances alpha-synuclein oligomerization and down regulates AKT/GSK3beta signaling pathway in human neuronal cells that inducibly express alpha-synuclein. *Neurosci. Lett.* 2010;473(2):120-125.

- Edwards YJK, Beecham GW, Scott WK, et al. Identifying consensus disease pathways in Parkinson's disease using an integrative systems biology approach. *PLoS ONE*. 2011;6(2):e16917.

- Ekstrand MI, Terzioglu M, Galter D, et al. Progressive parkinsonism in mice with respiratory-chain-deficient dopamine neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007;104(4):1325-1330.

- Elbaz A, Ross OA, Ioannidis JPA, et al. Independent and joint effects of the MAPT and SNCA genes in Parkinson disease. *Ann. Neurol*. 2011;69(5):778-792.

- Elden AC, Kim H-J, Hart MP, et al. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature*. 2010;466(7310):1069-1075.

- Emre M, Aarsland D, Albanese A, et al. Rivastigmine for dementia associated with Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 2004;351(24):2509-2518.

- Emre M, Aarsland D, Brown R, et al. Clinical diagnostic criteria for dementia associated with Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2007;22(12):1689-1707; quiz 1837.

- Etienne W, Meyer MH, Peppers J, Meyer RA Jr. Comparison of mRNA gene expression by RT-PCR and DNA microarray. *BioTechniques.* 2004;36(4):618-620, 622, 624-626.

- Fahn S, Elton RL, and Members of UPDRS Development Committee. Unified Parkinson's disease rating scale. In: Fahn S, Marsden CD, Calne DB. Recent developments in Parkinson's disease. London: MacMillan Hearth Care Information, 1987: 153-163.

- Falk T, Yue X, Zhang S, et al. Vascular endothelial growth factor-B is neuroprotective in an in vivo rat model of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 2011;496(1):43-47.

- Farrer M, Destée T, Becquet E, et al. Linkage exclusion in French families with probable Parkinson' s disease. *Mov. Disord.* 2000;15(6):1075-1083.

- Farrer M, Chan P, Chen R, et al. Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations. *Ann. Neurol.* 2001;50(3):293-300.

- Farrer MJ, Hulihan MM, Kachergus JM, et al. DCTN1 mutations in Perry syndrome. *Nat. Genet.* 2009;41(2):163-165.

- Feany MB, Bender WW. A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature.* 2000;404(6776):394-398.

- Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain.* 1991;114 (Pt 5):2283-2301.

- Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005;102(23):8204-8209.

- Ferrer I, Blanco R. N-myc and c-myc expression in Alzheimer disease, Huntington disease and Parkinson disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2000;77(2):270-276.

- Ferrer I, Blanco R, Carmona M, et al. Active, phosphorylation-dependent mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK), stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK), and p38 kinase expression in Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. *J Neural Transm.* 2001;108(12):1383-1396.

- Fishman-Jacob T, Reznichenko L, Youdim MBH, Mandel SA. A sporadic Parkinson disease model via silencing of the ubiquitin-proteasome/E3 ligase component SKP1A. *J. Biol. Chem.* 2009;284(47):32835-32845.

- Foltynie T, Sawcer S, Brayne C, Barker RA. The genetic basis of Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 2002;73(4):363-370.

- Forno LS. Neuropathology of Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1996;55(3):259-272.

- Fortin DL, Troyer MD, Nakamura K, et al. Lipid rafts mediate the synaptic localization of alpha-synuclein. *J. Neurosci.* 2004;24(30):6715-6723.

- Friling S, Bergsland M, Kjellander S. Activation of Retinoid X Receptor increases dopamine cell survival in models for Parkinson's disease. *BMC Neurosci.* 2009;10:146.

- Funayama M, Hasegawa K, Kowa H, et al. A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann. Neurol.* 2002;51(3):296-301.

- Furtado S, Farrer M, Tsuboi Y, et al. SCA-2 presenting as parkinsonism in an Alberta family: clinical, genetic, and PET findings. *Neurology.* 2002;59(10):1625-1627.

- Furtado S, Payami H, Lockhart PJ, et al. Profile of families with parkinsonism-predominant spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2). *Mov. Disord*. 2004;19(6):622-629.

- Gale C, Martyn C, Gale C. Tobacco, coffee, and Parkinson's disease. *BMJ*. 2003;326(7389):561-562.

- Gallo KA, Johnson GL. Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2002;3(9):663-672.

- Gandhi PN, Wang X, Zhu X, Chen SG, Wilson-Delfosse AL. The Roc domain of leucine-rich repeat kinase 2 is sufficient for interaction with microtubules. *J. Neurosci. Res*. 2008;86(8):1711-1720.

- Gandhi S, Muqit MMK, Stanyer L, et al. PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease. *Brain*. 2006;129(Pt 7):1720-1731.

- Garcia-Reitböck P, Anichtchik O, Bellucci A, et al. SNARE protein redistribution and synaptic failure in a transgenic mouse model of Parkinson's disease. *Brain*. 2010;133(7):2032-2044.

- Gasser T, Müller-Myhsok B, Wszolek ZK, et al. A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat. Genet*. 1998;18(3):262-265.

- Gasser T, Hardy J, Mizuno Y. Milestones in PD genetics. *Mov. Disord*. 2011;26(6):1042-1048.

- Gautier CA, Kitada T, Shen J. Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2008;105(32):11364-11369.

- Gegg ME, Cooper JM, Chau K-Y, et al. Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum. Mol. Genet*. 2010;19(24):4861-4870.

- Gehrke S, Imai Y, Sokol N, Lu B. Pathogenic LRRK2 negatively regulates microRNA-mediated translational repression. *Nature*. 2010;466(7306):637-641.

- Gelb DJ, Oliver E, Gilman S. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch. Neurol*. 1999;56(1):33-39.

- George A, Leahy H, Zhou J, Morin PJ. The vacuolar-ATPase inhibitor bafilomycin and mutant VPS35 inhibit canonical Wnt signaling. *Neurobiol. Dis.* 2007;26(1):125-133.

- Giasson BI, Duda JE, Quinn SM, et al. Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron*. 2002;34:521-533.

- Gibb WR, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr*. 1988;51(6):745-752.

- Gibb WR, Lees AJ. The significance of the Lewy body in the diagnosis of idiopathic Parkinson's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol*. 1989;15(1):27-44.

- Gibson G. Decanalization and the origin of complex disease. *Nat. Rev. Genet.* 2009;10(2):134-140.

- Gillardon F. Leucine-rich repeat kinase 2 phosphorylates brain tubulin-beta isoforms and modulates microtubule stability--a point of convergence in parkinsonian neurodegeneration? *J. Neurochem*. 2009;110(5):1514-1522.

- Glauser L, Sonnay S, Stafa K, Moore DJ. Parkin promotes the ubiquitination and degradation of the mitochondrial fusion factor mitofusin 1. *J. Neurochem.* 2011;118(4):636-645.

- Gloeckner CJ, Schumacher A, Boldt K, Ueffing M. The Parkinson disease-associated protein kinase LRRK2 exhibits MAPKKK activity and phosphorylates MKK3/6 and MKK4/7, in vitro. *J. Neurochem*. 2009;109(4):959-968.

- Godau J, Knauel K, Weber K, et al. Serum insulinlike growth factor 1 as possible marker for risk and early diagnosis of Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 2011;68(7):925-931.

- Goers J, Manning-Bog AB, McCormack AL, et al. Nuclear localization of alpha-synuclein and its interaction with histones. *Biochemistry*. 2003;42(28):8465-8471.

- Goetz CG, Tilley BC, Shaftman SR, et al. Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results. *Mov. Disord*. 2008;23(15):2129-2170.

- Goldwurm S, Tunesi S, Tesei S, et al. Kin-cohort analysis of LRRK2-G2019S penetrance in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2011;26(11):2144-2145.

- Gómez-Santos C, Ferrer I, Reiriz J, et al. MPP+ increases alpha-synuclein expression and ERK/MAP-kinase phosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Brain Res.* 2002;935(1-2):32-39.

- Graham DG, Tiffany SM, Bell WR Jr, Gutknecht WF. Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. *Mol. Pharmacol*. 1978;14(4):644-653.

- Greene JC, Whitworth AJ, Kuo I, et al. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in Drosophila parkin mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003;100(7):4078-4083.

- Greene JG. Current status and future directions of gene expression profiling in Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 2010. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21056669

- Greggio E, Zambrano I, Kaganovich A, et al. The Parkinson disease-associated leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) is a dimer that undergoes intramolecular autophosphorylation. *J. Biol. Chem.* 2008;283(24):16906-16914.

- Greggio E, Cookson MR. Leucine-rich repeat kinase 2 mutations and Parkinson's disease: three questions. *ASN Neuro*. 2009;1(1) :e00002.

- Greggio E, Bisaglia M, Civiero L, Bubacco L. Leucine-rich repeat kinase 2 and alpha-synuclein: intersecting pathways in the pathogenesis of Parkinson's disease? *Mol Neurodegener*. 2011;6(1):6.

- Grünblatt E, Mandel S, Jacob-Hirsch J, et al. Gene expression profiling of parkinsonian substantia nigra pars compacta; alterations in ubiquitin-proteasome, heat shock protein, iron and oxidative stress regulated proteins, cell adhesion/cellular matrix and vesicle trafficking genes. *J Neural Transm*. 2004;111(12):1543-1573.

- Gwinn-Hardy K, Chen JY, Liu HC, et al. Spinocerebellar ataxia type 2 with parkinsonism in ethnic Chinese. *Neurology*. 2000;55(6):800-805.

- Gwinn-Hardy K, Singleton A, O'Suilleabhain P, et al. Spinocerebellar ataxia type 3 phenotypically resembling parkinson disease in a black family. *Arch. Neurol*. 2001;58:296-299.

- Häbig K, Walter M, Poths S, Riess O, Bonin M. RNA interference of LRRK2-microarray expression analysis of a Parkinson's disease key player. *Neurogenetics.* 2008;9(2):83-94.

- Häbig K, Walter M, Stappert H, Riess O, Bonin M. Microarray expression analysis of human dopaminergic neuroblastoma cells after RNA interference of SNCA--a key player in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Brain Res*. 2009;1256:19-33.

- Halliday G, Lees A, Stern M. Milestones in Parkinson's disease--clinical and pathologic features. *Mov. Disord*. 2011;26(6):1015-1021.

- Hamza TH, Zabetian CP, Tenesa A, et al. Common genetic variation in the HLA region is associated with late-onset sporadic Parkinson's disease. *Nat. Genet*. 2010;42(9):781-785.

- Hartmann A, Michel PP, Troadec JD, et al. Is Bax a mitochondrial mediator in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease? *J. Neurochem.* 2001;76(6):1785-1793.

- Hatano Y, Li Y, Sato K, et al. Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism. *Ann. Neurol*. 2004;56(3):424-427.

- Hatano T, Kubo S-I, Imai S, et al. Leucine-rich repeat kinase 2 associates with lipid rafts. *Hum. Mol. Genet.* 2007;16(6):678-690.

- Hatano T, Kubo S-ichiro, Sato S, Hattori N. Pathogenesis of familial Parkinson's disease: new insights based on monogenic forms of Parkinson's disease. *J. Neurochem*. 2009;111(5):1075-1093.

- Hauser MA, Li Y-J, Xu H, et al. Expression profiling of substantia nigra in Parkinson disease, progressive supranuclear palsy, and frontotemporal dementia with parkinsonism. *Arch. Neurol.* 2005;62(6):917-921.

- Hawkes CH. The prodromal phase of sporadic Parkinson's disease: does it exist and if so how long is it? *Mov. Disord*. 2008;23(13):1799-1807.

- Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, et al. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol*. 2008;7(7):583-590.

- Hicks AA, Pétursson H, Jónsson T, et al. A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann. Neurol*. 2002;52(5):549-555.

- Hirsch EC, Breidert T, Rousselet E, et al. The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2003;991:214-228.

- Ho CC-Y, Rideout HJ, Ribe E, Troy CM, Dauer WT. The Parkinson disease protein leucine-rich repeat kinase 2 transduces death signals via Fas-associated protein with death domain and caspase-8 in a cellular model of neurodegeneration. *J. Neurosci*. 2009;29(4):1011-1016.

- Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology*. 1967;17(5):427-442.

- Hoepken H-H, Gispert S, Azizov M, et al. Parkinson patient fibroblasts show increased alpha-synuclein expression. *Exp. Neurol.* 2008;212(2):307-313.

- Höglinger GU, Breunig JJ, Depboylu C, et al. The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007;104(9):3585-3590.

- Hoozemans JJM, van Haastert ES, Eikelenboom P, et al. Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;354(3):707-711.

- Hughes AJ, Daniel SE, Lees AJ. Improved accuracy of clinical diagnosis of Lewy body Parkinson's disease. *Neurology*. 2001;57(8):1497-1499.

- Hunot S, Hirsch EC. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Ann. Neurol*. 2003;53 Suppl 3:S49-58; discussion S58-60.

- Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*. 1998;393(6686):702-705.

- Iaccarino C, Crosio C, Vitale C, et al. Apoptotic mechanisms in mutant LRRK2-mediated cell death. *Hum. Mol. Genet*. 2007;16(11):1319-1326.

- Ibáñez P, Bonnet A-M, Débarges B, et al. Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet*. 2004;364(9440):1169-1171.

- Ibáñez P, Lesage S, Janin S, et al. Alpha-synuclein gene rearrangements in dominantly inherited parkinsonism: frequency, phenotype, and mechanisms. *Arch. Neurol*. 2009;66:102-108.

- Ikemura M, Saito Y, Sengoku R, et al. Lewy body pathology involves cutaneous nerves. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 2008;67(10):945-953.

- Imai Y, Gehrke S, Wang H-Q, et al. Phosphorylation of 4E-BP by LRRK2 affects the maintenance of dopaminergic neurons in Drosophila. *EMBO J*. 2008;27(18):2432-2443.

- Imam SZ, Newport GD, Islam F, Slikker W Jr, Ali SF. Selenium, an antioxidant, protects against methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. *Brain Res*. 1999;818(2):575-578.

- Infante J, Berciano J, Volpini V, et al. Spinocerebellar ataxia type 2 with Levodopa-responsive parkinsonism culminating in motor neuron disease. *Mov. Disord*. 2004;19(7):848-852.

- Inoue K, Lupski JR. Molecular mechanisms for genomic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2002;3:199-242.

- Israeli E, Yakunin E, Zarbiv Y, et al. α-Synuclein expression selectively affects tumorigenesis in mice modeling Parkinson's disease. *PLoS ONE*. 2011;6(5):e19622.

- Itier J-M, Ibanez P, Mena MA, et al. Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Hum. Mol. Genet*. 2003;12(18):2277-2291.

- Iwashita A, Muramatsu Y, Yamazaki T, et al. Neuroprotective efficacy of the peroxisome proliferator-activated receptor delta-selective agonists in vitro and in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2007;320(3):1087-1096.

- Jaleel M, Nichols RJ, Deak M, et al. LRRK2 phosphorylates moesin at threonine-558: characterization of how Parkinson's disease mutants affect kinase activity. *Biochem. J*. 2007;405(2):307-317.

- Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 1985;82(7):2173-2177.

- Jellinger K, Paulus W, Grundke-Iqbal I, Riederer P, Youdim MB. Brain iron and ferritin in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*. 1990;2(4):327-340.

- Jellinger KA. Post mortem studies in Parkinson's disease--is it possible to detect brain areas for specific symptoms? *J. Neural Transm. Suppl*. 1999;56:1-29.

- Jellinger KA. Synuclein deposition and non-motor symptoms in Parkinson disease. *Journal of the Neurological Sciences*. 2011;310(1-2):107-111.

- Jordan-Sciutto KL, Dorsey R, Chalovich EM, Hammond RR, Achim CL. Expression patterns of retinoblastoma protein in Parkinson disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 2003;62(1):68-74.

- Kafasla P, Barrass JD, Thompson E, et al. Interaction of yeast eIF4G with spliceosome components: implications in pre-mRNA processing events. *RNA Biol*. 2009;6(5):563-574.

- Kalivendi SV, Yedlapudi D, Hillard CJ, Kalyanaraman B. Oxidants induce alternative splicing of alpha-synuclein: Implications for Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med*. 2010;48(3):377-383.

- Kao S-Y. Rescue of alpha-synuclein cytotoxicity by insulin-like growth factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2009;385(3):434-438.

- Karunakaran S, Saeed U, Mishra M, et al. Selective activation of p38 mitogen-activated protein kinase in dopaminergic neurons of substantia nigra leads to nuclear translocation of p53 in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice. *J. Neurosci.* 2008;28(47):12500-12509.

- Kim S, Jeon BS, Heo C, et al. Alpha-synuclein induces apoptosis by altered expression in human peripheral lymphocyte in Parkinson's disease. *FASEB J.* 2004;18(13):1615-1617.

- Kim RH, Peters M, Jang Y, et al. DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell*. 2005;7(3):263-273.

- Kim J-M, Hong S, Kim GP, et al. Importance of low-range CAG expansion and CAA interruption in SCA2 Parkinsonism. *Arch. Neurol*. 2007;64(10):1510-1518.

- Kim EK, Choi E-J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta*. 2010;1802(4):396-405.

- Kim K-Y, Stevens MV, Akter MH, et al. Parkin is a lipid-responsive regulator of fat uptake in mice and mutant human cells. *J. Clin. Invest.* 2011;121(9):3701-3712.

- Kim SR, Chen X, Oo TF, et al. Dopaminergic pathway reconstruction by Akt/Rheb-induced axon regeneration. *Ann. Neurol.* 2011;70(1):110-120.

- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. 1998;392(6676):605-608.

- Kitada T, Pisani A, Porter DR, et al. Impaired dopamine release and synaptic plasticity in the striatum of PINK1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007;104(27):11441-11446.

- Klein C, Pramstaller PP, Kis B, et al. Parkin deletions in a family with adult-onset, tremor-dominant parkinsonism: expanding the phenotype. *Ann. Neurol*. 2000;48(1):65-71.

- Klein C, Lohmann-Hedrich K, Rogaeva E, Schlossmacher MG, Lang AE. Deciphering the role of heterozygous mutations in genes associated with parkinsonism. *Lancet Neurol*. 2007;6(7):652-662.

- Klein C, Schlossmacher MG. Parkinson disease, 10 years after its genetic revolution: multiple clues to a complex disorder. *Neurology*. 2007;69(22):2093-2104.

- Klein C, Schneider SA, Lang AE. Hereditary parkinsonism: Parkinson disease look-alikes--an algorithm for clinicians to « PARK » genes and beyond. *Mov. Disord*. 2009;24(14):2042-2058.

- Knott C, Stern G, Wilkin GP. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol. Cell. Neurosci.* 2000;16(6):724-739.

- Kondo K, Obitsu S, Teshima R. α-Synuclein aggregation and transmission are enhanced by leucine-rich repeat kinase 2 in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2011;34(7):1078-1083.

- Kontopoulos E, Parvin JD, Feany MB. Alpha-synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity. *Hum. Mol. Genet*. 2006;15(20):3012-3023.

- Kortekaas R, Leenders KL, van Oostrom JCH, et al. Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. *Ann. Neurol*. 2005;57(2):176-179.

- Krüger R, Kuhn W, Müller T, et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 1998;18(2):106-108.

- Kubo S-ichiro, Hattori N, Mizuno Y. Recessive Parkinson's disease. *Mov. Disord*. 2006;21(7):885-893.

- Lakso M, Vartiainen S, Moilanen A-M, et al. Dopaminergic neuronal loss and motor deficits in Caenorhabditis elegans overexpressing human alpha-synuclein. *J. Neurochem.* 2003;86(1):165-172.

- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*. 1983;219(4587):979-980.

- Lastres-Becker I, Rüb U, Auburger G. Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2). *Cerebellum*. 2008;7(2):115-124.

- Lautier C, Goldwurm S, Dürr A, et al. Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease. *Am. J. Hum. Genet*. 2008;82(4):822-833.

- Le W-D, Xu P, Jankovic J, et al. Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nat. Genet*. 2003;33(1):85-89.

- Lebouvier T, Chaumette T, Damier P, et al. Pathological lesions in colonic biopsies during Parkinson's disease. *Gut*. 2008;57(12):1741-1743.

- Lebouvier T, Chaumette T, Paillusson S, et al. The second brain and Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci*. 2009;30(5):735-741.

- Lebouvier T, Neunlist M, Bruley des Varannes S, et al. Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS ONE*. 2010;5(9):e12728.

- Lee SS, Kim YM, Junn E, et al. Cell cycle aberrations by alpha-synuclein over-expression and cyclin B immunoreactivity in Lewy bodies. *Neurobiol. Aging*. 2003;24(5):687-696.

- Lee H-J, Patel S, Lee S-J. Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J. Neurosci*. 2005;25(25):6016-6024.

- Lee VM-Y, Trojanowski JQ. Mechanisms of Parkinson's disease linked to pathological alpha-synuclein: new targets for drug discovery. *Neuron*. 2006;52(1):33-38.

- Lee SB, Kim W, Lee S, Chung J. Loss of LRRK2/PARK8 induces degeneration of dopaminergic neurons in Drosophila. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2007;358(2):534-539.

- Lee S-J, Jeon H, Kandror KV. Alpha-synuclein is localized in a subpopulation of rat brain synaptic vesicles. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2008;68(4):509-515.

- Lee J-E, Nam H-Y, Shim S-M, et al. Expression phenotype changes of EBV-transformed lymphoblastoid cell lines during long-term subculture and its clinical significance. *Cell Prolif*. 2010;43(4):378-384.

- Lee J-Y, Nagano Y, Taylor JP, Lim KL, Yao T-P. Disease-causing mutations in parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6-dependent mitophagy. *J. Cell Biol*. 2010;189(4):671-679.

- Lee SJ, Lim HS, Masliah E, Lee HJ. Protein aggregate spreading in neurodegenerative diseases: problems and perspectives. Neurosci Res. 2011;70(4):339-348.

- Lees AJ, Hardy J, Revesz T. Parkinson's disease. *Lancet*. 2009;373(9680):2055-2066.

- Leroy E, Boyer R, Auburger G, et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature*. 1998;395(6701):451-452.

- Lesage S, Dürr A, Tazir M, et al. LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs. *N. Engl. J. Med*. 2006;354(4):422-423.

- Lesage S, Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum. Mol. Genet*. 2009;18(R1):R48-59.

- Lesnick TG, Papapetropoulos S, Mash DC, et al. A genomic pathway approach to a complex disease: axon guidance and Parkinson disease. *PLoS Genet*. 2007;3(6):e98.

- Leveugle B, Faucheux BA, Bouras C, et al. Cellular distribution of the iron-binding protein lactotransferrin in the mesencephalon of Parkinson's disease cases. *Acta Neuropathol*. 1996;91(6):566-572.

- Levy OA, Malagelada C, Greene LA. Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. *Apoptosis*. 2009;14(4):478-500.

- Lewy FH. Paralysis agitans. Pathologische anatomie. In: Lewandowsky. Handbuch der Neurologie. Berlin: Springer Verlag, 1912: 920-933.

- Li J, Uversky VN, Fink AL. Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. *Biochemistry*. 2001;40(38):11604-11613.

- Li Q-X, Mok SS, Laughton KM, et al. Plasma alpha-synuclein is decreased in subjects with Parkinson's disease. *Exp. Neurol*. 2007;204(2):583-588.

- Li W-W, Yang R, Guo J-C, et al. Localization of alpha-synuclein to mitochondria within midbrain of mice. *Neuroreport*. 2007;18(15):1543-1546.

- Li J-Y, Englund E, Holton JL, et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat. Med*. 2008;14(5):501-503.

- Li Y, Liu W, Oo TF, et al. Mutant LRRK2(R1441G) BAC transgenic mice recapitulate cardinal features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci*. 2009;12(7):826-828.

- Li Z, Su Z, Wen Z, Shi L, Chen T. Microarray platform consistency is revealed by biologically functional analysis of gene expression profiles. *BMC Bioinformatics*. 2009;10 Suppl 11:S12.

- Li X, Patel JC, Wang J, et al. Enhanced striatal dopamine transmission and motor performance with LRRK2 overexpression in mice is eliminated by familial Parkinson's disease mutation G2019S. *J. Neurosci*. 2010;30(5):1788-1797.

- Lim SW, Zhao Y, Chua E, et al. Genetic analysis of SCA2, 3 and 17 in idiopathic Parkinson's disease. *Neurosci. Lett*. 2006;403(1-2):11-14.

- Liu Z, Wang X, Yu Y, et al. A Drosophila model for LRRK2-linked parkinsonism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2008;105(7):2693-2698.

- Liu J, Tang T-S, Tu H, et al. Deranged calcium signaling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 2. *J. Neurosci*. 2009;29(29):9148-9162.

- Liu R, Gao X, Lu Y, Chen H. Meta-analysis of the relationship between Parkinson disease and melanoma. *Neurology*. 2011;76(23):2002-2009.

- Liu W, Acín-Peréz R, Geghman KD, et al. Pink1 regulates the oxidative phosphorylation machinery via mitochondrial fission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2011;108(31):12920-12924.

- Liu X, Lee YJ, Liou L-C, et al. Alpha-synuclein functions in the nucleus to protect against hydroxyurea-induced replication stress in yeast. *Hum. Mol. Genet*. 2011;20(17):3401-3414.

- Liu X, Cheng R, Verbitsky M, et al. Genome-Wide Association Study Identifies Candidate Genes for Parkinson's Disease in an Ashkenazi Jewish Population. *BMC Med Genet*. 2011;12(1):104.

- Looyenga BD, Furge KA, Dykema KJ, et al. Chromosomal amplification of leucine-rich repeat kinase-2 (LRRK2) is required for oncogenic MET signaling in papillary renal and thyroid carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2011;108(4):1439-1444.

- Lotharius J, Brundin P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat. Rev. Neurosci*. 2002;3(12):932-942.

- Lu C-S, Wu Chou Y-H, Kuo P-C, Chang H-C, Weng Y-H. The parkinsonian phenotype of spinocerebellar ataxia type 2. *Arch. Neurol.* 2004;61(1):35-38.

- Lücking CB, Dürr A, Bonifati V, et al. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N. Engl. J. Med.* 2000;342(21):1560-1567.

- MacLeod D, Dowman J, Hammond R, et al. The familial Parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology. *Neuron*. 2006;52(4):587-593.

- Madhunapantula SV, Robertson GP. Therapeutic Implications of Targeting AKT Signaling in Melanoma. *Enzyme Res.* 2011;2011:327923.

- Maes OC, Xu S, Yu B, et al. Transcriptional profiling of Alzheimer blood mononuclear cells by microarray. *Neurobiol. Aging*. 2007;28(12):1795-1809.

- Mamane Y, Petroulakis E, Rong L, et al. eIF4E--from translation to transformation. *Oncogene*. 2004;23(18):3172-3179.

- Mandel S, Grunblatt E, Riederer P, et al. Gene expression profiling of sporadic Parkinson's disease substantia nigra pars compacta reveals impairment of ubiquitin-proteasome subunits, SKP1A, aldehyde dehydrogenase, and chaperone HSC-70. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2005;1053:356-375.

- Mandel SA, Sagi Y, Amit T. Rasagiline promotes regeneration of substantia nigra dopaminergic neurons in post-MPTP-induced Parkinsonism via activation of tyrosine kinase receptor signaling pathway. *Neurochem. Res.* 2007;32(10):1694-1699.

- Mandel SA, Fishman-Jacob T, Youdim MBH. Modeling sporadic Parkinson's disease by silencing the ubiquitin E3 ligase component, SKP1A. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2009;15 Suppl 3:S148-151.

- Mar JC, Matigian NA, Mackay-Sim A, et al. Variance of gene expression identifies altered network constraints in neurological disease. *PLoS Genet.* 2011;7(8):e1002207.

- Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, et al. Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA*. 2006;296(6):661-670.

- Martin LJ, Pan Y, Price AC, et al. Parkinson's disease alpha-synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death. *J. Neurosci.* 2006;26(1):41-50.

- Martin I, Dawson VL, Dawson TM. Recent advances in the genetics of Parkinson's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2011;12:301-325.

- Martinez-Vicente M, Cuervo AM. Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol*. 2007;6(4):352-361.

- Marx FP, Holzmann C, Strauss KM, et al. Identification and functional characterization of a novel R621C mutation in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 2003;12(11):1223-1231.

- Mata IF, Wedemeyer WJ, Farrer MJ, Taylor JP, Gallo KA. LRRK2 in Parkinson's disease: protein domains and functional insights. *Trends Neurosci*. 2006;29(5):286-293.

- Matheny RW Jr, Adamo ML. Role of Akt isoforms in IGF-I-mediated signaling and survival in myoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009;389(1):117-121.

- Matigian N, Abrahamsen G, Sutharsan R, et al. Disease-specific, neurosphere-derived cells as models for brain disorders. *Dis Model Mech.* 2010;3(11-12):785-798.

- Matsumine H, Saito M, Shimoda-Matsubayashi S, et al. Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *Am. J. Hum. Genet*. 1997;60(3):588-596.

- Matsuo Y, Kamitani T. Parkinson's disease-related protein, alpha-synuclein, in malignant melanoma. *PLoS ONE*. 2010;5(5):e10481.

- Mattis S. Mental status examination for organic mental syndrome in the elderly patient. In: Bellak L, Karasy TE. Geriatric psychiatry. New York: Gruse and Stratton, 1976: 77–121.

- Mazzulli JR, Xu Y-H, Sun Y, et al. Gaucher disease glucocerebrosidase and α-synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell*. 2011;146(1):37-52.

- McCarthy JJ, Linnertz C, Saucier L, et al. The effect of SNCA 3' region on the levels of SNCA-112 splicing variant. *Neurogenetics*. 2011;12(1):59-64.

- McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*. 1988;38(8):1285-1291.

- McGeer PL, Schwab C, Parent A, Doudet D. Presence of reactive microglia in monkey substantia nigra years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration. *Ann. Neurol*. 2003;54(5):599-604.

- McNaught KS, Olanow CW, Halliwell B, Isacson O, Jenner P. Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci*. 2001;2(8):589-594.

- Meier F, Busch S, Lasithiotakis K, et al. Combined targeting of MAPK and AKT signalling pathways is a promising strategy for melanoma treatment. *Br. J. Dermatol*. 2007;156(6):1204-1213.

- Melrose HL, Dächsel JC, Behrouz B, et al. Impaired dopaminergic neurotransmission and microtubule-associated protein tau alterations in human LRRK2 transgenic mice. *Neurobiol. Dis*. 2010;40(3):503-517.

- Miele C, Rochford JJ, Filippa N, Giorgetti-Peraldi S, Van Obberghen E. Insulin and insulin-like growth factor-I induce vascular endothelial growth factor mRNA expression via different signaling pathways. *J. Biol. Chem*. 2000;275(28):21695-21702.

- Mihara M, Erster S, Zaika A, et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell*. 2003;11(3):577-590.

- Mihara T, Nakashima M, Kuroiwa A, et al. 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*. 2008;14(1):46-51.

- Miklossy J, Doudet DD, Schwab C, et al. Role of ICAM-1 in persisting inflammation in Parkinson disease and MPTP monkeys. *Exp. Neurol*. 2006;197(2):275-283.

- Miller DW, Hague SM, Clarimon J, et al. Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. *Neurology*. 2004;62(10):1835-1838.

- Miller RM, Callahan LM, Casaceli C, et al. Dysregulation of gene expression in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse substantia nigra. *J. Neurosci*. 2004;24(34):7445-7454.

- Miller RM, Kiser GL, Kaysser-Kranich TM, et al. Robust dysregulation of gene expression in substantia nigra and striatum in Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis*. 2006;21(2):305-313.

- Miller RM, Kiser GL, Kaysser-Kranich T, et al. Wild-type and mutant alpha-synuclein induce a multi-component gene expression profile consistent with shared pathophysiology in different transgenic mouse models of PD. *Exp. Neurol*. 2007;204(1):421-432.

- Mills RD, Sim CH, Mok SS, et al. Biochemical aspects of the neuroprotective mechanism of PTEN-induced kinase-1 (PINK1). *J. Neurochem*. 2008;105(1):18-33.

- Mochizuki H, Goto K, Mori H, Mizuno Y. Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 1996;137(2):120-123.

- Modoni A, Contarino MF, Bentivoglio AR, et al. Prevalence of spinocerebellar ataxia type 2 mutation among Italian Parkinsonian patients. *Mov. Disord.* 2007;22(3):324-327.

- Momeni P, Lu C-S, Chou Y-HW, et al. Taiwanese cases of SCA2 are derived from a single founder. *Mov. Disord.* 2005;20(12):1633-1636.

- Monahan AJ, Warren M, Carvey PM. Neuroinflammation and peripheral immune infiltration in Parkinson's disease: an autoimmune hypothesis. *Cell Transplant*. 2008;17(4):363-372.

- Moran LB, Duke DC, Deprez M, et al. Whole genome expression profiling of the medial and lateral substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurogenetics.* 2006;7(1):1-11.

- Moran LB, Graeber MB. Towards a pathway definition of Parkinson's disease: a complex disorder with links to cancer, diabetes and inflammation. *Neurogenetics.* 2008;9(1):1-13.

- Moreau C, Gosset P, Kluza J, et al. Deregulation of the hypoxia inducible factor-1α pathway in monocytes from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neuroscience*. 2011;172:110-117.

- Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced Online*. 2006;8:175-193.

- Mortiboys H, Johansen KK, Aasly JO, Bandmann O. Mitochondrial impairment in patients with Parkinson disease with the G2019S mutation in LRRK2. *Neurology*. 2010;75(22):2017-2020.

- Mougenot AL, Nicot S, Bencsik A, et al. Prion-like acceleration of a synucleinopathy in a transgenic mouse model. *Neurobiol Aging*. 2011. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ 21813214

- Mount MP, Lira A, Grimes D, et al. Involvement of interferon-gamma in microglial-mediated loss of dopaminergic neurons. *J. Neurosci*. 2007;27(12):3328-3337.

- Mueller JC, Fuchs J, Hofer A, et al. Multiple regions of alpha-synuclein are associated with Parkinson's disease. *Ann. Neurol*. 2005;57(4):535-541.

- Murata H, Sakaguchi M, Jin Y, et al. A new cytosolic pathway from a Parkinson disease-associated kinase, BRPK/PINK1: activation of AKT via mTORC2. *J. Biol. Chem.* 2011;286(9):7182-7189.

- Murray IVJ, Giasson BI, Quinn SM, et al. Role of alpha-synuclein carboxy-terminus on fibril formation in vitro. *Biochemistry*. 2003;42(28):8530-8540.

- Mutez E, Duhamel A, Defebvre L, et al. Lipid-lowering drugs are associated with delayed onset and slower course of Parkinson's disease. *Pharmacol. Res.* 2009;60(1):41-45.

- Mutez E, Larvor L, Leprêtre F, et al. Transcriptional profile of Parkinson blood mononuclear cells with LRRK2 mutation. *Neurobiol. Aging*. 2011;32(10):1839-1848.

- Mutez E, Leprêtre F, Le Rhun E, et al. SNCA locus duplication carriers: from genetics to Parkinson disease phenotypes. *Hum. Mutat.* 2011;32(4):E2079-2090.

- Nair VD. Activation of p53 signaling initiates apoptotic death in a cellular model of Parkinson's disease. *Apoptosis*. 2006;11(6):955-966.

- Nair VD, McNaught KSP, González-Maeso J, Sealfon SC, Olanow CW. p53 mediates nontranscriptional cell death in dopaminergic cells in response to proteasome inhibition. *J. Biol. Chem.* 2006;281(51):39550-39560.

- Nakaso K, Yoshimoto Y, Yano H, Takeshima T, Nakashima K. p53-mediated mitochondrial dysfunction by proteasome inhibition in dopaminergic SH-SY5Y cells. *Neurosci. Lett.* 2004;354(3):213-216.

- Nakaso K, Ito S, Nakashima K. Caffeine activates the PI3K/Akt pathway and prevents apoptotic cell death in a Parkinson's disease model of SH-SY5Y cells. *Neurosci. Lett.* 2008;432(2):146-150.

- Nalls MA, Plagnol V, Hernandez DG, et al. Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet*. 2011;377(9766):641-649.

- Nanetti L, Fancellu R, Tomasello C, et al. Rare association of motor neuron disease and spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2): a new case and review of the literature. *J. Neurol.* 2009;256(11):1926-1928.

- Narendra D, Tanaka A, Suen D-F, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol*. 2008;183(5):795-803.

- Nemani VM, Lu W, Berge V, et al. Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. *Neuron*. 2010;65(1):66-79.

- Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, et al. Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Ann. Neurol*. 2006;59(2):298-309.

- Nonhoff U, Ralser M, Welzel F, et al. Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules. *Mol. Biol. Cell*. 2007;18(4):1385-1396.

- Obara Y, Nakahata N. The signaling pathway leading to extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) activation via G-proteins and ERK5-dependent neurotrophic effects. *Mol. Pharmacol.* 2010;77(1):10-16.

- Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Benitez-Temino B, et al. Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov. Disord*. 2008;23 Suppl 3:S548-559.

- Obeso JA. Modeling clinical features of neurodegeneration. *Nat. Med*. 2010;16(12):1372.

- Ohnuki T, Nakamura A, Okuyama S, Nakamura S. Gene expression profiling in progressively MPTP-lesioned macaques reveals molecular pathways associated with sporadic Parkinson's disease. *Brain Res.* 2010;1346:26-42.

- Ohta E, Kawakami F, Kubo M, Obata F. LRRK2 directly phosphorylates Akt1 as a possible physiological substrate: impairment of the kinase activity by Parkinson's disease-associated mutations. *FEBS Lett.* 2011;585(14):2165-2170.

- Olanow CW, Rascol O, Hauser R, et al. A double-blind, delayed-start trial of rasagiline in Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med*. 2009;361(13):1268-1278.

- Ozelius LJ, Senthil G, Saunders-Pullman R, et al. LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N. Engl. J. Med*. 2006;354(4):424-425.

- Pacelli C, De Rasmo D, Signorile A, et al. Mitochondrial defect and PGC-1α dysfunction in parkin-associated familial Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta*. 2011;1812(8):1041-1053.

- Paillusson S, Tasselli M, Lebouvier T, et al. α-Synuclein expression is induced by depolarization and cyclic AMP in enteric neurons. *J. Neurochem.* 2010;115(3):694-706.

- Paisán-Ruíz C, Jain S, Evans EW, et al. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*. 2004;44(4):595-600.

- Paisan-Ruiz C, Bhatia KP, Li A, et al. Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Ann. Neurol*. 2009;65(1):19-23.

- Pan J, Qian J, Zhang Y, et al. Small peptide inhibitor of JNKs protects against MPTP-induced nigral dopaminergic injury via inhibiting the JNK-signaling pathway. *Lab. Invest.* 2010;90(2):156-167.

- Pandey AP, Haque F, Rochet J-C, Hovis JS. α-Synuclein-induced tubule formation in lipid bilayers. *J Phys Chem B*. 2011;115(19):5886-5893.

- Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, et al. Genome-wide linkage analysis and evidence of gene-by-gene interactions in a sample of 362 multiplex Parkinson disease families. *Hum. Mol. Genet*. 2003;12(20):2599-2608.

- Pankratz N, Wilk JB, Latourelle JC, et al. Genomewide association study for susceptibility genes contributing to familial Parkinson disease. *Hum. Genet*. 2009;124(6):593-605.

- Papapetropoulos S, Ffrench-Mullen J, McCorquodale D, et al. Multiregional gene expression profiling identifies MRPS6 as a possible candidate gene for Parkinson's disease. *Gene Expr.* 2006;13(3):205-215.

- Parihar MS, Parihar A, Fujita M, Hashimoto M, Ghafourifar P. Alpha-synuclein overexpression and aggregation exacerbates impairment of mitochondrial functions by augmenting oxidative stress in human neuroblastoma cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2009;41(10):2015-2024.

- Park J, Lee SB, Lee S, et al. Mitochondrial dysfunction in Drosophila PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature*. 2006;441(7097):1157-1161.

- Parkinson J. An essay on the shaking palsy. London: Sherwood, Neely and Jones, 1817.

- Payami H, Nutt J, Gancher S, et al. SCA2 may present as levodopa-responsive parkinsonism. *Mov. Disord.* 2003;18(4):425-429.

- Pedotti P, 't Hoen PAC, Vreugdenhil E, et al. Can subtle changes in gene expression be consistently detected with different microarray platforms? *BMC Genomics*. 2008;9:124.

- Penzkofer T, Dandekar T, Zemojtel T. L1Base: from functional annotation to prediction of active LINE-1 elements. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(Database issue):D498-500.

- Perez RG, Waymire JC, Lin E, et al. A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J. Neurosci*. 2002;22(8):3090-3099.

- Piccoli G, Condliffe SB, Bauer M, et al. LRRK2 controls synaptic vesicle storage and mobilization within the recycling pool. *J. Neurosci*. 2011;31(6):2225-2237.

- Plowey ED, Cherra SJ 3rd, Liu Y-J, Chu CT. Role of autophagy in G2019S-LRRK2-associated neurite shortening in differentiated SH-SY5Y cells. *J. Neurochem*. 2008;105(3):1048-1056.

- Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, et al. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science*. 1996;274(5290):1197-1199.

- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997;276(5321):2045-2047.

- Pons B, Armengol G, Livingstone M, et al. Association between LRRK2 and 4E-BP1 protein levels in normal and malignant cells. *Oncology Reports*. 2011. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21922152

- Pulst S-M, Santos N, Wang D, et al. Spinocerebellar ataxia type 2: polyQ repeat variation in the CACNA1A calcium channel modifies age of onset. *Brain*. 2005;128(Pt 10):2297-2303.

- Qing H, Wong W, McGeer EG, McGeer PL. Lrrk2 phosphorylates alpha synuclein at serine 129: Parkinson disease implications. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2009;387(1):149-152.

- Quesada A, Lee BY, Micevych PE. PI3 kinase/Akt activation mediates estrogen and IGF-1 nigral DA neuronal neuroprotection against a unilateral rat model of Parkinson's disease. *Dev Neurobiol*. 2008;68(5):632-644.

- Ralser M, Albrecht M, Nonhoff U, et al. An integrative approach to gain insights into the cellular function of human ataxin-2. *J. Mol. Biol*. 2005;346(1):203-214.

- Ramirez A, Heimbach A, Gründemann J, et al. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat. Genet*. 2006;38(10):1184-1191.

- Ramírez-Valle F, Braunstein S, Zavadil J, Formenti SC, Schneider RJ. eIF4GI links nutrient sensing by mTOR to cell proliferation and inhibition of autophagy. *J. Cell Biol*. 2008;181(2):293-307.

- Raser JM, O'Shea EK. Noise in gene expression: origins, consequences, and control. *Science*. 2005;309(5743):2010-2013.

- Ren H, Fu K, Wang D, Mu C, Wang G. Oxidized DJ-1 Interacts with the Mitochondrial Protein BCL-XL. *J. Biol. Chem.* 2011;286(40):35308-35317.

- Ren Y, Jiang H, Yang F, Nakaso K, Feng J. Parkin protects dopaminergic neurons against microtubule-depolymerizing toxins by attenuating microtubule-associated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* 2009;284(6):4009-4017.

- Reynolds AD, Banerjee R, Liu J, Gendelman HE, Mosley RL. Neuroprotective activities of CD4+CD25+ regulatory T cells in an animal model of Parkinson's disease. *J. Leukoc. Biol.* 2007;82(5):1083-1094.

- Rideout HJ, Larsen KE, Sulzer D, Stefanis L. Proteasomal inhibition leads to formation of ubiquitin/alpha-synuclein-immunoreactive inclusions in PC12 cells. *J. Neurochem*. 2001;78(4):899-908.

- Rideout HJ, Dietrich P, Wang Q, Dauer WT, Stefanis L. alpha-synuclein is required for the fibrillar nature of ubiquitinated inclusions induced by proteasomal inhibition in primary neurons. *J. Biol. Chem*. 2004;279(45):46915-46920.

- Rideout HJ, Lang-Rollin I, Stefanis L. Involvement of macroautophagy in the dissolution of neuronal inclusions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004;36(12):2551-2562.

- Riess O, Laccone FA, Gispert S, et al. SCA2 trinucleotide expansion in German SCA patients. *Neurogenetics*. 1997;1(1):59-64.

- Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007;8(7):519-529.

- Ros-Bernal F, Hunot S, Herrero MT, et al. Microglial glucocorticoid receptors play a pivotal role in regulating dopaminergic neurodegeneration in parkinsonism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011;108(16):6632-6637.

- Ross OA, O'Neill C, Rea IM, et al. Functional promoter region polymorphism of the proinflammatory chemokine IL-8 gene associates with Parkinson's disease in the Irish. *Hum. Immunol*. 2004;65(4):340-346.

- Ross OA, Braithwaite AT, Skipper LM, et al. Genomic investigation of alpha-synuclein multiplication and parkinsonism. *Ann. Neurol*. 2008;63(6):743-750.

- Ross OA, Wu Y-R, Lee M-C, et al. Analysis of Lrrk2 R1628P as a risk factor for Parkinson's disease. *Ann. Neurol*. 2008;64(1):88-92.

- Ross OA, Rutherford NJ, Baker M, et al. Ataxin-2 repeat-length variation and neurodegeneration. *Hum. Mol. Genet.* 2011;20(16):3207-3212.

- Ross OA, Soto-Ortolaza AI, Heckman MG, et al. Association of LRRK2 exonic variants with susceptibility to Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurology*. 2011;10(10):898-908.

- Saad M, Lesage S, Saint-Pierre A, et al. Genome-wide association study confirms BST1 and suggests a locus on 12q24 as the risk loci for Parkinson's disease in the European population. *Hum. Mol. Genet*. 2011;20(3):615-627.

- Saha S, Guillily MD, Ferree A, et al. LRRK2 modulates vulnerability to mitochondrial dysfunction in Caenorhabditis elegans. *J. Neurosci*. 2009;29(29):9210-9218.

- Sakaguchi-Nakashima A, Meir JY, Jin Y, Matsumoto K, Hisamoto N. LRK-1, a C. elegans PARK8-related kinase, regulates axonal-dendritic polarity of SV proteins. *Curr. Biol*. 2007;17(7):592-598.

- Sancho RM, Law BMH, Harvey K. Mutations in the LRRK2 Roc-COR tandem domain link Parkinson's disease to Wnt signalling pathways. *Hum. Mol. Genet.* 2009;18(20):3955-3968.

- Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, et al. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat. Genet*. 2009;41(12):1303-1307.

- Satterfield TF, Jackson SM, Pallanck LJ. A Drosophila homolog of the polyglutamine disease gene SCA2 is a dosage-sensitive regulator of actin filament formation. *Genetics*. 2002;162(4):1687-1702.

- Satterfield TF, Pallanck LJ. Ataxin-2 and its Drosophila homolog, ATX2, physically assemble with polyribosomes. *Hum. Mol. Genet*. 2006;15(16):2523-2532.

- Saunders-Pullman R, Barrett MJ, Stanley KM, et al. LRRK2 G2019S mutations are associated with an increased cancer risk in Parkinson disease. *Mov. Disord.* 2010;25(15):2536-2541.

- Savica R, Rocca WA, Ahlskog JE. When does Parkinson disease start? *Arch. Neurol*. 2010;67(7):798-801.

- Savitt JM, Dawson VL, Dawson TM. Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. *J. Clin. Invest*. 2006;116(7):1744-1754.

- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, et al. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 1990;54(3):823-827.

- Schapira AH. Evidence for mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease--a critical appraisal. *Mov. Disord.* 1994;9(2):125-138.

- Schapira AHV, Tolosa E. Molecular and clinical prodrome of Parkinson disease: implications for treatment. *Nat Rev Neurol*. 2010;6(6):309-317.

- Schapira AH, Jenner P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov. Disord*. 2011;26(6):1049-1055.

- Scherzer CR, Eklund AC, Morse LJ, et al. Molecular markers of early Parkinson's disease based on gene expression in blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007;104(3):955-960.

- Schlossmacher MG, Frosch MP, Gai WP, et al. Parkin localizes to the Lewy bodies of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies. *Am. J. Pathol*. 2002;160(5):1655-1667.

- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-1108.

- Shan D-E, Liu R-S, Sun C-M, et al. Presence of spinocerebellar ataxia type 2 gene mutation in a patient with apparently sporadic Parkinson's disease: clinical implications. *Mov. Disord*. 2004;19(11):1357-1360.

- Shehadeh LA, Yu K, Wang L, et al. SRRM2, a potential blood biomarker revealing high alternative splicing in Parkinson's disease. *PLoS ONE*. 2010;5(2):e9104.

- Shi L, Reid LH, Jones WD, et al. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat. Biotechnol.* 2006;24(9):1151-1161.

- Shimura H, Hattori N, Kubo S i, et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet*. 2000;25(3):302-305.

- Shin N, Jeong H, Kwon J, et al. LRRK2 regulates synaptic vesicle endocytosis. *Exp. Cell Res.* 2008;314(10):2055-2065.

- Shin J-H, Ko HS, Kang H, et al. PARIS (ZNF746) repression of PGC-1α contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell*. 2011;144(5):689-702.

- Shinde S, Pasupathy K. Respiratory-chain enzyme activities in isolated mitochondria of lymphocytes from patients with Parkinson's disease: preliminary study. *Neurol India*. 2006;54(4):390-393.

- Shoulson I, Parkinson Study Group, PRECEPT Investigators. Mixed lineage kinase inhibitor CEP-1347 fails to delay disability in early Parkinson disease. *Neurology*. 2007;69(15):1480-1490.

- Shtilerman MD, Ding TT, Lansbury PT Jr. Molecular crowding accelerates fibrillization of alpha-synuclein: could an increase in the cytoplasmic protein concentration induce Parkinson's disease? *Biochemistry*. 2002;41(12):3855-3860.

- Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 2009;361(17):1651-1661.

- Silvera D, Arju R, Darvishian F, et al. Essential role for eIF4GI overexpression in the pathogenesis of inflammatory breast cancer. *Nat. Cell Biol.* 2009;11(7):903-908.

- Silvestri L, Caputo V, Bellacchio E, et al. Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Hum. Mol. Genet.* 2005;14(22):3477-3492.

- Simón-Sánchez J, Schulte C, Bras JM, et al. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 2009;41(12):1308-1312.

- Simón-Sánchez J, van Hilten JJ, van de Warrenburg B, et al. Genome-wide association study confirms extant PD risk loci among the Dutch. *Eur. J. Hum. Genet*. 2011;19(6):655-661.

- Simunovic F, Yi M, Wang Y, et al. Gene expression profiling of substantia nigra dopamine neurons: further insights into Parkinson's disease pathology. *Brain*. 2009;132(Pt 7):1795-1809.

- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*. 2003;302(5646):841.

- Smith PD, Crocker SJ, Jackson-Lewis V, et al. Cyclin-dependent kinase 5 is a mediator of dopaminergic neuron loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003;100(23):13650-13655.

- Smith WW, Pei Z, Jiang H, et al. Kinase activity of mutant LRRK2 mediates neuronal toxicity. *Nat. Neurosci*. 2006;9(10):1231-1233.

- Sobczak K, Krzyzosiak WJ. CAG repeats containing CAA interruptions form branched hairpin structures in spinocerebellar ataxia type 2 transcripts. *J. Biol. Chem.* 2005;280(5):3898-3910.

- Soldner F, Laganière J, Cheng AW, et al. Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. *Cell*. 2011;146(2):318-331.

- Sonenberg N, Hinnebusch AG. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*. 2009;136(4):731-745.

- Soreq L, Israel Z, Bergman H, Soreq H. Advanced microarray analysis highlights modified neuro-immune signaling in nucleated blood cells from Parkinson's disease patients. *J. Neuroimmunol.* 2008;201-202:227-236.

- Spencer CCA, Plagnol V, Strange A, et al. Dissection of the genetics of Parkinson's disease identifies an additional association 5' of SNCA and multiple associated haplotypes at 17q21. *Hum. Mol. Genet.* 2011;20(2):345-353.

- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997;388(6645):839-840.

- Spina MB, Cohen G. Dopamine turnover and glutathione oxidation: implications for Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989;86(4):1398-1400.

- Spira PJ, Sharpe DM, Halliday G, Cavanagh J, Nicholson GA. Clinical and pathological features of a Parkinsonian syndrome in a family with an Ala53Thr alpha-synuclein mutation. *Ann. Neurol.* 2001;49(3):313-319.

- Srinivasan BS, Doostzadeh J, Absalan F, et al. Whole genome survey of coding SNPs reveals a reproducible pathway determinant of Parkinson disease. *Hum. Mutat.* 2009;30(2):228-238.

- Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY)*. 2011;3(3):192-222.

- Stefanis L, Larsen KE, Rideout HJ, Sulzer D, Greene LA. Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. *J. Neurosci*. 2001;21(24):9549-9560.

- Storey JD, Madeoy J, Strout JL, et al. Gene-expression variation within and among human populations. *Am. J. Hum. Genet.* 2007;80(3):502-509.

- Storvik M, Arguel M-J, Schmieder S, et al. Genes regulated in MPTP-treated macaques and human Parkinson's disease suggest a common signature in prefrontal cortex. *Neurobiol. Dis.* 2010;38(3):386-394.

- Strauss KM, Martins LM, Plun-Favreau H, et al. Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 2005;14(15):2099-2111.

- Su M, Shi J-J, Yang Y-P, et al. HDAC6 regulates aggresome-autophagy degradation pathway of α-synuclein in response to MPP+-induced stress. *J. Neurochem.* 2011;117:112-120.

- Sutherland GT, Matigian NA, Chalk AM, et al. A cross-study transcriptional analysis of Parkinson's disease. *PLoS ONE*. 2009;4(3):e4955.

- Tan EK, Shen H, Tan JMM, et al. Differential expression of splice variant and wild-type parkin in sporadic Parkinson's disease. *Neurogenetics*. 2005;6(4):179-184.

- Tan E-K, Chandran VR, Fook-Chong S, et al. Alpha-synuclein mRNA expression in sporadic Parkinson's disease. *Mov. Disord*. 2005;20(5):620-623.

- Tan E-K. The role of common genetic risk variants in Parkinson disease. *Clin. Genet*. 2007;72(5):387-393.

- Tang Y, Schapiro MB, Franz DN, et al. Blood expression profiles for tuberous sclerosis complex 2, neurofibromatosis type 1, and Down's syndrome. *Ann. Neurol*. 2004;56(6):808-814.

- Tatton NA. Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 2000;166(1):29-43.

- Tatton WG, Chalmers-Redman R, Brown D, Tatton N. Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann. Neurol.* 2003;53 Suppl 3:S61-70; discussion S70-72.

- Theodosiou A, Smith A, Gillieron C, Arkinstall S, Ashworth A. MKP5, a new member of the MAP kinase phosphatase family, which selectively dephosphorylates stress-activated kinases. *Oncogene*. 1999;18(50):6981-6988.

- Thomas KJ, McCoy MK, Blackinton J, et al. DJ-1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway to control mitochondrial function and autophagy. *Hum. Mol. Genet*. 2011;20(1):40-50.

- Timmons S, Coakley MF, Moloney AM, O' Neill C. Akt signal transduction dysfunction in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 2009;467(1):30-35.

- Tolosa E, Wenning G, Poewe W. The diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2006;5(1):75-86.

- Tong Y, Yamaguchi H, Giaime E, et al. Loss of leucine-rich repeat kinase 2 causes impairment of protein degradation pathways, accumulation of alpha-synuclein, and apoptotic cell death in aged mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010;107(21):9879-9884.

- Toyoshima Y, Tanaka H, Shimohata M, et al. Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) is associated with TDP-43 pathology. *Acta Neuropathol.* 2011;122(3):375-378.

- Trimmer PA, Bennett JP Jr. The cybrid model of sporadic Parkinson's disease. *Exp. Neurol*. 2009;218(2):320-325.

- Tu L, Liu Z, He X, et al. Over-expression of eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 correlates with tumor progression and poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma. *Mol. Cancer*. 2010;9:78.

- Ullrich C, Mlekusch R, Kuschnig A, Marksteiner J, Humpel C. Ubiquitin enzymes, ubiquitin and proteasome activity in blood mononuclear cells of MCI, Alzheimer and Parkinson patients. *Curr Alzheimer Res.* 2010;7(6):549-555.

- Ulusoy A, Decressac M, Kirik D, Björklund A. Viral vector-mediated overexpression of α-synuclein as a progressive model of Parkinson's disease. *Prog. Brain Res.* 2010;184:89-111.

- Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharmacol*. 1968;5(1):107-110.

- Ungerstedt U, Ljungberg T, Steg G. Behavioral, physiological, and neurochemical changes after 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigro-striatal dopamine neurons. *Adv Neurol*. 1974;5:421-426.

- Valente EM, Bentivoglio AR, Dixon PH, et al. Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. *Am. J. Hum. Genet*. 2001;68(4):895-900.

- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*. 2004;304(5674):1158-1160.

- van Duijn CM, Dekker MC, Bonifati V, et al. Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36. *Am. J. Hum. Genet*. 2001;69(3):629-634.

- Veeriah S, Taylor BS, Meng S, et al. Somatic mutations of the Parkinson's disease-associated gene PARK2 in glioblastoma and other human malignancies. *Nat. Genet.* 2010;42(1):77-82.

- Vilariño-Güell C, Wider C, Ross OA, et al. VPS35 Mutations in Parkinson Disease. *Am. J. Hum. Genet*. 2011;89(1):162-167.

- Vitte J, Traver S, Maués De Paula A, et al. Leucine-rich repeat kinase 2 is associated with the endoplasmic reticulum in dopaminergic neurons and accumulates in the core of Lewy bodies in Parkinson disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2010;69(9):959-972.

- Vogt IR, Lees AJ, Evert BO, et al. Transcriptional changes in multiple system atrophy and Parkinson's disease putamen. *Exp. Neurol.* 2006;199(2):465-478.

- Volles MJ, Lansbury PT Jr. Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism. *Biochemistry*. 2002;41(14):4595-4602.

- Von Coelln R, Thomas B, Savitt JM, et al. Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004;101(29):10744-10749.

- Voutsinas GE, Stavrou EF, Karousos G, et al. Allelic imbalance of expression and epigenetic regulation within the alpha-synuclein wild-type and p.Ala53Thr alleles in Parkinson disease. *Hum. Mutat.* 2010;31(6):685-691.

- Waddington CH. Canalization of development and genetic assimilation of acquired characters. *Nature*. 1959;183(4676):1654-1655.

- Wang Y, Barbacioru C, Hyland F, et al. Large scale real-time PCR validation on gene expression measurements from two commercial long-oligonucleotide microarrays. *BMC Genomics*. 2006;7:59.

- Wang J-L, Xiao B, Cui X-X, et al. Analysis of SCA2 and SCA3/MJD repeats in Parkinson's disease in mainland China: genetic, clinical, and positron emission tomography findings. *Mov. Disord.* 2009;24(13):2007-2011.

- Wang L, Yang H-J, Xia Y-Y, Feng Z-W. Insulin-like growth factor 1 protects human neuroblastoma cells SH-EP1 against MPP+-induced apoptosis by AKT/GSK-3β/JNK signaling. *Apoptosis*. 2010;15(12):1470-1479.

- Wang Z, Liu J, Chen S, et al. DJ-1 modulates the expression of Cu/Zn-superoxide dismutase-1 through the Erk1/2-Elk1 pathway in neuroprotection. *Annals of Neurology*. 2011. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21796667

- Ward CD, Duvoisin RC, Ince SE, et al. Parkinson's disease in 65 pairs of twins and in a set of quadruplets. *Neurology*. 1983;33(7):815-824.

- Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC. Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J. Biol. Chem*. 2003;278(27):25009-25013.

- West AB, Kapatos G, O'Farrell C, et al. N-myc regulates parkin expression. *J. Biol. Chem.* 2004;279(28):28896-28902.

- West AB, Moore DJ, Biskup S, et al. Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005;102(46):16842-16847.

- White LR, Toft M, Kvam SN, Farrer MJ, Aasly JO. MAPK-pathway activity, Lrrk2 G2019S, and Parkinson's disease. *J. Neurosci. Res.* 2007;85(6):1288-1294.

- Whitworth AJ, Theodore DA, Greene JC, et al. Increased glutathione S-transferase activity rescues dopaminergic neuron loss in a Drosophila model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005;102(22):8024-8029.

- Wider C, Dickson DW, Wszolek ZK. Leucine-rich repeat kinase 2 gene-associated disease: redefining genotype-phenotype correlation. *Neurodegener Dis.* 2010;7(1-3):175-179.

- Wiedemeyer R, Westermann F, Wittke I, Nowock J, Schwab M. Ataxin-2 promotes apoptosis of human neuroblastoma cells. *Oncogene*. 2003;22(3):401-411.

- Witt M, Bormann K, Gudziol V, et al. Biopsies of olfactory epithelium in patients with Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2009;24(6):906-914.

- Wong ASL, Lee RHK, Cheung AY, et al. Cdk5-mediated phosphorylation of endophilin B1 is required for induced autophagy in models of Parkinson's disease. *Nat. Cell Biol.* 2011;13(5):568-579.

- Wooten GF, Currie LJ, Bovbjerg VE, Lee JK, Patrie J. Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 2004;75(4):637-639.

- Wu Y, Le W, Jankovic J. Preclinical biomarkers of Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 2011;68(1):22-30.

- Xie H-rong, Hu L-sen, Li G-yi. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin. Med. J.* 2010;123(8):1086-1092.

- Xiong H, Wang D, Chen L, et al. Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *J. Clin. Invest.* 2009;119(3):650-660.

- Xu Z, Maroney AC, Dobrzanski P, Kukekov NV, Greene LA. The MLK family mediates c-Jun N-terminal kinase activation in neuronal apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 2001;21(14):4713-4724.

- Yamamura Y, Sobue I, Ando K, Iida M, Yanagi T. Paralysis agitans of early onset with marked diurnal fluctuation of symptoms. *Neurology*. 1973;23(3):239-244.

- Yang Y, Gehrke S, Haque ME, et al. Inactivation of Drosophila DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005;102(38):13670-13675.

- Yang IV. Use of external controls in microarray experiments. *Meth. Enzymol.* 2006;411:50-63.

- Yang Y, Gehrke S, Imai Y, et al. Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of Drosophila Pink1 is rescued by Parkin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006;103(28):10793-10798.

- Yap TL, Gruschus JM, Velayati A, et al. {alpha}-Synuclein Interacts with Glucocerebrosidase Providing a Molecular Link between Parkinson and Gaucher Diseases. *J. Biol. Chem.* 2011;286(32):28080-28088.

- Yasuhara T, Shingo T, Muraoka K, et al. Neurorescue effects of VEGF on a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 2005;1053(1-2):10-18.

- Ye Q, Wang T-F, Peng Y-F, et al. Expression of alpha-, beta- and gamma-synuclein in colorectal cancer, and potential clinical significance in progression of the disease. *Oncol. Rep.* 2010;23(2):429-436.

- Yomono HS, Kurisaki H, Hebisawa A, et al. [Autopsy case of SCA2 with Parkinsonian phenotype]. *Rinsho Shinkeigaku*. 2010;50(3):156-162.

- Yuan Y, Cao P, Smith MA, et al. Dysregulated LRRK2 signaling in response to endoplasmic reticulum stress leads to dopaminergic neuron degeneration in C. elegans. *PLoS ONE*. 2011;6(8):e22354.

- Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol*. 2004;55(2):164-173.

- Zeng H-Z, Qu Y-Q, Zhang W-J, et al. Proteomic Analysis Identified DJ-1 as a Cisplatin Resistant Marker in Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci*. 2011;12(6):3489-3499.

- Zhang Y, James M, Middleton FA, Davis RL. Transcriptional analysis of multiple brain regions in Parkinson's disease supports the involvement of specific protein processing, energy metabolism, and signaling pathways, and suggests novel disease mechanisms. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2005;137B(1):5-16.

- Zhang C, Lin M, Wu R, et al. Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011;108(39):16259-16264.

- Zhao D-L, Zou L-B, Zhou L-F, Zhu P, Zhu H-B. A cell-based model of alpha-synucleinopathy for screening compounds with therapeutic potential of Parkinson's disease. *Acta Pharmacol. Sin*. 2007;28(5):616-626.

- Zheng B, Liao Z, Locascio JJ, et al. PGC-1α, a potential therapeutic target for early intervention in Parkinson's disease. *Sci Transl Med*. 2010;2(52):52ra73.

- Zhernakova A, Stahl EA, Trynka G, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies in celiac disease and rheumatoid arthritis identifies fourteen non-HLA shared loci. *PLoS Genet.* 2011;7(2):e1002004.

- Zhu J-H, Guo F, Shelburne J, Watkins S, Chu CT. Localization of phosphorylated ERK/MAP kinases to mitochondria and autophagosomes in Lewy body diseases. *Brain Pathol.* 2003;13(4):473-481.

- Zimprich A, Benet-Pagès A, Struhal W, et al. A Mutation in VPS35, Encoding a Subunit of the Retromer Complex, Causes Late-Onset Parkinson Disease. *Am. J. Hum. Genet.* 2011;89(1):168-175.

- Zimprich A, Biskup S, Leitner P, et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*. 2004;44(4):601-607.

VII. ANNEXES

Annexe 1 : Critères diagnostiques de la MP selon l'UKPDSBRC

1ère étape : Diagnostic d'un syndrome parkinsonien :

- bradykinésie (lenteur d'initiation des mouvements volontaires avec réduction progressive de la vitesse et de l'amplitude d'actions répétées)
- et au moins un des signes suivants :
  - rigidité musculaire,
  - tremblement de repos à 4 à 6 Hz,
  - instabilité posturale non expliquée par un trouble visuel, vestibulaire, cérébelleux ou proprioceptif.

2ème étape : Absence d'un des critères d'exclusion suivants :

- histoire d'accidents vasculaires répétés avec progression par à-coups des symptômes parkinsoniens,
- antécédent de traumatismes crâniens répétés,
- antécédent d'encéphalite,
- crises oculogyres,
- traitement neuroleptique précédant l'installation des symptômes,
- antécédents familiaux de plusieurs cas de syndrome parkinsonien,
- rémission prolongée du syndrome parkinsonien,
- signes strictement unilatéraux après 3 ans d'évolution,
- paralysie supranucléaire du regard,
- syndrome cérébelleux,
- dysautonomie sévère et précoce,
- démence sévère et précoce avec troubles de la mémoire, du langage et des praxies,
- signe de Babinski,
- présence d'une tumeur cérébrale ou d'une hydrocéphalie communicante au scanner,
- réponse négative à des doses élevées de Lévodopa (en l'absence de malabsorption),
- exposition au MPTP.

3ème étape : Critères positifs en faveur d'une maladie de Parkinson :

(au moins trois de ces critères sont nécessaires pour poser le diagnostic d'une MP définie)

- début unilatéral,
- présence d'un tremblement de repos,
- évolution progressive,
- asymétrie persistante prédominant sur le côté initialement atteint,
- amélioration significative du syndrome parkinsonien par la levodopa (plus de 70 %),
- mouvements choréiques intenses induits par la levodopa,
- sensibilité à la levodopa pour une durée supérieure ou égale à 5 ans,
- durée de l'évolution clinique supérieure ou égale à 10 ans.

Annexe 2 : Critères de diagnostic clinique du NINDS

Critères A : caractéristiques de la MP
- Tremblement de repos
- Bradykinésie
- Rigidité
- Début asymétrique

Critères B : suggérant un diagnostic différentiel
- Caractéristiques inhabituelles en début d'évolution
  - Instabilité posturale franche dans les 3 premières années
  - Freezing dans les 3 premières années
  - Hallucinations non attribuées à des médicaments dans les 3 premières années
  - Démence inaugurale ou dès la première année
- Paralysie supranucléaire du regard ou ralentissement des saccades verticales
- Dysautonomie sévère et symptomatique non liée aux médications
- Mise en évidence d'une autre étiologie (comme des lésions cérébrales de localisation compatible ou utilisation de neuroleptiques dans les 6 derniers mois)

Critères diagnostiques proposés :
- Maladie de Parkinson POSSIBLE

Au moins 2 des 4 critères A, dont au moins 1 est tremblement ou bradykinésie
+ Aucun des critères B OU symptomatologie évoluant depuis moins de 3 ans sans critère B
+ Réponse franche et durable à la levodopa ou aux agonistes dopaminergiques OU absence de traitement dopaminergique adéquat

- Maladie de Parkinson PROBABLE

Au moins 3 des 4 critères A
+ Aucun des critères B après 3 ans d'évolution
+ Réponse franche et durable à la levodopa ou aux agonistes dopaminergiques

- Maladie de Parkinson DEFINIE

Tous les critères de MP possible
+ Confirmation histopathologique en autopsie

Annexe 3 : Echelle d'évaluation unifiée pour la maladie de Parkinson (UPDRS)

I- Etat mental, comportemental et thymique

1- Affaiblissement intellectuel

0 = absent.
1 = léger. Manque de mémoire habituel avec souvenir partiel des événements.
2 = perte mnésique modérée, désorientation, difficultés modérées à faire face à des problèmes complexes. Atteinte légère mais indiscutable des capacités fonctionnelles avec besoin d'une incitation occasionnelle de l'entourage.
3 = déficit mnésique grave avec désorientation dans le temps et souvent dans l'espace. Handicap grave face aux problèmes.
4 = perte mnésique sévère avec uniquement préservation de sa propre orientation. Incapacité de porter des jugements et de résoudre des problèmes, demande d'aide pour les soins personnels, ne peut être laissé seul.

2- Troubles de la pensée

0 = aucun.
1 = rêves animés.
2 = hallucinations bénignes critiquées.
3 = hallucinations occasionnelles ou fréquentes ou idées délirantes non critiquées.
4 = hallucinations continuelles, psychose expansive, incapacité de prendre soin de soi.

3- Dépression

0 = absente.
1 = périodes de tristesse ou sentiment de culpabilité excessif ne persistant pas plusieurs jours.
2 = dépression durable (une semaine ou plus).
3 = dépression durable avec symptômes végétatifs (insomnie, anorexie, perte de poids).
4 = dépression durable avec troubles végétatifs, pensées ou intentions suicidaires.

4- Motivation – Initiative

0 = normale.
1 = moins franche que d'habitude, plus passif.
2 = perte d'initiative et désintérêt pour certaines activités non routinières.
3 = perte d'initiative ou désintérêt dans les activités routinières.
4 = absence d'initiative, perte totale d'intérêt.

II- Activités de la vie quotidienne (à déterminer en période ON et en période OFF)

5- Parole

0 = normale.
1 = légèrement perturbée, pas de difficulté à être compris.
2 = modérément perturbée. On doit lui demander occasionnellement de répéter.
3 = gravement perturbée. On doit lui demander fréquemment de répéter.
4 = incompréhensible la plupart du temps.

6- Salivation

0 = normale.
1 = légère, mais excès habituel de salive dans la bouche, peut baver le nuit.
2 = hypersialorrhée modérée, peut baver un peu.
3 = hypersialorrhée nette avec un peu de bave.
4 = écoulement habituel de bave nécessitant en permanence un mouchoir.

7- Déglutition
0 = normale.
1 = s'étrangle rarement.
2 = s'étrangle occasionnellement.
3 = nécessite une alimentation semi-liquide.
4 = nécessite une alimentation par sonde gastrique ou une gastrectomie.

8- Ecriture
0 = normale.
1 = légèrement ralentie ou micrographique.
2 = nettement ralentie ou micrographique, tous les mots sont lisibles.
3 = gravement perturbée, tous les mots ne sont pas lisibles.
4 = la majorité des mots est illisible.

9- S'alimenter et manipuler les couverts
0 = normal.
1 = un peu lent et maladroit mais n'a pas besoin d'être aidé.
2 = peut se débrouiller seul pour la plupart des aliments mais lent et maladroit.
3 = a besoin d'une aide pour les repas mais peut encore s'alimenter lentement.
4 = on doit lui donner à manger.

10- Habillage
0 = normal.
1 = un peu lent mais ne doit pas être aidé.
2 = aide occasionnelle pour boutonner ou enfiler une manche.
3 = a besoin d'être très aidé mais peut faire certaines choses seul.
4 = totalement dépendant.

11- Hygiène
0 = normale.
1 = un peu lent, mais n'a pas besoin d'aide.
2 = nécessite une aide pour la douche ou le bain, très lent dans les soins hygiéniques.
3 = nécessite une aide pour se laver, se brosser les dents, se coiffer, se baigner.
4 = sonde urinaire ou autres aides mécaniques.

12- Se retourner dans le lit, arranger les draps et couvertures
0 = normal.
1 = un peu lent et maladroit mais n'a pas besoin d'être aidé.
2 = peut se retourner seul ou arranger les draps mais avec une grande difficulté.
3 = peut commencer le geste mais n'arrive pas à se retourner ou arranger les draps.
4 = dépendant.

13- Chute non liée au piétinement
0 = aucune.
1 = chutes rares.
2 = chutes occasionnelles mais moins d'une fois par jour.
3 = en moyenne une chute par jour.
4 = chutes pluriquotidiennes.

14- Piétinement lors de la marche
0 = aucun.

1 = rare, peut avoir une hésitation au départ.
2 = piétinement occasionnel lors de la marche.
3 = piétinement fréquent entraînant occasionnellement des chutes.
4 = chutes fréquentes dues au piétinement.

15- Marche
0 = normale.
1 = difficultés légères, peut balancer les bras, traîne les pieds.
2 = difficultés modérées mais ne demande que peu ou pas d'aide.
3 = difficultés importantes nécessitant une aide.
4 = ne peut marcher du tout même avec aide.

16- Tremblement
0 = absent.
1 = léger et rarement présent.
2 = modéré, gênant le patient.
3 = important, gênant certaines activités.
4 = marqué, gênant la plupart des activités.

17- Troubles subjectifs sensitifs liés au syndrome parkinsonien
0 = aucun.
1 = occasionnellement, engourdissements, picotements, douleurs légères.
2 = engourdissements, picotements, douleurs fréquentes, pas gênant.
3 = sensations douloureuses fréquentes.
4 = douleurs très vives.

III- Examen moteur
18- Parole
0 = normale.
1 = légère perte d'expression, de la diction et/ou du volume vocal.
2 = voix monotone, bredouillée mais compréhensible, altération modérée.
3 = altération marquée, difficile à comprendre.
4 = incompréhensible.

19- Expression faciale
0 = normale.
1 = hypomimie légère, semble avoir un visage normalement impassible.
2 = diminution légère mais franchement anormale de l'expression faciale.
3 = hypomimie modérée, lèvres souvent entrouvertes.
4 = masque facial avec perte importante de l'expression faciale, lèvres entrouvertes.

20- Tremblement de repos
0 = absent.
1 = léger et rarement présent.
2 = tremblement de faible amplitude mais persistant. Ou amplitude modérée mais intermittent.
3 = tremblement modéré en amplitude et présent la plupart du temps.
4 = tremblement d'amplitude marquée et présent la plupart du temps.

21- Tremblement d'action ou tremblement postural des mains
0 = absent.
1 = léger : présent lors de l'action.

2 = modéré en amplitude, présent lors de l'action.
3 = modéré en amplitude, tant lors du maintien postural que lors de l'action.
4 = amplitude marquée : gêne l'alimentation.

22- Rigidité
0 = absent.
1 = minime ou apparaissant lors des manœuvres de sensibilisation.
2 = légère à modérée.
3 = marquée, mais la plupart des mouvements peuvent être effectués aisément.
4 = sévère, les mouvements sont effectués difficilement.

23- Tapotement des doigts
0 = normal.
1 = ralentissement léger et/ou réduction d'amplitude.
2 = modérément perturbé, se fatigue rapidement, occasionnels arrêts du mouvement.
3 = sévèrement perturbé, hésitation au début du mouvement ou arrêt du mouvement.
4 = peut à peine effectuer la tâche.

24- Mouvements des mains
0 = normal.
1 = ralentissement léger et/ou réduction d'amplitude.
2 = modérément perturbé, se fatigue rapidement, occasionnels arrêts du mouvement.
3 = sévèrement perturbé, hésitation au début du mouvement ou arrêt du mouvement.
4 = peut à peine effectuer la tâche.

25- Mouvements alternatifs rapides
0 = normal.
1 = ralentissement léger et/ou réduction d'amplitude.
2 = modérément perturbé, se fatigue rapidement, occasionnels arrêts du mouvement.
3 = sévèrement perturbé, hésitation au début du mouvement ou arrêt du mouvement.
4 = peut à peine effectuer la tâche.

26- Agilité de la jambe
0 = normal.
1 = ralentissement léger et/ou réduction d'amplitude.
2 = modérément perturbé, se fatigue rapidement, occasionnels arrêts du mouvement.
3 = sévèrement perturbé, hésitation au début du mouvement ou arrêt en cours de mouvement.
4 = peut à peine effectuer la tâche.

27- Se lever d'une chaise
0 = normal.
1 = lentement ou a besoin de plus d'un essai.
2 = se pousse sur les bras du siège.
3 = tend à tomber en arrière et doit essayer plus d'une fois mais peut se lever sans aide.
4 = incapable de se lever sans aide.

28- Posture
0 = normalement droite.
1 = pas tout à fait droite, posture légèrement fléchie, normale pour une personne plus âgée.
2 = posture modérément fléchie, nettement anormale : peut être légèrement penché d'un côté.
3 = flexion sévèrement fléchie avec cyphose : peut être modérément penchée d'un côté.

4 = flexion marquée avec posture très anormale.

29- Stabilité posturale
0 = normale.
1 = rétropulsion mais l'équilibre est rétabli sans aide.
2 = absence de réponse posturale : peut tomber s'il n'est pas retenu par l'examinateur.
3 = très instable, tend à perdre l'équilibre spontanément.
4 = incapable de se tenir debout sans aide.

30- Démarche
0 = normale.
1 = marche lentement, peut trainer les pieds et faires des petits pas, mais sans festination.
2 = marche avec difficultés ; peut avoir un peu de festination, des petits pas.
3 = perturbations sévères de la marche, nécessitant une aide.
4 = ne peut marcher du tout, même avec aide.

31- Bradykinésie corporelle
0 = aucune.
1 = lenteur minime, donnant aux mouvements un caractère délibéré. Réduction d'amplitude.
2 = lenteur et pauvreté du mouvement qui est nettement anormal.
3 = lenteur modérée, pauvreté et petite amplitude du mouvement.
4 = lenteur marquée, pauvreté et petite amplitude du mouvement.

IV- Complications du traitement (au cours de la dernière semaine)
A- Dyskinésies
32- Durée
0 = aucune.
1 = 1 à 25% de la journée.
2 = 26 à 50% de la journée.
3 = 51 à 75% de la journée.
4 = 76 à 100% de la journée.

33- Incapacité
0 = aucune.
1 = légère.
2 = modérée.
3 = sévère.
4 = complète.

34- Douleur
0 = aucune.
1 = légère.
2 = modérée.
3 = sévère.
4 = complète.

35- Présence d'une dystonie matinale précoce
0 = non.
1 = oui.

B- Fluctuations motrices

36- Y a-t-il des périodes off dont on peut prédire le moment après une prise médicamenteuse ?
0 = non.
1 = oui.

37- Y a-t-il des périodes off dont on ne peut pas prédire le moment après une prise médicamenteuse ?
0 = non.
1 = oui.

38- Est-ce que certaines des périodes off viennent soudainement ?
0 = non.
1 = oui.

39- Quelle est la proportion de la journée durant laquelle le patient est en situation off ?
0 = aucune.
1 = 1 à 25% de la journée.
2 = 26 à 50% de la journée.
3 = 51 à 75% de la journée.
4 = 76 à 100% de la journée.

C- Autres complications

40- Le patient a-t-il de l'anorexie, des nausées, des vomissements ?
0 = non.
1 = oui.

41- Le patient a-t-il une hypotension orthostatique symptomatique ?
0 = non.
1 = oui.

V- Stade de Hoehn et Yahr

- Stade 1 = maladie unilatérale.
- Stade 1,5 = maladie unilatérale avec atteinte axiale.
- Stade 2 = maladie bilatérale sans trouble de l'équilibre.
- Stade 2,5 = maladie bilatérale légère avec rétablissement lors du test de la poussée.
- Stade 3 = maladie bilatérale légère à modérée, instabilité posturale, physiquement autonome.
- Stade 4 = handicap sévère, toujours capable de marcher ou de se tenir debout sans aide.
- Stade 5 = malade en chaise roulante ou alité, n'est plus autonome.

VI- Echelle de Schwab et England

- 100% = totalement indépendant.
- 90% = indépendant mais plus lent.
- 80% = indépendant mais conscient de sa lenteur.
- 70% = pas tout à fait indépendant, 3 à 4 fois plus lent.
- 60% = partiellement dépendant.
- 50% = aidé dans 50% des activités.
- 40% = très dépendant.
- 30% = peu d'activités effectuées seul.
- 20% = ne fait rien seul, aide légèrement.
- 10% = alité, totalement dépendant.
- 0% = alité, troubles végétatifs.

Annexe 4 :

Tableau 24 : Liste des gènes présents dans les voies canoniques dérégulées dans les PBMC des sujets porteurs de la mutation G2019S de LRRK2.

Symbol	Gene name	Agilent probe	GenBank
APAF1	apoptotic peptidase activating factor 1	A_23_P36611	NM_181861
ARHGAP12	Rho GTPase activating protein 12	A_24_P271296	NM_018287
ARPC5L	actin related protein 2/3 complex, subunit 5-like	A_24_P29975	NM_030978
ATP2B4	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 4	A_23_P11841	NM_001684
BAIAP2	BAI1-associated protein 2	A_24_P159648	NM_006340
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	A_23_P352266	NM_000633
BMP7	bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1)	A_23_P154643	NM_001719
CACNG5	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 5	A_23_P66497	NM_014404
CACNG6	voltage-dependent calcium channel gamma-6 subunit	A_23_P501933	NM_145814
CACNG7	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 7	A_23_P4782	NM_031896
CASP6	caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase	A_23_P500799	NM_001226
CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	A_23_P57036	NM_001250
CHRNA2	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 2 (neuronal)	A_23_P251443	NM_000742
CLDN9	claudin 9	A_23_P54809	NM_020982
CSNK2A2	casein kinase 2, alpha prime polypeptide	A_23_P14915	NM_001896
EFNA2	ephrin-A2	A_23_P119535	NM_001405
EPHA3	EPH receptor A3	A_24_P254744	NM_182644
ERBB2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2	A_23_P89249	NM_001005862
ERRFI1	ERBB receptor feedback inhibitor 1	A_23_P46470	NM_018948
FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	A_23_P34644	NM_004001
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1	A_23_P301304	NM_023109
FLT4	fms-related tyrosine kinase 4	A_23_P213394	BC027302
GIT1	G protein-coupled receptor kinase interactor 1	A_24_P347946	NM_014030
GLIS2	GLIS family zinc finger 2	A_23_P323154	NM_032575
GNB3	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 3	A_23_P76350	NM_002075
GNG3	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 3	A_23_P139192	NM_012202
GNG4	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 4	A_23_P335329	NM_004485
GRIA2	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 2	A_23_P340617	NM_000826
GSC	goosecoid	A_24_P232809	NM_173849
GZMB	granzyme B	A_23_P117602	NM_004131
HDAC8	histone deacetylase 8	A_23_P84922	NM_018486
HLA-DQA1	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	A_24_P196827	NM_002122
HLA-DQA2	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 2	A_23_P42302	NM_020056
HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	A_23_P136683	NM_002123
HLA-DQB2	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 2	A_23_P19510	NM_182549
HNF4A	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	A_24_P10751	NM_000457
IFNGR2	interferon gamma receptor 2	A_23_P29036	NM_005534
IL10RA	interleukin 10 receptor, alpha	A_23_P203173	NM_001558
IL2RA	interleukin 2 receptor, alpha	A_23_P127288	NM_000417
IL4R	interleukin 4 receptor	A_23_P129556	NM_000418
IL6R	interleukin 6 receptor isoform 1 precursor	A_24_P379413	NM_000565
IL8	interleukin 8	A_23_P89380	NM_000584

ITGAL	integrin, alpha L (antigen CD11A)	A_23_P206806	NM_002209
LAMA1	laminin, alpha 1	A_32_P199126	NM_005559
LINGO1	leucine rich repeat and Ig domain containing 1	A_23_P206092	NM_032808
MAP3K7IP2	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 2	A_23_P19702	NM_145342
MAPK12	mitogen-activated protein kinase 12	A_23_P29347	NM_002969
MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	A_24_P283288	NM_139013
MAPK8	mitogen-activated protein kinase 8	A_23_P356152	NM_139047
MATK	megakaryocyte-associated tyrosine kinase	A_23_P50678	NM_139354
MEF2D	MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide D	A_23_P334186	NM_005920
MMP19	matrix metalloproteinase 19	A_24_P184445	NM_022791
MMP23B	matrix metalloproteinase 23B	A_23_P74088	NM_006983
MSN	moesin	A_24_P186370	NM_002444
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog	A_24_P178011	NM_002467
MYL4	myosin, light polypeptide 4, alkali; atrial, embryonic	A_24_P188218	NM_002476
MYL7	myosin, light polypeptide 7, regulatory	A_23_P59738	NM_021223
NCF4	neutrophil cytosolic factor 4	A_23_P109508	NM_000631
NFATC2	nuclear factor of activated T-cells, calcineurin-dependent 2	A_23_P91278	NM_012340
PRKCH	protein kinase C, eta	A_23_P205567	NM_006255
RASSF5	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 5	A_24_P336584	NM_182664
RIPK1	receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	A_23_P370005	NM_003804
RNF41	ring finger protein 41	A_24_P244470	NM_194358
RPS6KB2	ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 2 isoform b	A_23_P24318	NM_001007071
RUNX3	runt-related transcription factor 3	A_23_P51231	NM_004350
SEMA4B	semaphorin 4B	A_23_P95165	NM_020210
SLIT3	slit homolog 3	A_23_P58588	NM_003062
SMAD7	SMAD, mothers against DPP homolog 7	A_23_P55518	NM_005904
SMAD9	SMAD, mothers against DPP homolog 9	A_23_P2814	NM_005905
SOCS2	suppressor of cytokine signaling 2	A_24_P230675	NM_003877
SPN	sialophorin (CD43)	A_23_P433758	NM_003123
STAT4	signal transducer and activator of transcription 4	A_23_P305198	NM_003151
STAT6	signal transducer and activator of transcription 6	A_23_P47879	NM_003153
TGFB2	transforming growth factor, beta 2	A_24_P148261	AK021874
TLX2	T-cell leukemia, homeobox 2	A_23_P389987	NM_016170
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6	A_23_P75921	NM_145803
TRPC3	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 3	A_23_P41455	NM_003305
WNT1	wingless-type MMTV integration site family, member 1	A_23_P411157	NM_005430
WNT10A	wingless-type MMTV integration site family, member 10A	A_23_P102117	NM_025216
WNT4	wingless-type MMTV integration site family, member 4	A_23_P382607	NM_030761

Annexe 5 :

Tableau 25 : Liste des 373 gènes dérégulés communs chez le dupliqué du locus de SNCA entre les 2 plateformes.

RE1 pour le rapport d'expression des puces Agilent, RE2 pour les puces Illumina.

Symbol	Entrez Gene Name	RE1	Agilent ID	RE2	Illumina ID
ABCG1	ATP-binding cassette, sub-family G, member 1	0,52	A_23_P166297	4,91	ILMN_1743638
ABHD12	abhydrolase domain containing 12	1,94	A_23_P367026	2,33	ILMN_1745116
		1,31	A_23_P149494		
ABHD13	abhydrolase domain containing 13	1,33	A_24_P61464	3,69	ILMN_2073969
ABHD14B	abhydrolase domain containing 14B	0,82	A_24_P337140	0,66	ILMN_2227533
		0,78	A_23_P155417		
ABI2	abl-interactor 2	1,53	A_24_P933418	7,34	ILMN_1775944
ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	0,41	A_23_P150053	0,39	ILMN_1671703
ADCY9	adenylate cyclase 9	1,20	A_24_P935103	1,49	ILMN_1654287
ADI1	acireductone dioxygenase 1	1,67	A_23_P148194	2,63	ILMN_1813975
AFF1	AF4/FMR2 family, member 1	1,44	A_24_P414332	1,31	ILMN_2129015
AGA	aspartylglucosaminidase	1,28	A_23_P7099	1,69	ILMN_1802631
AGPAT1	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1	1,77	A_23_P258093	0,08	ILMN_1697790
AK4	adenylate kinase 4	1,93	A_32_P108655	4,49	ILMN_1843198
		1,82	A_24_P345290	1,98	ILMN_1764090
AKT3	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3	0,71	A_24_P110983	2,04	ILMN_2325610
ALDH1A1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	1,66	A_23_P83098	2,86	ILMN_2096372
				1,77	ILMN_1709348
ALOX15B	arachidonate 15-lipoxygenase, type B	0,35	A_23_P60627	0,06	ILMN_1751975
ANK3	ankyrin 3, node of Ranvier	1,49	A_23_P301530	16,40	ILMN_1651943
ANKRD11	ankyrin repeat domain 11	0,83	A_23_P3632	0,74	ILMN_2108709
ANKRD22	ankyrin repeat domain 22	2,44	A_23_P161428	1,59	ILMN_2132599
ANXA8L2	annexin A8-like 2	0,44	A_23_P395054	0,01	ILMN_1778087
		0,29	A_32_P105549		
ARAP3	ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH 3	1,44	A_23_P167389	1,41	ILMN_3240997
ARL4A	ADP-ribosylation factor-like 4A	1,66	A_32_P806841	12,30	ILMN_2369953
				3,14	ILMN_1743241
				1,78	ILMN_1704842
				6,45	ILMN_1753663
				2,99	ILMN_1775405
ARL17A	ADP-ribosylation factor-like 17A	1,93	A_23_P371885	5,81	ILMN_3181503
ASAP1	ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 1	1,68	A_23_P216278	2,21	ILMN_1690963
				2,01	ILMN_3245057
ASB7	ankyrin repeat and SOCS box containing 7	1,28	A_24_P155791	2,68	ILMN_1680419
ATG12	ATG12 autophagy related 12 homolog	1,27	A_23_P20970	3,19	ILMN_1673898
				1,61	ILMN_2188204
ATXN7L3B	ataxin 7-like 3B	0,83	A_24_P263956	0,78	ILMN_3237507
B4GALT1	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase 1	0,58	A_24_P103803	0,67	ILMN_1766221
		0,40	A_23_P135271		
BCAT1	branched chain amino-acid transaminase 1, cytosolic	1,94	A_24_P52921	2,45	ILMN_1766169
		1,93	A_24_P935986		
		1,83	A_23_P87528		
BCL2A1	BCL2-related protein A1	1,46	A_23_P321703	5,14	ILMN_1769229
BCL2L14	BCL2-like 14	2,49	A_23_P128050	0,17	ILMN_1717976
BCLAF1	BCL2-associated transcription factor 1	0,82	A_23_P111343	1,20	ILMN_1775192
BDH2	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 2	0,48	A_24_P80500	0,08	ILMN_1673360
BNC2	basonuclin 2	0,51	A_32_P12232	0,15	ILMN_1656373
BTBD1	BTB (POZ) domain containing 1	1,20	A_23_P205830	1,36	ILMN_2411264
C1orf57	nucleoside-triphosphatase, cancer-related	1,70	A_23_P200252	1,47	ILMN_1657446
C1orf156	methyltransferase like 18	0,60	A_23_P85726	0,53	ILMN_1734915
C6orf62	chromosome 6 open reading frame 62	1,25	A_23_P42514	1,49	ILMN_1653797
C9orf47	chromosome 9 open reading frame 47	1,80	A_24_P83462	0,13	ILMN_1794672
C16orf73	chromosome 16 open reading frame 73	0,47	A_32_P75902	0,11	ILMN_1754241

C16orf87	chromosome 16 open reading frame 87	1,56	A_23_P49279	2,18	ILMN_1690911
C17orf51	chromosome 17 open reading frame 51	0,73	A_24_P59607	4,50	ILMN_1757693
C17orf81	chromosome 17 open reading frame 81	0,62	A_23_P164289	0,08	ILMN_1661351
C17orf97	chromosome 17 open reading frame 97	2,87	A_24_P624439	11,36	ILMN_1713803
C18orf19	chromosome 18 open reading frame 19	0,82	A_23_P380978	1,96	ILMN_1658110
C1QTNF3	C1q and tumor necrosis factor related protein 3	0,48	A_23_P122067	0,22	ILMN_1768925
CACNG6	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 6	0,18	A_23_P501933	13,49	ILMN_2356441
CAMKK2	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2	1,32	A_23_P358957	2,70	ILMN_1743021
				4,37	ILMN_2367638
CAPS	calcyphosine	1,67	A_23_P78958	0,47	ILMN_2286400
CARD17	caspase recruitment domain family, member 17	1,26	A_24_P192805	8,51	ILMN_3238525
CBL	Cas-Br-M ecotropic retroviral transforming sequence	1,50	A_23_P53226	1,44	ILMN_2181968
CCDC15	coiled-coil domain containing 15	0,45	A_23_P98477	2,04	ILMN_1783676
CCDC90A	coiled-coil domain containing 90A	1,98	A_23_P256618	2,14	ILMN_1683129
CCDC112	coiled-coil domain containing 112	1,36	A_23_P92765	1,25	ILMN_1761101
CCNL1	cyclin L1	1,38	A_24_P337058	1,30	ILMN_2094776
				2,14	ILMN_1683129
CCR2	chemokine (C-C motif) receptor 2	0,63	A_23_P324885	0,54	ILMN_1669062
CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	1,90	A_23_P111583	1,84	ILMN_1796094
CD24	CD24 molecule	0,46	A_23_P85250	0,47	ILMN_2060413
CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	1,35	A_32_P215002	1,29	ILMN_1803429
		1,31	A_23_P24870	1,23	ILMN_2348788
CD8A	CD8a molecule	0,48	A_32_P163247	0,52	ILMN_2353732
				0,57	ILMN_1768482
				0,30	ILMN_1760374
CDC42	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)	1,82	A_23_P300056	1,64	ILMN_1675156
		1,38	A_32_P115015	1,62	ILMN_1738424
		1,30	A_24_P42633	1,31	ILMN_1696041
CECR6	cat eye syndrome chromosome region, candidate 6	1,72	A_23_P259344	1,87	ILMN_1702229
CELA1	chymotrypsin-like elastase family, member 1	0,46	A_23_P2383	2,19	ILMN_1805902
CENPN	centromere protein N	1,43	A_23_P88740	1,55	ILMN_1720526
CERK	ceramide kinase	0,74	A_24_P62237	0,80	ILMN_1767475
		0,55	A_23_P211659		
CES1	carboxylesterase 1	0,34	A_23_P206733	0,34	ILMN_2359945
CES4	carboxylesterase 1 pseudogene 1	0,39	A_24_P739900	0,47	ILMN_2150095
CH25H	cholesterol 25-hydroxylase	4,98	A_23_P86470	18,99	ILMN_1741021
CHI3L2	chitinase 3-like 2	1,66	A_23_P12082	1,69	ILMN_2326273
CHST12	carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 12	0,54	A_23_P310421	0,56	ILMN_1735058
CITED4	Cbp/p300-interacting transactivator, 4	2,21	A_32_P209230	1,78	ILMN_1787691
CLEC4G	C-type lectin domain family 4, member G	2,17	A_23_P153390	2,17	ILMN_2193817
CLN3	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 3	1,31	A_24_P567408	0,50	ILMN_1669281
		1,27	A_32_P53713		
CLP1	CLP1, cleavage and polyadenylation factor I subunit	1,36	A_23_P87141	1,52	ILMN_1659976
		1,35	A_24_P252973		
CLU	clusterin	2,19	A_23_P215913	7,92	ILMN_1798298
		2,05	A_32_P224498		
		1,98	A_32_P113322		
CMKLR1	chemokine-like receptor 1	0,66	A_23_P105461	0,39	ILMN_1913060
CMTM8	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 8	1,69	A_23_P40880	1,81	ILMN_1710124
COL4A3BP	collagen, type IV, alpha 3 binding protein	0,75	A_24_P29277	2,28	ILMN_1680109
COL5A3	collagen, type V, alpha 3	0,55	A_23_P55749	0,04	ILMN_1796288
COPS2	COP9 constitutive photomorphogenic subunit 2	1,26	A_23_P26021	2,99	ILMN_1655827
CORO2A	coronin, actin binding protein, 2A	1,42	A_23_P146444	1,87	ILMN_1813746
CPT1A	carnitine palmitoyltransferase 1A	1,77	A_24_P347065	2,10	ILMN_1696316
		1,55	A_23_P104563		
CR1	complement component (3b/4b) receptor 1	2,42	A_23_P256821	1,85	ILMN_2388112
		1,66	A_24_P265523		
CREBBP	CREB binding protein	0,71	A_24_P342279	2,42	ILMN_2293692

CRIP2	cysteine-rich protein 2	2,01	A_23_P112798	1,71	ILMN_1694432
CSNK1G1	casein kinase 1, gamma 1	0,69	A_23_P14841	9,79	ILMN_1723398
CSTF1	cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 1	0,65	A_23_P362824	16,19	ILMN_1735185
CTSA	cathepsin A	1,48	A_24_P74371	0,68	ILMN_1719286
CTSW	cathepsin W	0,61	A_24_P396167	0,60	ILMN_1794364
CUL4B	cullin 4B	1,22	A_23_P148463	1,24	ILMN_2385161
CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	3,19	A_23_P7144	3,94	ILMN_1787897
CYB5R2	cytochrome b5 reductase 2	1,70	A_24_P345451	29,22	ILMN_1739576
CYBRD1	cytochrome b reductase 1	1,70	A_24_P345451	1,87	ILMN_1712305
		1,55	A_23_P209564	1,86	ILMN_2087692
DAAM1	dishevelled associated activator of morphogenesis 1	1,33	A_24_P347447	1,83	ILMN_2046470
DACT1	dapper, antagonist of beta-catenin, homolog 1	2,19	A_24_P284093	0,09	ILMN_2250344
DHRS9	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	1,62	A_23_P56559	10,20	ILMN_2281502
DKK3	dickkopf homolog 3	0,33	A_23_P162047	0,05	ILMN_2398159
DMRTC1	DMRT-like family C1B	1,28	A_32_P179998	0,21	ILMN_1756088
DST	dystonin	1,80	A_24_P928522	0,18	ILMN_1675992
E2F6	E2F transcription factor 6	0,83	A_23_P170774	0,80	ILMN_1656196
EAF1	ELL associated factor 1	1,34	A_24_P941930	1,97	ILMN_1685012
EFHB	EF-hand domain family, member B	4,86	A_23_P417261	1,58	ILMN_1704617
EGR2	early growth response 2	3,77	A_23_P46936	7,52	ILMN_1743199
EGR3	early growth response 3	2,60	A_23_P216225	5,10	ILMN_1724280
				13,57	ILMN_1722781
EIF2A	eukaryotic translation initiation factor 2A, 65kDa	1,20	A_23_P44932	1,63	ILMN_1733305
EMD	emerin	1,65	A_23_P85171	0,79	ILMN_1801421
EOMES	eomesodermin	0,60	A_24_P97374	0,53	ILMN_1760509
ERAP2	endoplasmic reticulum aminopeptidase 2	0,29	A_23_P30243	0,25	ILMN_1743145
ERC1	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1	0,50	A_24_P162293	2,09	ILMN_2342068
EXTL3	exostoses (multiple)-like 3	0,51	A_32_P92163	0,71	ILMN_1778226
F5	coagulation factor V (proaccelerin, labile factor)	1,90	A_32_P41604	1,56	ILMN_1709233
		1,68	A_23_P148768		
FAM55C	family with sequence similarity 55, member C	1,29	A_23_P132560	3,63	ILMN_1814924
FAM89A	family with sequence similarity 89, member A	1,41	A_24_P418408	1,44	ILMN_2285817
				1,84	ILMN_1710075
FAM134B	family with sequence similarity 134, member B	1,40	A_24_P266048	2,15	ILMN_1811330
				1,76	ILMN_2387952
FBXO28	F-box protein 28	0,73	A_24_P310756	1,24	ILMN_1812776
FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	1,34	A_24_P938284	1,91	ILMN_2382403
FEM1B	fem-1 homolog b (C. elegans)	1,65	A_23_P151970	1,97	ILMN_1744239
FOLR3	folate receptor 3 (gamma)	8,60	A_24_P252996	7,94	ILMN_1730454
FRY	furry homolog (Drosophila)	1,36	A_23_P105862	3,18	ILMN_1678437
FUT4	fucosyltransferase 4	1,82	A_24_P295609	1,87	ILMN_1792072
		1,42	A_23_P12965		
G0S2	G0/G1switch 2	4,75	A_23_P74609	7,60	ILMN_1691846
G3BP2	GTPase activating protein binding protein 2	1,24	A_24_P128977	0,67	ILMN_2381758
GADD45B	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	1,98	A_24_P239606	2,30	ILMN_1718977
GCC2	GRIP and coiled-coil domain containing 2	1,33	A_32_P129660	3,04	ILMN_1678831
GCFC1	GC-rich sequence DNA-binding factor 1	1,33	A_24_P194313	1,31	ILMN_2251978
GFRA2	GDNF family receptor alpha 2	0,61	A_32_P162507	0,43	ILMN_1656300
		0,46	A_24_P96505		
		0,43	A_23_P84084		
GIMAP6	GTPase, IMAP family member 6	0,67	A_23_P145631	0,54	ILMN_2329429
GIMAP8	GTPase, IMAP family member 8	0,60	A_24_P132383	0,69	ILMN_1747305
GMCL1	germ cell-less homolog 1 (Drosophila)	0,77	A_23_P335463	1,72	ILMN_2194627
GNB4	guanine nucleotide binding protein, beta polypeptide 4	1,24	A_32_P184916	5,15	ILMN_2129545
				3,05	ILMN_1733249
GOLGA8A	golgin A8 family, member A	0,76	A_23_P37623	0,59	ILMN_2103547
GOLGA8F	golgin A8 family, member F	0,57	A_32_P59116	0,09	ILMN_1736479
GPR113	G protein-coupled receptor 113	0,68	A_23_P68311	0,20	ILMN_1762897
GSR	glutathione reductase	1,67	A_23_P146084	1,57	ILMN_1775182

GSTM1	glutathione S-transferase mu 1	0,54	A_23_P115407	0,63	ILMN_2391861
GUCY1B2	guanylate cyclase 1, soluble, beta 2	0,53	A_23_P14255	0,13	ILMN_1652166
GVIN1	GTPase, very large interferon inducible pseudogene 1	0,50	A_24_P938213	2,04	ILMN_1668526
GZMB	granzyme B	0,54	A_23_P117602	0,50	ILMN_2109489
HBD	hemoglobin, delta	0,28	A_23_P87346	0,34	ILMN_1815527
HBG1	hemoglobin, gamma A	17,89	A_23_P53137	10,26	ILMN_1796678
		13,10	A_23_P64539		
HCP5	HLA complex P5	0,57	A_23_P111126	0,56	ILMN_1803945
HDC	histidine decarboxylase	0,30	A_23_P117662	0,17	ILMN_1792323
HGF	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	1,62	A_23_P93787	6,66	ILMN_1801586
		1,59	A_23_P93780		
HIST1H2AJ	histone cluster 1, H2aj	1,59	A_23_P168014	0,26	ILMN_1755318
HIST1H3A	histone cluster 1, H3a	2,11	A_23_P219045	3,94	ILMN_1881081
HIST1H4C	histone cluster 1, H4c	2,06	A_23_P436281	2,03	ILMN_2075334
		1,94	A_23_P359540		
HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	2,30	A_23_P136683	0,05	ILMN_1661266
HLA-DRB6	major histocompatibility complex, class II, DR beta 6	0,12	A_24_P169013	3,23	ILMN_2066060
HMBOX1	homeobox containing 1	1,36	A_23_P134684	1,68	ILMN_1720059
HP	haptoglobin	1,90	A_23_P206760	2,56	ILMN_1812433
HRK	harakiri, BCL2 interacting protein	2,88	A_23_P25194	28,07	ILMN_2193706
HS2ST1	heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1	1,41	A_23_P200109	2,53	ILMN_1675117
HS3ST1	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 1	0,48	A_23_P121657	1,79	ILMN_1735367
HSD17B12	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12	0,55	A_23_P371933	1,60	ILMN_2094106
HSPC157	hypothetical LOC29092	0,48	A_23_P74252	0,09	ILMN_1901198
IER5	immediate early response 5	1,34	A_23_P86330	1,43	ILMN_1721833
IKZF3	IKAROS family zinc finger 3 (Aiolos)	0,71	A_24_P735072	32,03	ILMN_2300695
IL18R1	interleukin 18 receptor 1	0,61	A_24_P208567	0,65	ILMN_1781700
IMPA2	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2	1,58	A_23_P50081	1,37	ILMN_2094061
ING1	inhibitor of growth family, member 1	1,48	A_24_P39211	1,70	ILMN_1662243
INTS6	integrator complex subunit 6	1,25	A_23_P25653	1,58	ILMN_1655557
IRF2BPL	interferon regulatory factor 2 binding protein-like	0,77	A_32_P466514	0,39	ILMN_1804396
ISLR	immunoglobulin superfamily leucine-rich repeat	0,74	A_23_P3312	9,37	ILMN_1711009
ITPKB	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B	1,54	A_24_P119545	0,77	ILMN_1700432
KANK1	KN motif and ankyrin repeat domains 1	1,57	A_23_P500130	0,12	ILMN_1777727
KIAA0513	KIAA0513	1,26	A_23_P206310	0,81	ILMN_1693233
KIAA1598	KIAA1598	1,99	A_23_P202587	2,30	ILMN_1805992
KIAA1671	KIAA1671	0,48	A_23_P309619	0,53	ILMN_1772821
KIAA1967	KIAA1967	0,74	A_23_P31686	0,69	ILMN_1804789
KIF13A	kinesin family member 13A	1,71	A_23_P214111	12,95	ILMN_1796108
KIF16B	kinesin family member 16B	2,03	A_23_P28906	7,34	ILMN_2152828
		1,83	A_23_P17503		
KIR2DL3	interferon regulatory factor 2 binding protein-like	0,34	A_23_P78840	0,39	ILMN_1667232
		0,29	A_23_P130815		
		0,26	A_23_P502590	0,21	ILMN_1786810
		0,23	A_24_P87746		
		0,22	A_24_P153416		
KIR2DL4	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long tail, 4	0,30	A_24_P350622	0,28	ILMN_1693207
				0,37	ILMN_1739756
KIR3DL1	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long tail, 1	0,29	A_24_P117147	0,34	ILMN_2131828
KIR3DL2	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long tail, 2	0,28	A_23_P101636	0,30	ILMN_2190842
KLHL5	kelch-like 5	1,67	A_23_P121527	1,71	ILMN_1706687
		1,47	A_24_P17719		
KLHL8	kelch-like 8	1,53	A_23_P328729	2,03	ILMN_1714083
		1,44	A_24_P54808	1,87	ILMN_2189222
KLHL29	kelch-like 29	2,53	A_23_P209360	0,21	ILMN_3253471
KRT1	keratin 1	3,60	A_23_P128235	8,99	ILMN_1735712
KRTAP10-10	keratin associated protein 10-10	0,71	A_24_P134789	0,09	ILMN_1688334

				0,05	ILMN_1710929
LAIR2	leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 2	2,31	A_23_P209129	1,99	ILMN_2323933
				1,64	ILMN_1807491
LAMP2	lysosomal-associated membrane protein 2	1,51	A_24_P396231	1,79	ILMN_1917290
				1,83	ILMN_2243687
				1,35	ILMN_1673282
				1,53	ILMN_2279961
				1,50	ILMN_1752351
LAT	linker for activation of T cells	1,30	A_23_P60977	0,79	ILMN_2404625
LDHC	lactate dehydrogenase C	6,00	A_23_P53039	3,68	ILMN_2326324
LEPROT	leptin receptor overlapping transcript	2,14	A_24_P148094	1,91	ILMN_1661537
		2,14	A_23_P1126		
LGALS9C	lectin, galactoside-binding, soluble, 9C	1,24	A_32_P452655	0,20	ILMN_2080342
LILRA3	leukocyte immunoglobulin-like receptor A, member 3	0,19	A_23_P79094	0,10	ILMN_1661631
LMF1	lipase maturation factor 1	2,28	A_24_P930963	0,04	ILMN_1800227
LMO2	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)	1,39	A_23_P53126	1,42	ILMN_1800078
LOC100133280	putative POM121-like protein 1-like	1,87	A_23_P427299	3,32	ILMN_3231554
				1,85	A_32_P49668
LOC283788	FSHD region gene 1 pseudogene	0,56	A_24_P497437	0,24	ILMN_1705444
LOC339290	hypothetical LOC339290	0,80	A_24_P526623	1,70	ILMN_3236970
LOC388152	hypothetical LOC388152	1,73	A_23_P305981	0,07	ILMN_1688137
LOC389906	hypothetical LOC389906	1,25	A_32_P40377	9,90	ILMN_1771554
LOC644684	hypothetical LOC644684	1,49	A_32_P169785	1,43	ILMN_3277872
LOC645822	TBC1 domain family, member 3 pseudogene 2	1,25	A_24_P684328	6,60	ILMN_3216298
LOC730144	eukaryotic translation initiation factor 1 pseudogene	1,23	A_24_P391960	0,20	ILMN_3302615
LOC91316	glucuronidase, beta/immunoglobulin lambda-like 1	0,70	A_23_P143600	0,52	ILMN_3235718
LPA	lipoprotein, Lp(a)	0,60	A_23_P95221	0,10	ILMN_1766590
LPAR1	lysophosphatidic acid receptor 1	2,70	A_23_P502879	2,69	ILMN_1701441
LPAR6	lysophosphatidic acid receptor 6	0,59	A_23_P2705	0,65	ILMN_1786429
LRRFIP1	leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1	1,56	A_23_P435183	1,80	ILMN_2214997
LRRIQ3	leucine-rich repeats and IQ motif containing 3	0,56	A_23_P331072	0,31	ILMN_3241661
MAFG	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene G	1,48	A_23_P390044	0,66	ILMN_2412761
MAGED4	melanoma antigen family D, 4B	0,38	A_23_P159907	0,08	ILMN_1788817
				0,51	ILMN_2316278
MAN2A1	mannosidase, alpha, class 2A, member 1	1,24	A_23_P18931	1,68	ILMN_2147435
MARCH8	membrane-associated ring finger (C3HC4) 8	2,40	A_23_P338495	3,86	ILMN_2341626
				3,61	ILMN_2336335
MARCKS	TBC1 domain family, member 3 pseudogene 2	1,37	A_23_P214222	1,43	ILMN_1807042
MCTP1	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	1,75	A_23_P133293	1,73	ILMN_1654685
		1,43	A_24_P212481		
ME1	multiple C2 domains, transmembrane 1	2,47	A_23_P422026	2,61	ILMN_1736042
MED14	mediator complex subunit 14	0,81	A_23_P72187	22,69	ILMN_1813909
METTL9	methyltransferase like 9	1,32	A_24_P112984	1,93	ILMN_2402629
				1,67	ILMN_1726421
METTL18	methyltransferase like 18	0,53	A_23_P85726	0,60	ILMN_1734915
MGC50722	hypothetical MGC50722	2,46	A_24_P912048	0,20	ILMN_1711725
MLL	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia	1,36	A_23_P64217	0,28	ILMN_1679003
MME	membrane metallo-endopeptidase	3,25	A_23_P212061	13,42	ILMN_1678170
		3,21	A_24_P260101		
MOCOS	molybdenum cofactor sulfurase	2,87	A_23_P67042	12,78	ILMN_1673522
MOSC1	MOCO sulphurase C-terminal domain containing 1	1,41	A_24_P233995	1,72	ILMN_1799106
MOSPD2	motile sperm domain containing 2	1,78	A_24_P126093	2,88	ILMN_1766094
		1,70	A_23_P406986	3,14	ILMN_2043569
MS4A3	membrane-spanning 4-domains A, member 3	0,20	A_23_P161909	0,22	ILMN_1695530
MT2A	metallothionein 2A	0,44	A_23_P252413	0,56	ILMN_1686664
		0,43	A_23_P106844		
MTMR10	myotubularin related protein 10	2,45	A_23_P117833	0,83	ILMN_1778734
		1,38	A_24_P55465	0,80	ILMN_3251728
MTPN	myotrophin	1,25	A_23_P147098	1,33	ILMN_2180682

		1,25	A_24_P363615		
MTUS1	microtubule associated tumor suppressor 1	1,88	A_23_P31073	0,17	ILMN_1663648
MYB	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog	4,43	A_23_P258912	2,50	ILMN_1711894
MYOM2	myomesin (M-protein) 2, 165kDa	1,43	A_24_P354488	4,76	ILMN_1716733
NAAA	N-acylethanolamine acid amidase	1,43	A_24_P354488	1,27	ILMN_1668605
				1,54	ILMN_2285568
NAP1L1	nucleosome assembly protein 1-like 1	1,48	A_24_P304458	1,58	ILMN_1699208
				2,10	ILMN_1705876
NAP1L5	nucleosome assembly protein 1-like 5	2,46	A_23_P144369	3,30	ILMN_1773307
NBPF11	neuroblastoma breakpoint family, member 11	1,32	A_32_P27020	2,30	ILMN_2204664
				2,66	ILMN_1698067
				2,55	ILMN_3230608
				2,08	ILMN_2115490
				1,71	ILMN_2155719
NEBL	nebulette	14,26	A_24_P398147	10,68	ILMN_1808824
		11,20	A_23_P104522		
NGLY1	N-glycanase 1	1,44	A_23_P430051	1,34	ILMN_1728779
NMNAT3	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 3	1,84	A_24_P260134	2,77	ILMN_1665123
NNT	nicotinamide nucleotide transhydrogenase	1,22	A_23_P70148	3,44	ILMN_1759396
				1,54	ILMN_1806634
				1,84	ILMN_2336647
NOTCH2NL	notch 2 N-terminal like	0,78	A_24_P366777	3,00	ILMN_1685445
NOV	nephroblastoma overexpressed gene	2,28	A_23_P82929	6,54	ILMN_1787186
NPC1	Niemann-Pick disease, type C1	0,66	A_23_P107587	0,64	ILMN_1713505
NPL	N-acetylneuraminate pyruvate lyase	1,40	A_23_P381431	1,51	ILMN_2149494
NRG1	neuregulin 1	0,46	A_23_P315815	0,30	ILMN_1737252
		0,45	A_23_P136493		
		0,18	A_23_P360777		
NRIP1	nuclear receptor interacting protein 1	1,22	A_23_P211007	1,54	ILMN_1718629
NTPCR	nucleoside-triphosphatase, cancer-related	1,47	A_23_P200252	1,70	ILMN_1657446
NUCB2	nucleobindin 2	1,37	A_24_P595460	1,94	ILMN_1655913
NUDT2	Nudix type motif 2	0,71	A_23_P112478	0,61	ILMN_1778347
NUDT9	Nudix type motif 9	1,57	A_23_P94860	1,60	ILMN_1680239
NXT1	NTF2-like export factor 1	1,37	A_23_P251695	1,39	ILMN_1760280
OR7D2	olfactory receptor, family 7, subfamily D, member 2	9,64	A_23_P410408	69,40	ILMN_1722426
ORMDL3	ORM1-like 3 (S. cerevisiae)	0,73	A_23_P129829	0,33	ILMN_1662174
OSBPL11	oxysterol binding protein-like 11	0,47	A_32_P131401	1,55	ILMN_1687410
PABPC1L2A	poly(A) binding protein, cytoplasmic 1-like 2B	0,62	A_24_P162454	25,69	ILMN_1688113
PACRGL	PARK2 co-regulated-like	1,26	A_24_P311604	17,48	ILMN_3297013
PARP14	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14	0,69	A_24_P920398	0,44	ILMN_1691731
PAX8	paired box 8	0,51	A_23_P210001	0,17	ILMN_2319292
PCSK6	proprotein convertase subtilisin/kexin type 6	3,12	A_23_P390006	0,12	ILMN_1676595
		2,17	A_23_P151907		
PCYOX1L	prenylcysteine oxidase 1 like	1,47	A_23_P30275	1,59	ILMN_1815951
PDK1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	1,57	A_23_P10614	14,92	ILMN_1670256
		1,46	A_24_P37441		
PELI1	pellino homolog 1	1,39	A_23_P120345	1,52	ILMN_1679268
PGA3	pepsinogen 3, group I (pepsinogen A)	0,34	A_23_P150547	16,91	ILMN_1736017
		0,21	A_23_P150549	0,11	ILMN_2232630
PHF20L1	PHD finger protein 20-like 1	1,30	A_24_P403303	20,67	ILMN_2268618
				3,53	ILMN_2361186
PHF23	PHD finger protein 23	0,69	A_24_P5550	0,71	ILMN_1746135
PHKB	phosphorylase kinase, beta	1,24	A_23_P206532	1,68	ILMN_2288232
PHYH	phytanoyl-CoA 2-hydroxylase	1,28	A_23_P115919	0,73	ILMN_2282352
PIGA	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis A	1,56	A_23_P217399	1,57	ILMN_1705985
PIGY	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis Y	1,63	A_24_P140391	1,75	ILMN_1672366
		1,60	A_24_P120380		
PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1	0,73	A_24_P29401	32,56	ILMN_1689057
PKD2	polycystic kidney disease 2 (autosomal dominant)	1,63	A_24_P106112	1,97	ILMN_1807300

PKIA	protein kinase inhibitor alpha	1,59	A_23_P31765	1,85	ILMN_2337974
				1,62	ILMN_1762262
PKM2	pyruvate kinase, muscle	1,25	A_23_P399501	0,59	ILMN_1672650
				0,77	ILMN_1775327
PLAGL1	pleiomorphic adenoma gene-like 1	1,75	A_24_P312041	2,67	ILMN_2356955
PLEKHF1	pleckstrin homology domain containing, family F 1	0,63	A_23_P79130	0,43	ILMN_1708041
		0,60	A_23_P79134		
PMS2	PMS2 postmeiotic segregation increased 2	0,62	A_23_P93792	1,29	ILMN_1677887
POC5	POC5 centriolar protein homolog	0,77	A_23_P413803	0,71	ILMN_2225577
PPARGC1B	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 beta	1,49	A_24_P560519	3,46	ILMN_2195703
PPDPF	pancreatic progenitor cell differentiation and proliferation factor homolog	1,45	A_23_P120364	0,70	ILMN_1720430
PPIG	peptidylprolyl isomerase G	1,93	A_24_P179354	1,71	ILMN_1807611
PPP1CC	protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma	1,28	A_24_P386771	1,28	ILMN_1701855
PRKCA	protein kinase C, alpha	1,41	A_24_P916496	1,58	ILMN_1771800
PRSS1	protease, serine, 1 (trypsin 1)	0,47	A_23_P135257	9,15	ILMN_1685699
PTP4A1	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	1,50	A_24_P252043	1,47	ILMN_2154654
				1,70	ILMN_1760575
PTP4A2	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 2	1,27	A_23_P378968	0,07	ILMN_1689197
PTPN22	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22	0,82	A_23_P149345	1,46	ILMN_1695640
PURB	purine-rich element binding protein B	1,38	A_23_P134517	0,83	ILMN_1750079
PVRL2	poliovirus receptor-related 2	2,28	A_23_P208293	14,27	ILMN_2255382
QKI	quaking homolog, KH domain RNA binding	1,84	A_23_P81760	3,14	ILMN_1690476
				2,79	ILMN_2336280
QPCT	glutaminyl-peptide cyclotransferase	1,62	A_23_P16915	1,68	ILMN_1741727
		1,51	A_24_P71468		
RAB11FIP1	RAB11 family interacting protein 1 (class I)	1,58	A_23_P31873	1,94	ILMN_2409596
RABEP1	rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 1	1,99	A_23_P78158	0,19	ILMN_1679092
		0,64	A_24_P945147	0,58	ILMN_1719622
RAD23B	RAD23 homolog B (S. cerevisiae)	1,25	A_24_P398092	1,92	ILMN_1722662
RASA2	RAS p21 protein activator 2	0,76	A_23_P91964	2,47	ILMN_1703688
RBBP6	retinoblastoma binding protein 6	1,53	A_23_P342053	6,39	ILMN_2309449
RBPMS2	RNA binding protein with multiple splicing 2	6,74	A_23_P100056	3,60	ILMN_1808238
RECK	reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal	1,34	A_24_P415208	1,97	ILMN_2067269
REPS2	RALBP1 associated Eps domain containing 2	1,53	A_32_P100109	1,43	ILMN_1766425
RGPD5	RANBP2-like and GRIP domain containing 5	1,51	A_32_P776626	18,15	ILMN_1667738
				0,29	ILMN_1685736
RHBDD1	rhomboid domain containing 1	1,33	A_24_P134834	0,65	ILMN_1681543
RNASE1	ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic)	5,05	A_24_P403959	25,57	ILMN_2333670
		3,13	A_23_P48596		
RNF34	ring finger protein 34	0,73	A_23_P128396	0,62	ILMN_1786039
RNF130	ring finger protein 130	1,25	A_23_P41734	1,30	ILMN_1729294
RNF138	ring finger protein 138	1,74	A_24_P202512	2,26	ILMN_1655165
RNF170	ring finger protein 170	1,24	A_24_P212677	2,40	ILMN_1709265
RPS26	ribosomal protein S26	1,28	A_32_P24877	2,44	ILMN_2209027
RTN3	reticulon 3	1,39	A_23_P76684	1,84	ILMN_2320906
		1,21	A_32_P61729		
		1,21	A_24_P335221		
S100P	S100 calcium binding protein P	2,79	A_23_P58266	3,15	ILMN_1801216
S1PR5	sphingosine-1-phosphate receptor 5	0,58	A_23_P107744	0,64	ILMN_2073184
		0,55	A_23_P107750		
SEMA4C	semaphorin 4C	0,73	A_23_P9677	0,66	ILMN_2115669
SEPT2	septin 2	1,33	A_23_P170839	2,18	ILMN_1676737
SH3YL1	SH3 domain containing, Ysc84-like 1	1,72	A_23_P68198	1,64	ILMN_1712231
SIGLEC12	sialic acid binding Ig-like lectin 12	0,25	A_23_P164596	0,15	ILMN_1676363
SIK1	salt-inducible kinase 1	2,46	A_23_P132121	2,02	ILMN_1717639
		2,09	A_23_P132115		
SIRPD	signal-regulatory protein delta	1,47	A_32_P74391	2,20	ILMN_1769886

SKAP2	src kinase associated phosphoprotein 2	1,39	A_23_P157128	2,27	ILMN_2125010
				1,24	ILMN_1657129
SLC2A1	solute carrier family 2, member 1	0,71	A_23_P571	0,76	ILMN_1659027
SLC4A1	solute carrier family 4, anion exchanger, member 1	0,46	A_24_P385190	0,26	ILMN_3285762
		0,30	A_23_P89380		
SLC4A11	solute carrier family 4, member 11	1,60	A_23_P154688	0,22	ILMN_1735156
SLC20A1	solute carrier family 20, member 1	0,70	A_24_P103004	0,60	ILMN_1672662
SLC25A20	solute carrier family 25, member 20	1,55	A_23_P72025	1,45	ILMN_1741392
SLC25A41	solute carrier family 25, member 41	0,28	A_23_P313550	0,16	ILMN_1708398
SLC44A1	solute carrier family 44, member 1	1,40	A_24_P479510	1,24	ILMN_1700695
		1,37	A_23_P411806		
SLITRK4	SLIT and NTRK-like family, member 4	2,07	A_32_P131640	2,83	ILMN_2199768
SMAD1	SMAD family member 1	0,51	A_23_P334271	0,22	ILMN_1705392
SNED1	sushi, nidogen and EGF-like domains 1	1,70	A_23_P365267	0,10	ILMN_1795881
SOAT1	sterol O-acyltransferase 1	1,27	A_32_P103131	1,94	ILMN_1699100
SOX4	SRY (sex determining region Y)-box 4	1,81	A_32_P96752	1,84	ILMN_1815745
ST6GALNAC2	ST6-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 2	2,02	A_23_P49499	1,71	ILMN_1658706
STEAP4	STEAP family member 4	3,03	A_24_P351906	7,43	ILMN_1772036
STK17B	serine/threonine kinase 17b	1,56	A_23_P154367	2,25	ILMN_1798543
				3,17	ILMN_2166534
STK39	serine threonine kinase 39	0,72	A_24_P19544	0,80	ILMN_1791328
STX11	syntaxin 11	1,60	A_23_P156788	1,56	ILMN_1720771
SUCLG2	succinate-CoA ligase, GDP-forming, beta subunit	1,23	A_23_P99249	1,72	ILMN_1652379
SUZ12	suppressor of zeste 12 homolog	1,23	A_23_P100883	1,70	ILMN_1797813
SYNC	syncoilin, intermediate filament protein	1,65	A_23_P96965	16,87	ILMN_1771261
TAGLN2	transgelin 2	1,70	A_32_P194848	0,67	ILMN_1691892
		1,51	A_23_P74138		
TAX1BP3	Tax1 binding protein 3	1,97	A_23_P38468	0,66	ILMN_1803392
TBC1D9B	TBC1 domain family, member 9B	1,22	A_24_P17722	1,34	ILMN_2390227
		1,21	A_23_P251611		
TCF7L2	transcription factor 7-like 2	1,78	A_23_P127013	1,81	ILMN_1672486
		1,62	A_24_P921823		
TCL1A	T-cell leukemia/lymphoma 1A	0,43	A_23_P357717	0,33	ILMN_1788841
TES	testis derived transcript	0,81	A_23_P111672	1,74	ILMN_1746243
TLR8	toll-like receptor 8	1,39	A_23_P73837	7,96	ILMN_1682251
TMEM183A	transmembrane protein 183A	1,73	A_24_P182586	2,87	ILMN_3251388
TMEM55A	transmembrane protein 55A	1,67	A_23_P422083	1,79	ILMN_1752117
TNNT1	troponin T type 1	4,05	A_23_P56050	7,59	ILMN_2115991
TP63	tumor protein p63	2,45	A_23_P327380	5,63	ILMN_3305055
TPBG	trophoblast glycoprotein	3,58	A_23_P59261	10,09	ILMN_3247223
TPPP3	tubulin polymerization-promoting protein member 3	2,06	A_23_P26386	3,21	ILMN_1797744
TRIB1	tribbles homolog 1	2,39	A_23_P123503	2,81	ILMN_1803811
		1,88	A_24_P252497		
TRIM64	tripartite motif containing 64	0,37	A_23_P12972	0,04	ILMN_1768365
TRMT11	tRNA methyltransferase 11 homolog	0,79	A_23_P134191	0,13	ILMN_1717854
TSHZ3	teashirt zinc finger homeobox 3	1,31	A_23_P361014	1,77	ILMN_1743933
TSPYL2	TSPY-like 2	1,30	A_23_P158485	0,05	ILMN_2260813
TTC3	tetratricopeptide repeat domain 3	0,74	A_24_P84984	1,25	ILMN_1728605
TTC3L	tetratricopeptide repeat domain 3 pseudogene 1	0,77	A_32_P14201	0,17	ILMN_3310271
TTTY15	testis-specific transcript, Y-linked 15	0,32	A_24_P348861	0,14	ILMN_2077896
UBAP2L	ubiquitin associated protein 2-like	0,67	A_24_P290927	0,71	ILMN_1814789
UBE2J1	ubiquitin-conjugating enzyme E2, J1	1,54	A_23_P214185	1,75	ILMN_1713759
UBR7	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 7	0,74	A_23_P205393	1,56	ILMN_1667839
UNQ6493	EPWW6493	0,70	A_24_P935902	0,15	ILMN_3253560
UQCRFS1	ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1	1,26	A_23_P153586	1,29	ILMN_1701749
USP31	ubiquitin specific peptidase 31	1,45	A_23_P206612	0,20	ILMN_1661156
USP6NL	USP6 N-terminal like	1,36	A_24_P945215	1,77	ILMN_2311826

VNN2	vanin 2	1,92	A_23_P122724	2,18	ILMN_1678939
				1,97	ILMN_1758864
VPS13C	vacuolar protein sorting 13 homolog C	1,38	A_23_P206228	2,92	ILMN_2398865
WDR82	WD repeat domain 82	0,78	A_23_P109877	1,53	ILMN_1679655
XPNPEP3	X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P) 3	2,52	A_24_P915710	7,35	ILMN_1659000
YPEL1	yippee-like 1	0,70	A_23_P40548	0,62	ILMN_1795338
ZADH2	zinc binding alcohol dehydrogenase domain 2	0,63	A_32_P177300	2,75	ILMN_1795063
ZAK	sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase	1,32	A_23_P318300	1,52	ILMN_1768110
ZFAND1	zinc finger, AN1-type domain 1	1,23	A_23_P146050	1,67	ILMN_2087989
ZNF24	zinc finger protein 24	1,43	A_24_P339450	1,34	ILMN_1654357
ZNF124	zinc finger protein 124	1,73	A_32_P875758	4,44	ILMN_1686360
				12,64	ILMN_2110084
ZNF182	zinc finger protein 182	0,70	A_32_P43465	0,54	ILMN_2337835
ZNF322B	zinc finger protein 322B	0,60	A_32_P163533	0,13	ILMN_1700192
ZNF429	zinc finger protein 429	0,47	A_32_P106944	0,10	ILMN_1695413
ZNF567	zinc finger protein 567	0,72	A_23_P354894	0,20	ILMN_2096737
ZNF611	zinc finger protein 611	0,81	A_23_P4604	2,69	ILMN_2181469
ZNF641	zinc finger protein 641	0,61	A_23_P64785	1,98	ILMN_1731666
ZNF708	zinc finger protein 708	0,54	A_32_P46155	15,18	ILMN_1771799
ZNF93	zinc finger protein 93	0,67	A_23_P158885	0,07	ILMN_1726578
		0,66	A_23_P135826		

Annexe 6 :

Tableau 26 : Liste des 37 gènes différemment exprimés chez les sujets SCA2 parkinsoniens et cérébelleux en comparaison avec leurs témoins appariés.

Symbole	Description
APAF1	apoptotic peptidase activating factor 1
BRD4	bromodomain containing 4
C15orf38	chromosome 15 open reading frame 38
CD69	CD69 molecule
CEACAM3	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 3
CHMP4B	chromatin modifying protein 4B
CMKLR1	chemokine-like receptor 1
COL13A1	collagen, type XIII, alpha 1
COL8A2	collagen, type VIII, alpha 2
CPSF1	cleavage and polyadenylation specific factor 1, 160kDa
EHD1	EH-domain containing 1
EZR	ezrin
FAM46C	family with sequence similarity 46, member C
FAM50B	family with sequence similarity 50, member B
FBXO34	F-box protein 34
GTF3C4	general transcription factor IIIC, polypeptide 4, 90kDa
GTSF1	gametocyte specific factor 1
HCP5	HLA complex P5
HERC2P2	hect domain and RLD 2 pseudogene 2
KDM4C	lysine (K)-specific demethylase 4C
KIAA1383	KIAA1383
KLF8	Kruppel-like factor 8
LOC253805	hypothetical protein LOC253805
MARCH3	membrane-associated ring finger (C3HC4) 3
MOSPD2	motile sperm domain containing 2
PAX8	paired box 8
PHTF2	putative homeodomain transcription factor 2
PURA	purine-rich element binding protein A
RGS12	regulator of G-protein signaling 12
SCD	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)
SETD7	SET domain containing (lysine methyltransferase) 7
ST6GALNAC3	ST6-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 3
TBCD	tubulin folding cofactor D
TMEM121	transmembrane protein 121
TRA2A	transformer 2 alpha homolog
ZNF561	zinc finger protein 561
ZNF776	zinc finger protein 776

Annexe 7 :

Tableau 27 : Voies canoniques dérégulées dans les PBMC des parkinsoniens SCA2 par les puces d'expression Agilent et Illumina.

Les voies significatives dans les 2 plateformes sont surlignées en gras.

Voies canoniques	Agilent	Illumina
Signalisation sclérose latérale amyotrophique	0,00021	0,35
Extravasation leucocytaire	0,002	0,21
Signalisation HIF1	0,0029	0,38
Signalisation guidage axonal	0,0093	0,34
Signalisation ERK5	**0,01**	**0,009**
Signalisation cancer endomètre	0,01	0,46
Signalisation Wnt/β-caténine	0,012	0,2
Signalisation VEGF	0,013	0,25
Signalisation cytosquelette d'actine	0,015	
Cycle cellulaire : régulation G1/S	0,016	0,29
Signalisation apoptose médiée par Myc	0,022	0,32
Signalisation PI3K/AKT	0,023	0,52
Signalisation ERK/MAPK	0,025	0,54
Signalisation métastases cancer colorectal	0,025	0,07
Signalisation DHA (acide docosahexaenoïque)	**0,026**	**0,039**
Signalisation IGF1	0,032	0,2
Signalisation diabète MODY	0,038	
Signalisation cellules NK	0,041	0,38
Régulation cyclines et cycle cellulaire	0,043	0,54
Signalisation Rac	0,043	
Signalisation cardiaque β-adrénergique	0,046	0,3
Signalisation ILK	0,047	
Mécanismes moléculaires des cancers	0,07	0,014
Voie pentose phosphate	0,12	0,004
Activation VDR/RXR		0,035
Signalisation tight junction	0,21	0,04
Signalisation hormone de croissance	0,21	0,046

Annexe 8 :

Tableau 28 : Voies canoniques dérégulées dans les PBMC des cérébelleux SCA2 par les puces d'expression Agilent et Illumina.

Les voies significatives dans les 2 plateformes sont surlignées en gras.

Voies Canoniques	Agilent	Illumina
Mécanismes moléculaires des cancers	**0,000004**	**0,00022**
Signalisation apoptose médiée par Myc	0,0002	0,062
Signalisation cancer prostate	**0,00028**	**0,032**
Signalisation immunodéficience primaire	0,001	
Métabolisme inositol phosphate	0,0017	0,19
Signalisation adénocarcinome prostatique	0,0025	0,51
Signalisation p53	**0,0037**	**0,036**
Signalisation acide docosahexaenoïque	0,0038	0,15
Signalisation HER2 dans cancer sein	0,0039	0,05
Signalisation HMGB1	**0,0042**	**0,018**
Signalisation cancer pulmonaire	**0,0063**	**0,018**
Signalisation mélanome	0,0063	0,19
Signalisation 14-3-3	**0,0067**	**0,02**
Signalisation HGF	0,0069	0,29
Signalisation métastases cancer colorectal	**0,0074**	**0,039**
Signalisation RhoA	0,0078	0,16
Processing amyloïde	0,0079	0,51
Signalisation IL4	0,009	0,37
Signalisation p70S6K	**0,0096**	**0,013**
Signalisation gliome	**0,011**	**0,019**
Signalisation PI3K dans lymphocytes B	0,011	0,05
Signalisation rythme circadien	0,011	
Signalisation TREM1	**0,012**	**0,0049**
Signalisation GM-CSF	0,012	0,078
Signalisation cancer pulmonaire à petites cellules	**0,013**	**0,032**
Clivage et polyadénylation des pré-ARNm	0,013	0,21
Cycle cellulaire : régulation G1/S	**0,015**	**0,048**
Signalisation ERK/MAPK	**0,017**	**0,0008**
Signalisation FcγRIIB dans lymphocytes B	0,017	0,35
Signalisation cholecystokinine/gastine	0,018	0,06
Signalisation développement mélanocytes	**0,02**	**0,039**
Signalisation SAPK/JNK	0,022	0,078
Signalisation mTOR	0,026	0,095
Signalisation phospholipase C	0,026	0,17
Production NO et ROS dans macrophages	**0,028**	**0,016**
Signalisation carcinome rénal	0,028	0,13
Signalisation IGF1	0,032	
Signalisation Notch	**0,034**	**0,018**
Signalisation lupus érythémateux disséminé	0,035	0,3
Signalisation maladie de Huntington	0,036	0,52
Signalisation récepteur glucocorticoïdes	0,042	0,14

Signalisation invasion gliome	0,043	0,12
Signalisation FGF	0,043	
Signalisation cancer ovaire	0,044	0,098
Signalisation lymphocytaire dans polyarthrite rhumatoïde	**0,049**	**0,021**
Signalisation ERK5	0,068	0,034
Signalisation p38 MAPK	0,095	0,021
Signalisation Récepteur toll-like	0,11	0,0079
Signalisation macropinocytose	0,11	0,009
Potentialisation synaptique à long terme	0,15	0,018
Signalisation médiée par AMPc	0,16	0,029
Régulation cancer sein par Stathmin 1	0,17	0,022
Signalisation neuregulin	0,18	0,01
Signalisation récepteur ephrin	0,18	0,044
Signalisation PDGF	0,23	0,032
Signalisation guidage axonal	0,27	0,039
Signalisation leucémie aigüe myéloïde	0,3	0,009
Signalisation douleur neuropathique dans neurones corne dorsale	0,31	0,028
Entrée des virus par endocytose	0,32	0,0051
Différenciation lymphocytes T helper	0,34	0,026
Signalisation CDK5	0,43	0,049

Annexe 9 :

Tableau 29 : Gènes dérégulés dans les voies de signalisation d'intérêt chez les sujets SCA2. SCA2p pour les parkinsoniens, SCA2c pour les cérébelleux. ↑ pour surexpression chez les malades ; ↓ pour sous-expression ; NS pour non significatif ; les ratios d'expression sont représentés pour les plateformes Agilent/Illumina.

		SCA2p	SCA2c
Métabolisme inositol phosphate			
AKT2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2		↓/↓
CSNK1D	casein kinase 1, delta		↑/NS
DMPK	dystrophia myotonica-protein kinase		↓/↓
GRK6	G protein-coupled receptor kinase 6		↓/NS
IMPA2	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2		↑/↑
INPP1	inositol polyphosphate-1-phosphatase		↑/↑
IP6K2	inositol hexakisphosphate kinase 2		↑/↓
ISYNA1	inositol-3-phosphate synthase 1		↓/↓
ITPKB	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B		↓/NS
ITPKC	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C		↑/↑
MAP3K6	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6		↑/↑
MINPP1	multiple inositol-polyphosphate phosphatase 1		↑/NS
PI4K2A	phosphatidylinositol 4-kinase type 2 alpha		↓/NS
PIK3CB	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide		↑/NS
PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)	↑/↓	↓/↓
PIP5K2B	phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, beta		↓/NS
PIP5K1A	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, alpha	↑/NS	↑/NS
PKN1	protein kinase N1		↓/NS
PLCH2	phospholipase C, eta 2		↓/↓
PRKCE	protein kinase C, epsilon		↓/NS
PRKCH	protein kinase C, eta	↑/NS	↓/↓
Métabolisme des ARNm			
CPSF	cleavage and polyadenylation specific factor 1, 160kDa		↓/NS
CSTF1	cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 1, 50kDa		↑/↑
CSTF2	cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 2, 64kDa		↑/↑
CSTF2T	cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 2, 64kDa, tau variant	↑/NS	↑/NS
CSTF3	cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 3, 77kDa		↑/↑
DCP2	DCP2 decapping enzyme homolog (S. cerevisiae)		↑/NS
DDX6	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6	↑/↓	↓/NS
EDC3	enhancer of mRNA decapping 3 homolog (S. cerevisiae)		↓/NS
MAGOH	mago-nashi homolog, proliferation-associated (Drosophila)		↓/NS
PSIP1	PC4 and SFRS1 interacting protein 1		↓/↓
RBM8A	RNA binding motif protein 8A		↓/↓
RNPS1	RNA binding protein S1, serine-rich domain		↓/NS
SRSF1	serine/arginine-rich splicing factor 1	↓/NS	↑/NS
SRSF6	serine/arginine-rich splicing factor 6		↓/NS
SRRM1	serine/arginine repetitive matrix 1		↓/NS
TRA2A	transformer 2 alpha homolog (Drosophila)	↓/↓	↓/↓
U2AF1	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1		↓/↓
UPF1	UPF1 regulator of nonsense transcripts homolog (yeast)		↑/NS
WIBG	within bgcn homolog (Drosophila)		↑/↑
Signalisation du cancer			
ABL1	c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase		↓/↓
AKT2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2		↓/↓
APAF1	apoptotic peptidase activating factor 1		↑/↑
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	↑/↓	↓/↓

BCL2L1	BCL2-like 1	↓/↓	
CAMK2D	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta		↓/↓
CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)		↓/↓
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A		↓/↑
CRK	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)		↑/↑
CTNNB1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	↓/↓	
E2F6	E2F transcription factor 6		↑/↓
FNBP1	formin binding protein 1		↓/NS
FNBP1L	formin binding protein 1-like	↓/↓	↑/↑
FOXO1	forkhead box O1		↓/NS
FZD2	frizzled homolog 2 (Drosophila)		↑/↑
FZD3	frizzled homolog 3 (Drosophila)		↓/NS
GRB2	growth factor receptor-bound protein 2		↓/NS
ITPR3	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3		↓/NS
MAP3K5	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5		↑/NS
MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14		↑/↓
MMP9	matrix metallopeptidase 9	↓/↓	
MRAS	muscle RAS oncogene homolog	↑/↓	
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	↑/NS	
PDGFC	platelet derived growth factor C		↑/↑
PGF	placental growth factor	↑/↓	
PIK3CB	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide		↑/NS
PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)	↑/↓	↓/↓
PRKACB	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, beta		↓/↓
PRKAR2A	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, alpha	↑/↑	↓/NS
PRKCE	protein kinase C, epsilon		↓/NS
PRKCH	protein kinase C, eta	↑/NS	↓/↓
PTK2	PTK2 protein tyrosine kinase 2		↓/↓
RB1	retinoblastoma 1		↓/NS
RHOF	ras homolog gene family, member F (in filopodia)		↓/NS
RHOH	ras homolog gene family, member H		↓/↓
RHOU	ras homolog gene family, member U		↓/NS
RRAS2	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2		↓/↓
SIN3A	SIN3 homolog A, transcription regulator (yeast)		↓/NS
SMAD3	SMAD family member 3		↓/NS
SMAD4	SMAD family member 4		↑/↑
TP53	tumor protein p53	↑/NS	
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	↑/↓	
WNT6	wingless-type MMTV integration site family, member 6		↑/↑
Signalisation de l'apoptose			
APAF1	apoptotic peptidase activating factor 1		↑/↑
AVEN	apoptosis, caspase activation inhibitor		↓/↓
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	↑/↓	↓/↓
CASP10	caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase	↑/↑	↑/↑
FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain		↑/↑
FASL	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)		↑/↑
TNFRSF1	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A		↑/↑
TNFRSF6B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6b, decoy		↓/↑
TP53	tumor protein p53	↑/NS	
XAF1	XIAP associated factor 1	↑/↑	
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis	↑/NS	
Signalisation Rac/RhoA/cytosquelette d'actine			
ACTC1	actin, alpha, cardiac muscle 1	↑/↓	
ACTN1	actinin, alpha 1	↓/↓	
ACTR2	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)	↑/NS	
ANK1	ankyrin 1, erythrocytic	↓/↓	
APC2	adenomatosis polyposis coli 2	↑/↓	
ARHGEF11	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 11	↑/↓	↑/↑

BAIAP2	BAI1-associated protein 2	↑/NS	
CDC42	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)	↑/↓	
CDC42EP1	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 1	↑/↑	
CDC42EP4	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 4	↑/NS	
FGD1	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 1	↑/↓	
FGF3	fibroblast growth factor 3	↑/↑	
GNA12	guanine nucleotide binding protein (G protein) alpha 12	↓/↓	↓/↓
GRLF1	glucocorticoid receptor DNA binding factor 1	↑/↓	↓/↓
GSN	gelsolin	↓/↓	
IQGAP2	IQ motif containing GTPase activating protein 2	↑/↓	
MRAS	muscle RAS oncogene homolog	↑/↓	
MSN	moesin	↑/NS	
PAK4	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 4	↑/↓	
PDGFD	platelet derived growth factor D	↑/↑	
PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)	↑/↓	↓/↓
PIP5K1C	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, gamma	↑/↓	
PRKCH	protein kinase C, eta	↑/NS	↓/↓
VAV3	vav 3 guanine nucleotide exchange factor	↑/↓	
Signalisation SLA/HIF1/VEGF			
ACTC1	actinin, alpha 1	↑/↓	
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	↑/↓	↓/↓
BCL2L1	BCL2-like 1	↓/↓	
BCL2L2	BCL2-like 2	↓/↓	
CACNA1A	calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit	↑/↓	
CACNA1C	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	↑/↓	
CACNA1E	calcium channel, voltage-dependent, R type, alpha 1E subunit	↑/↓	
CAPN5	calpain 5	↑/↑	NS/NS
CCS	copper chaperone for superoxide dismutase	↓/NS	
CREBBP	CREB binding protein	↑/NS	
FLT4	fms-related tyrosine kinase 4	↑/↓	
GRIN1	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1	↑/↓	NS/↑
GRIN2D	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2D	↑/↓	
LDHC	lactate dehydrogenase C	↑/↑	
MMP17	matrix metallopeptidase 17 (membrane-inserted)	↑/↑	
MMP19	matrix metallopeptidase 19	↑/↑	
MMP25	matrix metallopeptidase 25	↓/↓	
MMP9	matrix metallopeptidase 9	↓/↓	
MRAS	muscle RAS oncogene homolog	↑/↓	
NEFM	neurofilament, medium polypeptide	↑/↓	
PGF	placental growth factor	↑/↓	
PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)	↑/↓	↓/↓
SLC2A3	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	↑/NS	
SLC2A5	solute carrier family 2, member 5	↓/↓	
TP53	tumor protein p53	↑/NS	
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	↑/↓	
YWHAE	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon	↓/NS	↑/↓

Annexe 10 :

Tableau 30 : Liste des gènes dérégulés pour chaque stade clinique et présents dans les 3 expériences.

RE pour ratio d'expression ; RE1, RE2 et RE3 pour les expériences Agilent 1, Agilent 2 et Illumina, respectivement.

		Stade 1			Stade 2			Stade 3		
Gène	**Description**	**RE1**	**RE2**	**RE3**	**RE1**	**RE2**	**RE3**	**RE1**	**RE2**	**RE3**
ABCC13	ATP-binding cassette, sub-family C, member 13							0,29	0,31	7,13
ADAMTS13	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1, 13				1,7	1,51	0,18			
ADAMTS14	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1, 14							2,2	1,45	8,7
ADCY6	adenylate cyclase 6							0,42	0,47	0,15
AFF3	AF4/FMR2 family, member 3	1,45	1,74	0,13						
AFTPH	aftiphilin	0,72	0,66	0,7						
AGL	amyloalpha-1, 6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase							0,75	0,72	0,45
AHI1	Abelson helper integration site 1							0,67	0,59	0,09
AHNAK	AHNAK nucleoprotein							1,42	0,74	1,44
AHSP	alpha hemoglobin stabilizing protein				0,05	0,07	0,23	0,04	0,05	0,19
AK4	adenylate kinase 4				0,71	0,53	0,13			
AKT3	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3	1,93	1,89	3,86	1,36	2,8	1,39	1,44	1,82	1,96
ALAS2	aminolevulinate, delta-, synthase 2							0,02	0,06	0,08
ALOX5	arachidonate 5-lipoxygenase				1,44	0,75	0,58			
ALPP	alkaline phosphatase, placental	1,39	1,37	1,61						
ANAPC1	anaphase promoting complex subunit 1				5,03	2,6	1,39			
ANKRD36B	ankyrin repeat domain 36B				0,71	0,68	0,21			
APBA1	amyloid beta precursor protein-binding, family A, 1							1,45	1,4	0,13
APBB1IP	amyloid beta precursor protein-binding, family B, 1interacting protein	0,72	0,65	0,66						
ATCAY	ataxia, cerebellar, Cayman type	2,19	1,45	0,48						
ATF6B	activating transcription factor 6 beta	1,33	0,52	0,71						
ATP11A	ATPase, class VI, type 11A				1,43	0,71	0,15			
ATXN7	ataxin 7	0,65	1,55	0,06						
BET1	blocked early in transport 1 homolog							0,59	0,72	0,67
BICD2	bicaudal D homolog 2							0,7	0,69	0,08
BLZF1	basic leucine zipper nuclear factor 1	1,6	0,74	1,97						
BSG	basigin	0,69	0,74	0,71						
BTLA	B and T lymphocyte associated							0,57	0,59	0,56
C10orf26	chromosome 10 open reading frame 26							0,66	0,74	0,76
C15orf29	chromosome 15 open reading frame 29	0,6	0,65	1,49						
C15orf57	chromosome 15 open reading frame 57							0,76	0,72	0,75
C16orf81	chromosome 16 open reading frame 81							3	2,26	11,3
C17orf91	chromosome 17 open reading frame 91							1,53	1,78	1,7
C1orf103	chromosome 1 open reading frame 103							0,54	0,75	0,1
C1orf77	chromosome 1 open reading frame 77	0,66	0,63	0,64						
C3orf34	chromosome 3 open reading frame 34							0,45	0,5	0,49
C3orf51	chromosome 3 open reading frame 51	2,38	1,7	0,04						
C3orf58	chromosome 3 open reading frame 58							0,66	0,72	1,33
C9orf86	chromosome 9 open reading frame 86	1,7	1,94	0,76						
CACNA1E	calcium channel, voltage-dependent, R type, alpha 1E				5,62	4,24	0,13			
CASP8	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase				1,31	2,16	1,69			
CBLL1	CasBrM ecotropic retroviral transforming sequence-like 1	0,69	0,58	0,58						
CBR1	carbonyl reductase 1				0,65	0,72	0,57			
CC2D2B	coiled-coil and C2 domain containing 2B	1,39	1,82	0,08	2,14	1,31	0,1	1,89	1,39	0,09
CCDC144A	coiled-coil domain containing 144A				1,94	1,92	0,11			

CCDC88C	coiled-coil domain containing 88C				1,38	1,41	1,37			
CCNL2	cyclin L2	0,66	1,35	11,3						
CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	1,35	1,63	2,84						
CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex	1,37	0,71	0,68						
CD79B	CD79b molecule, immunoglobulin-associated beta							0,51	0,53	0,54
CETN3	centrin, EF-hand protein, 3							0,4	0,62	0,66
CISH	cytokine inducible SH2-containing protein							0,48	0,47	0,52
CLK1	CDC-like kinase 1	2,08	1,47	1,99						
CLP1	CLP1, cleavage and polyadenylation factor I subunit	1,39	1,81	2,13						
COL4A3BP	collagen, type IV, alpha 3 binding protein	0,7	1,49	1,64						
COX6A2	cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 2	1,7	2,71	11,1						
CPLX2	complexin 2	14,3	1,31	2,36						
CRHR1	corticotropin releasing hormone receptor 1	1,42	1,53	1,61						
CSTF2	cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 2							0,7	0,71	0,76
DCAF12	DDB1 and CUL4 associated factor 12				0,54	0,6	0,7			
DHRS2	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2				1,97	2,2	0,09			
DMD	dystrophin				2,62	0,43	0,12			
DUSP18	dual specificity phosphatase 18							0,68	0,59	0,72
DYRK1A	dual-specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase 1A							1,83	1,74	1,33
EBI3	Epstein-Barr virus induced 3				0,43	0,47	0,09	0,39	0,49	0,13
EIF2B4	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 4 delta	0,7	0,73	0,72						
EIF3B	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit B	1,46	0,67	0,7						
ERI2	ERI1 exoribonuclease family member 2				0,6	0,72	4,83			
F11R	F11 receptor	2,55	0,75	0,21						
FAM110A	family with sequence similarity 110, member A							0,77	0,71	0,72
FAM126B	family with sequence similarity 126, member B				0,72	0,57	0,48			
FAM133B	family with sequence similarity 133, member B	1,68	4,22	2,01						
FAM47C	family with sequence similarity 47, member C							2	1,7	0,11
FAM60A	family with sequence similarity 60, member A				0,77	1,74	1,36			
FAM81B	family with sequence similarity 81, member B				0,3	0,48	0,21			
FARSA	phenylalanyl-tRNA synthetase, alpha subunit	0,88	0,63	0,59				0,69	0,76	0,72
FBLIM1	filamin binding LIM protein 1	1,84	2,93	32,4						
FBXO22	F-box protein 22							0,74	1,78	0,62
FBXO9	F-box protein 9				0,73	1,38	0,65			
FCRL5	Fc receptor-like 5							0,33	0,36	0,61
FECH	ferrochelatase				0,63	0,65	0,14			
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1				0,5	0,4	4,85			
FIBCD1	fibrinogen C domain containing 1				1,71	1,49	0,26			
FLJ35390	hypothetical LOC255031	3,22	2,06	1,46						
FLJ39061	hypothetical protein FLJ39061							2,81	2,07	10,4
FOXC2	forkhead box C2	1,92	1,7	0,11						
FOXD1	forkhead box D1	1,9	1,58	0,12				1,9	1,58	0,12
FOXI1	forkhead box I1				1,48	1,33	0,16			
FSD1	fibronectin type III and SPRY domain containing 1	1,56	0,7	0,02						
GBGT1	globoside alpha-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 1				1,4	0,67	0,75			
GPRIN1	G protein regulated inducer of neurite outgrowth 1	1,68	1,63	0,22						
GRB10	growth factor receptor-bound protein 10				0,54	0,58	0,08			
GRIN1	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1							3,8	4,19	7,13
HBD	hemoglobin, delta							0,06	0,09	0,33
HBM	hemoglobin, mu							0,06	0,09	0,04
HEBP2	heme binding protein 2	1,91	1,68	1,55				1,48	1,76	1,35
HIAT1	hippocampus abundant transcript 1	1,7	1,65	1,54						
HIST1H3A	histone cluster 1, H3a	1,94	2,49	17						

HOOK3	hook homolog 3							0,71	0,75	1,36
HSH2D	hematopoietic SH2 domain containing				1,43	1,36	1,51			
HSPA6	heat shock 70kDa protein 6				0,55	0,45	0,59			
HSPA8	heat shock 70kDa protein 8	1,67	1,43	0,73						
ICA1	islet cell autoantigen 1, 69kDa				0,29	0,52	0,12	0,53	0,62	0,11
IER5	immediate early response 5							2,46	4,38	1,5
INE1	inactivation escape 1	1,74	2,73	0,07						
ING5	inhibitor of growth family, member 5	0,63	0,69	0,16						
INTS5	integrator complex subunit 5							0,66	0,68	0,68
IRF2	interferon regulatory factor 2	1,79	0,61	0,64						
ISY1	ISY1 splicing factor homolog	1,32	1,39	0,75						
ITGB1	integrin, beta 1				0,69	0,66	9,24			
KCNN4	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, N4				0,71	0,63	0,59	0,56	0,5	0,68
KIAA0040	KIAA0040	0,55	0,37	0,12	0,38	0,62	0,69			
KIAA0125	KIAA0125							0,5	0,45	0,37
KREMEN1	kringle containing transmembrane protein 1				0,49	0,34	8,56			
KRT15	keratin 15							1,48	1,36	7,94
KRTAP2-4	keratin associated protein 2-4	1,97	2,11	0,07						
LCE2B	late cornified envelope 2B							3,35	1,48	4,82
LOC388588	hypothetical protein LOC388588				0,57	0,7	0,63			
LOC642006	glucuronidase, beta pseudogene	2,5	1,38	6,9						
LOXL3	lysyl oxidase-like 3				0,54	0,58	0,63	0,7	0,66	0,56
LTBP3	latent transforming growth factor beta binding protein 3	0,46	1,57	0,08	1,47	0,7	0,18			
LYNX1	Ly6/neurotoxin 1							2,4	2,51	0,15
MAP4K5	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 5				0,69	0,74	1,31			
MARCH8	membrane-associated ring finger 8							0,67	0,72	8,68
METTL21A	methyltransferase like 21A	1,68	1,86	1,85						
MEX3D	mex-3 homolog D							1,51	1,75	0,55
MGC34800	hypothetical protein MGC34800							2,35	3,35	7,24
MIDN	midnolin							1,33	1,4	1,4
MKKS	McKusick-Kaufman syndrome							0,52	0,72	0,69
MME	membrane metallo-endopeptidase				0,41	0,38	0,14			
MMP19	matrix metallopeptidase 19				1,4	1,52	0,11			
MNDA	myeloid cell nuclear differentiation antigen				0,56	0,59	0,76			
MRPL35	mitochondrial ribosomal protein L35							0,74	0,77	0,62
MTSS1	metastasis suppressor 1							0,59	0,66	0,7
MUC2	mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming	2,37	1,73	7,94						
MUC4	mucin 4, cell surface associated				1,84	1,59	0,09			
MYB	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog				0,6	0,7	0,74			
MYL4	myosin, light chain 4, alkali; atrial, embryonic							0,02	0,14	0,11
NAP1L1	nucleosome assembly protein 1-like 1	9,91	1,56	2,28						
NBEAL1	neurobeachin-like 1				1,88	1,96	0,62			
NBPF11	neuroblastoma breakpoint family, member 11							1,31	0,69	1,59
NCOA1	nuclear receptor coactivator 1	0,72	1,31	1,63						
NCRNA00265	non-protein coding RNA 265	1,72	1,36	31						
NDOR1	NADPH dependent diflavin oxidoreductase 1				2,79	1,55	4,3	2,32	1,4	5,42
NDUFS7	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7	0,68	1,35	0,73						
NEMF	nuclear export mediator factor							0,74	0,76	0,7
NFE2	nuclear factor (erythroid-derived 2), 45kDa				0,59	0,63	0,65			
NFE2L1	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 1	0,72	0,65	0,54						
NLRP12	NLR family, pyrin domain containing 12				0,64	0,63	0,57			
NMD3	NMD3 homolog				0,71	0,65	1,49			
NPIPL3	nuclear pore complex interacting protein-like 3	1,45	1,33	3,08						

NUPL1	nucleoporin like 1	0,76	0,56	12,5						
ODZ3	odz, odd Oz/ten-m homolog 3	2,77	2,03	0,23						
OGDH	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase	0,62	1,39	0,67						
OLFML1	olfactomedin-like 1	1,96	2,3	0,09						
OLIG1	oligodendrocyte transcription factor 1				0,48	0,57	0,49			
P2RY14	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14							0,58	0,53	15,8
PAK4	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 4	1,34	1,74	0,06						
PAPOLG	poly(A) polymerase gamma							0,65	0,71	0,16
PARD6G	par-6 partitioning defective 6 homolog gamma							2,38	1,38	0,15
PBRM1	polybromo 1				0,72	0,65	0,62			
PDE4C	phosphodiesterase 4C, cAMP-specific	1,67	1,73	1,34						
PFKFB4	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4				0,77	0,65	0,76			
PI4K2A	phosphatidylinositol 4-kinase type 2 alpha	0,72	1,82	0,57						
PITPNC1	phosphatidylinositol transfer protein, cytoplasmic 1							1,31	0,76	1,32
PKD1	polycystic kidney disease 1	0,63	1,58	0,59						
PLXNA4	plexin A4				2,34	2	0,09			
POM121	POM121 membrane glycoprotein	0,64	0,55	0,08						
PRKAB2	protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic							0,67	0,63	1,66
PSEN1	presenilin 1	1,58	2,62	0,04						
PTK2	PTK2 protein tyrosine kinase 2				0,61	0,58	0,12			
PVRIG	poliovirus receptor related immunoglobulin domain	0,6	0,71	0,49						
RAP2C	RAP2C, member of RAS oncogene family				2,07	0,63	1,37			
RIN1	Ras and Rab interactor 1				0,71	0,44	0,65			
RNF149	ring finger protein 149	1,3	1,49	1,89						
RNF182	ring finger protein 182							0,26	0,2	0,14
RORA	RAR-related orphan receptor A				1,51	1,64	1,47	1,41	1,51	1,41
RPL27A	ribosomal protein L27a	0,75	2,07	0,74						
S100A13	S100 calcium binding protein A13	0,76	1,38	0,09						
SFTPA1	surfactant protein A1							0,65	1,42	0,08
SH2D1B	SH2 domain containing 1B				1,7	1,59	1,6			
SH2D3C	SH2 domain containing 3C							0,71	0,59	0,69
SKP1	S-phase kinase-associated protein 1	1,61	2,63	1,75	3,35	1,81	1,4	2,88	1,54	1,37
SLC16A7	solute carrier family 16, member 7				0,65	0,5	0,14			
SLC26A6	solute carrier family 26, member 6	0,66	2,39	0,77						
SLC2A1	solute carrier family 2, member 1				2,33	1,69	1,32			
SLC2A5	solute carrier family 2, member 5				1,62	2,11	0,5	1,83	1,65	0,49
SLC30A5	solute carrier family 30, member 5	0,77	0,59	1,41						
SLC3A2	solute carrier family 3, member 2	1,51	1,41	1,61						
SLC4A1	solute carrier family 4, anion exchanger, member 1				0,51	0,36	0,32	0,46	0,37	0,12
SMA4	glucuronidase, beta pseudogene							0,68	0,59	0,61
SMARCA2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, A2							1,94	1,38	9,12
SMPD4	sphingomyelin phosphodiesterase 4, neutral membrane	0,64	1,31	0,05						
SNRK	SNF related kinase	1,38	2,36	1,47	1,33	1,89	1,36			
SON	SON DNA binding protein							0,76	1,61	1,38
SOX18	SRY (sex determining region Y)-box 18	4,25	2,36	7,71						
SPPL2B	signal peptide peptidase-like 2B	1,58	1,98	4,27				1,75	1,94	0,18
SPSB2	splA/ryanodine receptor domain and SOCS box 2	0,58	0,65	0,47						
SSX2	synovial sarcoma, X breakpoint 2	1,96	2,2	10,7	2,05	2,21	2,14			
STAC2	SH3 and cysteine rich domain 2	1,72	1,68	0,03						
STIP1	stress-induced-phosphoprotein 1							0,72	0,69	0,7
SURF6	surfeit 6	0,75	0,7	0,59				0,69	0,62	0,75
SYCN	syncollin	2,41	2,01	0,11						
TBC1D24	TBC1 domain family, member 24	0,75	0,72	1,54	0,75	0,72	1,54			

THUMPD1	THUMP domain containing 1	1,44	1,33	1,38	0,68	0,74	1,33			
TLR10	toll-like receptor 10							0,28	0,43	0,5
TLR5	toll-like receptor 5				0,61	0,73	0,73			
TMED7	transmembrane emp24 protein transport domain 7							0,49	0,61	1,38
TMEM151A	transmembrane protein 151A							1,54	1,38	5,32
TMEM191B	transmembrane protein 191B							2,06	1,93	0,45
TMEM30B	transmembrane protein 30B	1,51	1,68	2,3						
TNRC6A	trinucleotide repeat containing 6A				2,19	1,52	0,12			
TNS3	tensin 3				0,75	0,73	0,77			
TNXB	tenascin XB							3,53	3,13	5,08
TRIM13	tripartite motif containing 13							1,34	0,57	0,69
TRPC4AP	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4 associated protein	0,74	1,37	0,68						
URB1	URB1 ribosome biogenesis 1 homolog							0,57	0,73	1,42
URB2	URB2 ribosome biogenesis 2 homolog							0,65	0,77	0,73
USP36	ubiquitin specific peptidase 36	0,69	1,74	1,45						
WASF1	WAS protein family, member 1							0,64	0,57	9,89
WDFY3	WD repeat and FYVE domain containing 3				0,63	0,43	0,17			
WDR20	WD repeat domain 20	1,45	0,7	1,32						
WDR92	WD repeat domain 92							0,61	0,61	0,63
YIF1B	Yip1 interacting factor homolog B	0,65	1,68	0,74						
ZBTB44	zinc finger and BTB domain containing 44	2,08	1,5	1,78						
ZMIZ2	zinc finger, MIZ-type containing 2	1,39	0,75	0,03						
ZNF292	zinc finger protein 292	0,68	1,64	7,32						
ZNF320	zinc finger protein 320	1,31	0,76	8,47						
ZNF626	zinc finger protein 626							0,55	1,86	0,2
ZNF644	zinc finger protein 644	1,4	0,7	2,12						
ZNF665	zinc finger protein 665							0,61	0,56	0,48
ZNF667	zinc finger protein 667	0,31	0,29	34,5						
ZNF672	zinc finger protein 672	0,7	0,76	0,55						
ZNF93	zinc finger protein 93	1,37	0,59	0,23	0,73	1,39	0,44			

Annexe 11 :

Tableau 31 : Liste des voies canoniques dérégulées (p<0,05) à partir de la liste des 3070 gènes dérégulés communs à tous les stades de la MP.

Voies canoniques	***p***
Signalisation RhoA	0,00001
Présentation antigènes	0,00002
Signalisation ERK5	0,00002
Signalisation Cdc42	0,00004
Signalisation cytosquelette d'actine	0,0001
Signalisation maladie de Huntington	0,0002
Signalisation leucémie myéloïde chronique	0,0002
Signalisation intégrines	0,0003
Extravasation leucocytaire	0,0005
Ubiquitination des protéines	0,0006
Signalisation hypertrophie cardiaque	0,0009
Régulation de la mobilité cellulaire par Rho	0,001
Signalisation récepteur cellules B	0,0011
Signalisation Nur77 dans lymphocytes T	0,0013
Cycle cellulaire : régulation G1/S	0,0013
Mécanismes moléculaires des cancers	0,0015
Signalisation guidage axonal	0,0022
Méthylation ADN et répression transcription	0,0022
Signalisation récepteur ephrin	0,0026
Signalisation PTEN	0,0028
Rôle de PKR dans la réponse antivirale	0,0034
Signalisation Rac	0,0041
Röle neuroprotecteur de THOP1 dans Alzheimer	0,0042
Signalisation mTOR	0,0042
Régulation cyclines et cycle cellulaire	0,0045
Processing amyloïde	0,0048
Signalisation EIF2	0,0055
Signalisation Wnt/β-caténine	0,0059
Signalisation p53	0,0065
Signalisation VEGF	0,0065
Signalisation RANK dans ostéoclastes	0,0071
Induction de l'apoptose par HIV1	0,0076
Signalisation ILK	0,0079
Signalisation apoptose	0,0081
Signalisation FLT3 dans progéniteurs hématopoïétiques	0,0085
Signalisation Gα12/13	0,0091
Signalisation BMP	0,0098
Signalisation androgènes	0,01
Signalisation eIF4 et p70S6K	0,01
Signalisation cancer pulmonaire à petites cellules	0,011
Rôle de NFAT dans régulation réponse immunitaire	0,012
Activation RAR	0,012
Signalisation neuregulin	0,013
Signalisation PI3K/AKT	0,014
Signalisation FGF	0,015
Signalisation carcinome pancréatique	0,018
Apoptose calcique-induite dans lymphocytes B	0,018
Signalisation IL-17	0,019
Signalisation CD28 dans Cellules T helper	0,019

Signalisation phospholipase C	0,02
Signalisation cancer prostate	0,021
Signalisation récepteur insuline	0,021
Signalisation récepteur glucocorticoïdes	0,023
Signalisation CD27 dans lymphocytes	0,025
Signalisation OX40	0,026
Signalisation IL-22	0,027
Signalisation cancer sein héréditaire	0,028
Signalisation HMGB1	0,028
Signalisation ATM	0,03
Signalisation leucémie aigüe myéloïde	0,033
Apoptose médiée par Myc	0,034
Rôle de NFAT dans hypertrophie cardiaque	0,035
Signalisation sclérose latérale amyotrophique	0,035
Signalisation CXCR4	0,036
Signalisation carcinome rénal	0,038
Signalisation GNRH	0,038
Signalisation cancer endomètre	0,038
Signalisation diabète type I	0,04
Dysfonctionnement mitochondrial	0,041
Signalisation tight junction	0,041
Dégradation N-glycan	0,041
Phagocytose médiée par récepteur Fcγ	0,042
Signalisation iCOS dans cellules T helper	0,043
Signalisation 14-3-3	0,045
Signalisation p38 MAPK	0,048
Signalisation IL-15	0,049

VIII. ARTICLES