



HAL
open science

Approche multifactorielle de la dégénérescence parkinsonienne

Mathieu Bourdenx

► **To cite this version:**

Mathieu Bourdenx. Approche multifactorielle de la dégénérescence parkinsonienne. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0135 . tel-01424135

HAL Id: tel-01424135

<https://theses.hal.science/tel-01424135>

Submitted on 2 Jan 2017

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE : Sciences de la Vie et de la Santé

SPÉCIALITÉ : Neurosciences

Par Mathieu Bourdenx

**Approche multifactorielle de la dégénérescence
parkinsonienne**

Sous la direction de M. le Docteur Erwan Bezard

Soutenue le 11 décembre 2015

Membres du jury :

Dr. BROUILLET Emmanuel	Directeur de recherche	CEA	Président
Dr. GASNIER Bruno	Directeur de recherche	Université Paris Descartes	Rapporteur
Dr. BUEE Luc	Directeur de recherche	Université Lille 2	Rapporteur
Dr. DEHAY Benjamin	Chargé de recherche	Université de Bordeaux	Invité
Dr. BEZARD Erwan	Directeur de recherche	Université de Bordeaux	Directeur de thèse

« Je ne sais qu'une chose, c'est que je ne sais rien. »

Socrate ... mais surtout ma grand-mère paternelle

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Emmanuel Brouillet d'avoir bien voulu juger ce travail et lui suis reconnaissant du grand honneur qu'il me fait en acceptant de présider cette thèse. Mes remerciements vont également au Dr. Bruno Gasnier et au Dr Luc Buée pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

J'adresse mes plus sincères remerciements au Dr Erwan Bezard, mon directeur de thèse. Merci de m'avoir accepté dans votre équipe il y a 6 ans alors que je n'étais qu'un jeune étudiant en licence persuadé de ne surtout pas vouloir faire de recherche fondamentale, d'avoir su me guider et me conseiller dans les moments de doute, de m'avoir poussé à élargir mes horizons (la licence à Besançon, M2 chez Serge) et d'avoir joué ce rôle de mentor, toujours disponible, qui m'a poussé à faire cette thèse. Au cours de ces trois dernières années, merci de m'avoir donné un nombre incroyable d'opportunités, de toujours avoir été partant pour les projets les plus fous, de répondre aux emails en 2 heures peu importe où vous êtes dans le monde (même si c'est souvent « oui » ou « non » à email auquel on ne peut évidemment pas répondre « oui » ou « non »). Merci pour votre rigueur, votre curiosité intarissable et vos conseils. J'espère à nouveau parodier vos vidéos (plus nombreuses maintenant) dans les prochains années !

Vient ensuite le Dr. Benjamin Dehay ... Ben, mon co-directeur de thèse qui n'en a jamais endossé le titre ... que dire si ce n'est ton rôle inestimable dans ce travail ? Pas une seule phrase de ce manuscrit n'aurait pu voir le jour sans toi. Merci pour m'avoir tout appris sur un plan expérimental, pour avoir toujours un protocole simple, un tampon magique à une manip rébarbative. Merci pour la confiance que tu as placée en moi, j'espère en avoir été digne. Je me souviens de ton mail qui disait « *protéger les autres (neurones) en leur donnant plein de petits lysosomes fonctionnels* », eh bien tu vois, on a réussi ! Merci de m'avoir expliqué les coulisses du monde des « grands ». Merci pour tes qualités humaines, ton amour des gin-tonics italiens, espagnols, américains et français ! Et enfin, surtout, merci pour ton amitié.

Je tiens également à remercier le ministère de l'enseignement et de la recherche pour le soutien financier au cours de ces trois années et l'association France Parkinson pour l'année à venir.

Merci à POF, mon premier tuteur, pour m'avoir fait manipuler mes premières souris. Merci pour ta patience, pour toutes les discussions que nous avons pu avoir, scientifiques ou non. Merci pour ton humour, tes connaissances musicales, ta presque évasion de la voiture pour quelques notes de Supertramp, tes coups de téléphone de préparation de l'école doctorale et de m'y avoir soutenu dans l'adversité !

Merci à Sandra pour ton caractère légendaire, pour ton implication dans ce travail, pour être toujours partante pour des protocoles complètement fous (séries de syn chez le babouin ... 650 lames !), pour ta sympathie, pour les cafés partagés et toutes les discussions, pour tes textos à des heures improbables, pour avoir fait une liste de toutes mes bêtises, pour ta conduite sportive sur les routes espagnoles et j'en passe et des meilleurs !

Merci à Grégory pour avoir fait de moi un machine à stéréotaxie (190 souris et 50 babouins en une semaine, qui dit mieux !?), pour ton humour décapant, ton amour des fraises tagada, les missions à l'aéroport de Mérignac, les BDs que tu connais mieux qu'Erwan ne connaît sa biblio. Merci pour tout l'ami !

Merci à mon homonyme, le grand Bastide, pour tous ces bons moments, pour être un geek pire que moi, pour toutes les discussions que nous avons pu avoir, les USA, les restos, les 6000 messages à l'heure et les futures randos !

Merci à mes collègues de bureau pour l'ambiance survoltée, j'ai nommé le plus libanais des français : Dr. El Pussay, le plus fou des italiens que nous avons pu côtoyer : Dr. Bidet-Bido. Je ne saurais oublier l'autre italien : the *amaaaazing* Luco-dico sans qui je n'aurai pas pu entrer dans le guinness book pour le nombre de souris opérées en une semaine, heureusement que je pouvais te surveiller de mon balcon ! Heureusement que tu es là, Fédé, pour savoir dire « No ! » quand il le faut mais plus sérieusement pour tout ce que tu nous as apporté (NOUS on t'aime plus que le SP8). Merci au Dr. Sandrine « La Chica de los monos » Camus pour ton amour de Beyoncé (Who run the world ?), des muffins mais aussi pour avoir été une voisine plus calme et raisonnable que le suivant ! Merci à Fanny pour avoir incarné la féminité dans notre bureau et d'avoir réussi à tous nous sécher quand les blagues sont allées trop loin. Merci à Olatz pour sa gentillesse, son calme et les discussions toujours enrichissantes. Bon courage à Paul-ô, le nouveau venu pour cette thèse qui débute.

Merci au trio infernal Virginie, Lucie et Juliette pour les manip douloureuses. Virginie, merci tout d'abord de m'avoir aidé mais surtout pour ton amour des pandas, des goûters (il n'y a pas d'âge pour un bon goûter) et ton féminisme sans alcool ! Lucie, j'ai

découvert avec toi des aspects de la science que je ne connaissais pas ... je regrette quasiment nos manips du vendredi après-midi ! Félicitations et bon courage pour ce qui arrive.

Merci à Elsa Pioli pour ta gentillesse, ta disponibilité, pour les petites discussions, ton amour du latte pendant les présentations de poster et tous tes conseils précieux !

Merci à Nathalie Dutheil, Dr. AAV, pour avoir fait que les AAVs n'ont plus de secret pour moi (enfin ... presque) mais aussi pour ton amour de la montagne ! Merci à Marie-Laure Thiolat, pour ton aide, ta bonne humeur, tes cachettes secrètes, ta peur du découpage des membranes de WB ! Merci à Alain pour ta gentillesse, toujours demander comment ça va et réellement attendre une réponse, pour allumer le chauffage en hiver et pour avoir toujours des petits chocolats cachés quelque part. Merci à Audrey pour m'avoir montré ma première PCR à l'époque où tu étais seule dans la pièce de biomol, pour les petites discussions et pour ta gentillesse. Je tiens ensuite à remercier tous les membres passés ou présents de l'équipe PSP et l'IMN qui ont pu avoir un rôle proche ou lointain dans ce travail. Merci à Evelyne, Marie-Hélène, Leslie-Ann, Mr Vital, Betty, Michel, François, Chantal, PDD pour votre disponibilité, votre gentillesse et pour avoir participé à créer ce bon environnement de travail.

Merci à Christian Combe pour m'avoir présenté Erwan il y a déjà longtemps et avoir su que ça marcherait ! Merci à tous mes amis pour le soutien pendant ces trois années que vous soyez doctorants : Céline (membre éternel de la win team), Laurie, Étienne ou non doctorants (et ça vaut probablement mieux pour vous !) Nono, Maude, Pierre, Ségo, Benoit, Tom, Bubu, Benny.

Merci à mes parents, mes grands-parents, mon frère et ma sœur pour le soutien, les encouragements et pour votre intérêt pour ce que je pouvais bien faire « au labo » au cours de ces trois dernières années (que dis-je ? ça fait 6 ans que je vous en parle !), voici donc le fruit de mon travail.

Enfin, merci à Marion pour ta présence à chaque instant, pour ton rôle crucial dans la réussite de travail, pour la patience infinie dont tu fais toujours preuve envers moi, pour les encouragements constants, pour la relecture de dernière minute (redoutais-je de te le faire lire ?), pour tes commentaires toujours très justes qui m'ont permis de me surpasser quand je tombais dans la facilité, pour avoir su m'épauler dans cette écriture (j'espère arriver à en faire autant quand ce sera ton tour !), pour finalement avoir l'avis qui compte réellement et tout simplement merci pour tout.

RESUME

Mon projet de thèse a porté sur les mécanismes neurodégénératifs dans le contexte de la maladie de Parkinson (MP). Cette maladie est caractérisée notamment par la présence d'inclusions intracytoplasmiques appelées corps de Lewy, dont le composant protéique principal est l' α -synucléine. L'absence de traitements curatifs à ce jour renforce la nécessité de comprendre les processus neurodégénératifs. L'objectif de mon travail de thèse fut de proposer une approche multifactorielle, translationnelle, basée sur trois axes complémentaires: modélisation, thérapeutique et mécanistique. Premièrement, nous nous sommes intéressés à la modélisation de la MP par l'utilisation de vecteurs viraux. Cette première partie nous a permis de conclure que le vieillissement ne constitue pas un facteur de risque pour les trois espèces étudiées. Ensuite, nous avons étudié deux stratégies pour combattre la dysfonction lysosomale existant chez les patients, premièrement par une approche biotechnologique avec des nanoparticules permettant de restaurer le pH des lysosomes dysfonctionnels, et une stratégie de thérapie génique par surexpression d'un régulateur de la biogénèse lysosomale. Grâce à ce travail, nous avons démontré l'intérêt du lysosome comme cible thérapeutique. Enfin, nous nous sommes focalisés sur l'hypothèse « prion » pour les synucléinopathies. Dans ce projet, nous avons mis en oeuvre une approche de modélisation chez le primate non-humain ainsi qu'une approche thérapeutique anti-agrégative chez le rongeur. Ces travaux mettent en évidence le rôle clé de l' α -synucléine dans l'étiologie de la MP et proposent des pistes d'améliorations des modèles animaux actuels ainsi que des approches thérapeutiques innovantes.

Mots-clés : α -synucléine, Maladie de Parkinson, virus adéno-associés, modèles animaux, rongeur, primate non-humain, agrégation, nanoparticules, autophagie, lysosomes.

ABSTRACT

The aim of this work was to focus on neurodegenerative mechanisms in the context of synucleinopathies, especially on Parkinson's disease (PD). PD is characterized by the loss of dopaminergic neurons and the presence of intracytoplasmic proteinaceous inclusions named Lewy Bodies of which α -synuclein (α -syn) is the main protein component. To date, there are no curative treatments. Elucidating mechanisms underlying neurodegeneration in PD will allow the identification of new molecular targets for therapeutic intervention. My Ph.D. work intends multifactorial and translational approaches based on modelling, therapeutic intervention and mechanistic studies. We first focused on the development of new animal models of PD based on the use of viral vector-mediated overexpression of α -syn. This work allowed us to conclude on the absence of additive effect of ageing in α -syn-related toxicity, at least in the three investigated species. Then, we worked on two therapeutic strategies to overcome the lysosomal dysfunction occurring in PD. To do so, we first developed a biotechnological approach based on the use of acidic nanoparticles restoring acidic pH of sick lysosomes, and then we used a gene therapy approach based on the overexpression on a central modulator lysosomal biogenesis. We here demonstrated the interest of restoration of lysosomal physiology. Finally, we tested the "prion-like" hypothesis in a cohort of non-human primates and assessed the efficacy of a therapeutic approach using an oligomer modulator in mice. This work highlights the central role of α -syn in PD aetiology and offers innovative strategies for both modelling and therapeutic intervention.

Keywords: α -synuclein, Parkinson's disease, adeno-associated viruses, animal models, rodent, non-human primate, protein aggregation, nanoparticles, autophagy, lysosomes.

LISTE DES PUBLICATIONS, POSTERS ET COMMUNICATION ORALE

Articles Publiés

Bourdenx M et al. (2015a) Lack of additive role of ageing in nigrostriatal neurodegeneration triggered by alpha-synuclein overexpression. **Acta neuropathologica communications** 2015 Jul 25;3(1):46.

Bourdenx M, Dehay B, Gorry P, Przedborski S, Vila M, Hunot S, Singleton A, Olanow CW, Merchant KM, Bezdard E, Petsko GA, Meissner WG. (2015b). Targeting α -synuclein for treatment of Parkinson's disease: mechanistic and therapeutic considerations. **Lancet Neurol.** Aug;14(8):855-66.

Bourdenx M, Koulakiotis NS, Sanoudou D, Bezdard E, Dehay B, Tsarbopoulos A (2015c) Protein aggregation and neurodegeneration in prototypical neurodegenerative diseases: Examples of amyloidopathies, tauopathies and synucleinopathies. **Progress in neurobiology.** 2015 Jul 21. pii: S0301-0082(15)00077-5.

Barroso-Chinea P, Thiolat ML, Bido S, Martinez A, Doudnikoff E, Baufreton J, **Bourdenx M**, Bloch B, Bezdard E, Martin-Negrier ML (2015d) D1 dopamine receptor stimulation impairs striatal proteasome activity in Parkinsonism through 26S proteasome disassembly. **Neurobiology of disease.**

Bastide, M.F., Meissner, W.G., Picconi, B., Fasano, S., Fernagut, P.O., Feyder, M., Francardo, V., Alcacer, C., Ding, Y., Brambilla, R., Fisone, G., Jon Stoessl, A., **Bourdenx, M.**, Engeln, M., Navailles, S., De Deurwaerdere, P., Ko, W.K., Simola, N., Morelli, M., Groc, L., Rodriguez, M.C., Gurevich, E.V., Quik, M., Morari, M., Mellone, M., Gardoni, F., Tronci, E., Guehl, D., Tison, F., Crossman, A.R., Kang, U.J., Steece-Collier, K., Fox, S., Carta, M., Angela Cenci, M., Bezdard, E., (2015e). Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. **Progress in neurobiology** 132, 96-168.

Engeln M, Bastide MF, Toulme E, Dehay B, **Bourdenx M**, Doudnikoff E, Li Q, Gross CE, Boue-Grabot E, Pisani A, Bezdard E, Fernagut PO (2014a) Selective Inactivation of Striatal FosB/DeltaFosB-Expressing Neurons Alleviates L-Dopa-Induced Dyskinesia. **Biological psychiatry.**

Bourdenx M, Bezdard E, Dehay B (2014b) Lysosomes and alpha-synuclein form a dangerous duet leading to neuronal cell death. **Frontiers in neuroanatomy** 8:83.

Bourdenx M, Dehay B, Bezdard E (2014c) Down-regulating alpha-synuclein for treating synucleinopathies. **Movement disorders** : official journal of the Movement Disorder Society 29:1463-1465.

Bourdenx M, Dutheil N, Bezdard E, Dehay B (2014d) Systemic gene delivery to the central nervous system using Adeno-associated virus. **Frontiers in molecular neuroscience** 7:50.

Bourdenx M, Nilsson A, Wadensten H, Falth M, Li Q, Crossman AR, Andren PE, Bezdard E (2014e) Abnormal structure-specific peptide transmission and processing in a primate model of Parkinson's disease and l-DOPA-induced dyskinesia. **Neurobiology of disease** 62:307-312.

Bourdenx M (2013a) Alpha-synuclein inoculation initiates a neurodegenerative cascade in nontransgenic mice. **Movement disorders** : official journal of the Movement Disorder Society 28:126.

Bourdenx M (2013b) Phosphorylation of alpha-synuclein at Ser129 accelerates neurodegeneration. **Movement disorders** : official journal of the Movement Disorder Society 28:441.

Bourdenx M (2013c) DNA as the next digital information storage support. **Movement disorders** : official journal of the Movement Disorder Society 28:583.

Bourdenx M (2013d) Allograft of stem cell-derived dopaminergic neurons for Parkinson's disease. **Movement disorders** : official journal of the Movement Disorder Society 28:736.

Article sous presse

Bourdenx M, Daniel J, Genin E, Blanchard-Desce M, Bezard E, Dehay B (2015) Nanoparticles restore lysosomal acidification defects: Implication for Parkinson's and other lysosomal-related diseases. **Autophagy (In press)**

Article en préparation

Bourdenx M, Chansel-Debordeaux L, Dovero S, Grouthier V, Dutheil N, Espagna A, Groc L, Jimenez C, Bezard E and Dehay B. In utero delivery of rAAV mediates widespread brain transduction in rats: towards new models of Parkinson's disease.

Bourdenx M, Dovero S, Thiolat M-L, Bezard E and Dehay B. *Octodon degus* : a model to study spontaneous age-dependant synucleinopathy ?

Posters

Octodon degus: a model for the study of age-associated synucleinopathy. S. Dovero, **M. Bourdenx**, E. Bezard and B. Dehay. *45th Annual Meeting Society for Neuroscience, October 2015, (Chicago, USA).*

In utero delivery of scAAV9 mediates widespread brain transduction in rats and monkeys : towards new models of Parkinson's disease. **M. Bourdenx**, L. Chansel-debordeaux, S. Dovero, V. Grouthier, N. Dutheil, S. Brun, A. Espagna, L. Groc, Q. Li, C. Jimenez, E. Bezard and B. Dehay. *45th Annual Meeting Society for Neuroscience, October 2015, (Chicago, USA).*

Lewy Body extracts from Parkinson's Disease Brains as models for high-throughput screens of neurotoxicity and α -synuclein spreading from cell-to-cell through endocytosis. F. Cavaliere, L. Cerf, B. Dehay, I. Nafia, P. Kitchener, F. Simon, **M. Bourdenx**, P. Ramos-Gonzalez, J. Obeso, C. Matute, F. Ichas, E. Bezard. *45th Annual Meeting Society for Neuroscience, October 2015, (Chicago, USA).*

Nanoparticles as a therapeutic tool to restore lysosomal acidification impairments: implications for Parkinson's disease. **M. Bourdenx**, J. Daniel, E. Genin, M.-L. Thiolat, M. Blanchard-Desce, E. Bézard and B. Dehay. *Japan Neuroscience Society. July 2015, (Kobe, Japon)*

Nanoparticles as a therapeutic tool to restore lysosomal acidification impairments: implications for Parkinson's disease. **M. Bourdenx**, J. Daniel, E. Genin, M.-L. Thiolat, M. Blanchard-Desce, E. Bézard and B. Dehay. *44st Annual Meeting Society for Neuroscience, 15-19 November 2014, (Washington, USA).*

Enhancement of lysosomal biogenesis reverse A53T mutant α -synuclein induced toxicity. **M. Bourdenx**, S. Dovéro, M. Bastide, G. Porras, Q. Li, A. Ballabio, E. Bezaud, M. Vila and B. Dehay. *44st Annual Meeting Society for Neuroscience, 15-19 November 2014, (Washington).*

Selective inactivation of FosB expressing neurons in the Lateral Habenula decreases L-Dopa induced dyskinesia. M. Bastide, B. de la Crompe, **M. Bourdenx**, P.-O. Fernagut, C. Gross, T. Boraud and E. Bezaud. *44st Annual Meeting Society for Neuroscience, 15-19 November 2014, (Washington).*

Progressive nigrostriatal neurodegeneration associated with alpha-synuclein spreading and pathology induced by AAV-mediated overexpression of mutant alpha-synuclein in mice, rats and marmosets. S. Dovero, **M. Bourdenx**, M. Bastide, S. Bido, M. Engeln, C. Piron, F. Georges, D. Scheller, A. Michel, T. Boraud, P.O. Fernagut, E. Bezaud and B. Dehay. *44st Annual Meeting Society for Neuroscience, 15-19 November 2014, (Washington).*

TFEB-induced lysosomal biogenesis reverses A53T mutant α -synuclein induced toxicity. **M. Bourdenx**, A. Ballabio, E. Bezaud, M. Vila, B. Dehay. *9th FENS satellite symposium: Multiple Mechanisms of Neurodegeneration and Progression, Baveno, Italy (July 2014)*

Ce poster a reçu le prix du meilleur poster étudiant.

Restoration of Autophagy Impairments in Parkinson's disease models by Acidic Nanoparticles. **M. Bourdenx**, M.-L. Thiolet, J. Daniel, E. Genin, M. Blanchard-Desce, E. Bézard and B. Dehay. *Gordon Research Conference: Autophagy Stress, Development & Disease", Lucca (Barga), Italy (March 2014).*

TFEB-induced lysosomal biogenesis reverses A53T mutant α -synuclein induced toxicity. **M. Bourdenx**, A. Ballabio, E. Bezaud, M. Vila, B. Dehay. *Gordon Research Conference: Autophagy Stress, Development & Disease", Lucca (Barga), Italy.*

Development of new scAAV9 and scAAV10 variant to transduce specific disease-related brain area in newborn rats. N.Dutheil, **M. Bourdenx**, S.Dovero, M.H.Canron, D.Dalkara, E.Bezaud and B.Dehay. *Society for Neuroscience annual meeting November 2013, (San Diego, USA).*

TFEB-induced lysosomal biogenesis reverses A53T mutant α -synuclein induced toxicity. **M. Bourdenx**, A. Ballabio, E. Bezaud, M. Vila, B. Dehay. *Society for Neuroscience annual meeting November 2013, (San Diego, USA).*

Abnormal Structure-specific Peptide Transmission and Processing in a Primate Model of Parkinson's disease and L-DOPA-induced Dyskinesia. **Bourdenx M**, Nilsson A, Wadenstein H, Fälth M, Li Q, Crossman AR, Andrén P and Bezaud E. *Society for Neuroscience annual meeting November 2013, (San Diego, USA).*

Communication Orale

Invited Speaker in “Gordon Research Seminar: Autophagy Stress, Development & Disease”, Lucca (Barga), **Italy (15th March 2014)**: “Harnessing Lysosomal Function to cure Parkinson's disease”

LISTE DES ABREVIATIONS

α -syn : α -synucléine

AAV : virus adéno-associé

AMS : atrophie multisystématisée

aNP : acidic nanoparticles

ARNm : ARN messenger

CAG : CMV early enhancer Chicken β -actin promoter

GFP : green fluorescence protein

ICV : intracérébroventriculaire

LAMP2a : Lysosome-associated membrane protein 2a

MPP⁺ : ion méréridium

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

SNpc : *Substantia Nigra pars compacta*

SOD1 : superoxyde dismutase 1

Syn-1 : Synapsin-1 promoter

TDP43 : TAR DNA-binding protein 43

AVANT-PROPOS

La maladie de Parkinson touche aujourd'hui environ 150000 personnes en France avec 14000 nouveaux cas par an. La prévalence augmentant avec l'âge, cette maladie pose des problèmes considérables en terme de santé publique avec un impact socio-économique important. Cette pathologie est caractérisée par des dysfonctionnements moteurs associés avec des symptômes secondaires, cognitifs notamment, moins connus. Les traitements actuels prennent en charge une partie des symptômes mais n'enrayent pas le processus neurodégénératif. Face à ce constat, mon travail de thèse a consisté à proposer de nouvelles approches de modélisation et de thérapeutiques.

Ma rencontre avec le Dr. Bezard, le Dr. Dehay ainsi que l'intégralité de l'équipe « Physiologie des syndromes parkinsoniens » remonte à ma seconde année de licence de biologie. Cette rencontre, déterminante pour mon choix de carrière future, m'a permis d'aborder tôt le monde de la recherche académique et de participer à quelques projets scientifiques. Ces quelques projets se focalisaient sur un autre aspect de la recherche sur la maladie de Parkinson à savoir les dyskinésies induites par la levodopa et ont fait l'objet de publications regroupées dans la partie « Publications annexes ». Ma confrontation avec la réalité de la recherche fondamentale et préclinique m'a convaincu de l'intérêt d'une recherche translationnelle alliant une approche mécanistique avec une approche de modélisation et thérapeutique. Fort de cette expérience, j'ai souhaité poursuivre cette approche au cours de ma thèse. Aidé par ma connaissance initiale de l'équipe, de son fonctionnement et des techniques employées, j'ai ainsi pu travailler sur plusieurs projets au cours de ma thèse.

Pour mon manuscrit de thèse, ayant eu l'opportunité d'écrire plusieurs articles didactiques, j'ai fait le choix d'écrire un chapitre introductif relativement court pour éviter une redondance avec ces articles regroupés dans un chapitre spécifique. De ce fait, j'ai préféré détailler des aspects peu décrits dans ces articles, notamment l'importance du réseau protéostasique et les mécanismes de l'agrégation protéique. S'en suit une partie regroupant les résultats expérimentaux regroupés en trois axes et une discussion générale.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	1
RESUME.....	4
ABSTRACT.....	5
LISTE DES PUBLICATIONS, POSTERS ET COMMUNICATION ORALE.....	6
LISTE DES ABREVIATIONS.....	10
AVANT-PROPOS.....	11
INTRODUCTION	14
1. Homéostasie protéique et vieillissement.....	14
1.1 Réseau protéostasique au cours du vieillissement.....	17
1.2 Mécanisme et intérêt du repliement protéique.....	18
1.3 Agrégation des protéines sous forme d'amyloïde.....	21
1.4 De l'agrégat à la maladie.....	23
2. L'alpha-synucléine.....	24
2.1 Structure et fonction.....	24
2.2 Agrégation et Toxicité.....	26
3. Les synucléinopathies.....	30
3.1 La maladie de Parkinson.....	30
3.1.1 Description clinique.....	31
3.1.2 Anatomo-pathologie.....	32
3.1.3 Formes héréditaires.....	35
3.1.4 Traitements.....	37
3.1.5 Modélisation expérimentale de la maladie de Parkinson.....	38
3.2 Démence à corps de Lewy.....	40
3.3 Atrophie multisystématisée.....	42
4. Hypothèse prion pour les synucléinopathies.....	43
4.1 Caractère prion de l'alpha-synucléine.....	43
4.2 Inoculation, transconformation et propagation de l'alpha-synucléine chez l'animal.....	45
OBJECTIFS DE LA THESE.....	49
RESULTATS	51
PARTIE 1 : Modélisation Expérimentale de la Maladie de Parkinson par Utilisation de Vecteurs Viraux.....	52
Projet 1. Absence de rôle additif du vieillissement dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques dans un modèle de surexpression virale de l'alpha-synucléine humaine mutée.....	53

Projet 2. Transduction cérébrale par des vecteurs viraux adéno-associés administrés par voie intracardiaque : nouveaux modèles animaux et thérapie génique.	81
Projet 3 : Développement de nouveaux modèles pour la maladie de Parkinson : injection intracérébroventriculaire de vecteurs viraux in utero.	88
PARTIE 2. Dysfonction Lysosomale dans la Maladie de Parkinson : stratégies thérapeutiques	96
Projet 4 : Restauration de l'acidité de lysosomes déficients par utilisation de nanoparticules acidifiantes : implication pour la maladie de Parkinson et autres maladies associées à une altération de l'acidification.	97
Projet 5 : Augmentation de la biogénèse lysosomale comme stratégie thérapeutique pour la maladie de Parkinson.	138
1. Contexte de l'étude	138
2. But de l'étude et approches expérimentales utilisées	139
3. Résultats préliminaires.....	140
PARTIE 3. Hypothèse « prion » pour les Synucléinopathies : Modélisation et Approche Thérapeutique.	148
Projet 6 : Modélisation de l'hypothèse prion pour les synucléinopathies chez le primate non-humain : étude à large échelle chez le babouin.	149
1. Contexte de l'étude	149
2. But de l'étude et approches expérimentales utilisées	149
3. Résultats préliminaires.....	151
Projet 7. Hypothèse « prion » pour les Synucleinopathies : Stratégie Thérapeutique Anti-Agrégation.	158
DISCUSSION	161
Modélisation expérimentale de la maladie de Parkinson.....	161
Intérêt des modèles spontanés de maladie neurodégénérative.....	166
Restauration de l'acidité des lysosomes en situation pathologique	167
Stratégies thérapeutiques pour les synucléinopathies.....	170
Peut-on réverser les effets délétères induits par l'alpha-synucléine ?	174
Problématique de la phosphorylation de l'alpha-synucléine	176
Hypothèse « prion » pour les synucléinopathies.....	177
CONCLUSION	182
ARTICLES DIDACTIQUES	184
PUBLICATIONS ANNEXES	244
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	273

INTRODUCTION

1. HOMEOSTASIE PROTEIQUE ET VIEILLISSEMENT

La cellule est composée de millions de protéines différentes (de l'ordre de 2 à 4.10^6 protéines/ μm^2 pour une demi-vie médiane de 35,52h dans des cellules humaines) dans des compartiments distincts fonctionnellement et spatialement (Cambridge *et al.*, 2011; Milo, 2013). La transformation de l'information génétique en protéines fonctionnelles est un processus central en biologie cellulaire. Nous savons aujourd'hui que la seule chaîne polypeptidique nouvellement synthétisée n'est pas suffisante pour obtenir une protéine fonctionnelle. Celle-ci doit en effet acquérir une structure tridimensionnelle pour devenir active. Lorsqu'une protéine est non fonctionnelle, altérée ou non nécessaire, elle est dégradée et ses composants réutilisés pour la synthèse d'autres protéines.

La synthèse, le repliement et la dégradation, constituent ainsi les éléments de base de l'homéostasie protéique ou protéostasie. Ce réseau fonctionnel ne se limite pas au seul contrôle qualité des protéines mais englobe aussi les fonctions de transcription, traduction, modification post-traductionnelle, repliement, transport, assemblage, adressage, dégradation (Douglas and Dillin, 2010). Cet ensemble de fonctions a été réuni sous le nom de réseau protéostasique. Ce réseau, extrêmement régulé, est intégré à différents niveaux comme illustré par la (**Figure 1**). Les organelles, qui sont en permanente communication, possèdent chacune des éléments pour la régulation de leurs sub-protéomes. De façon similaire, l'altération de l'homéostasie protéique dans une cellule entraîne une réponse des cellules avoisinantes. Enfin, il a été récemment mis en évidence que des changements de l'homéostasie protéique dans un organe pouvaient entraîner des modifications dans un organe distant, indépendamment d'une communication neuronale (van Oosten-Hawle *et al.*, 2013).

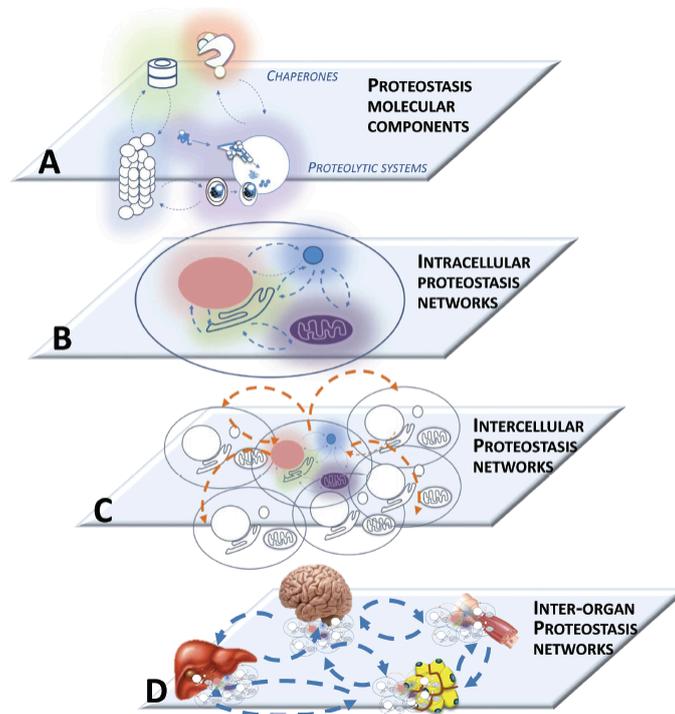


Figure 1. Représentation schématique des différents niveaux d'intégration du réseau protéostasique. **(A)** Balance entre les systèmes de repliement (chaperonnes) et systèmes de dégradation (protéasome et système autophagy-lysosome). **(B)** Des systèmes dédiés existent dans la majorité des organelles pour assurer l'homéostasie de leur sub-protéome. **(C)** Bien que peu connus à l'heure actuelle, les réseaux protéostasiques d'une cellule peuvent avoir un impact sur ceux d'une autre cellule. **(D)** Les communications paracrine et endocrine assurent une coordination des réseaux protéostasiques entre différents organes. D'après (Morimoto and Cuervo, 2014)

Concernant le réseau de contrôle qualité des protéines, on distingue deux fonctions essentielles : les système de repliement protéique (protéines chaperonnes) et les systèmes protéolytiques (ubiquitine-protéasome et autophagie-lysosome). Initialement, le terme de protéines chaperonnes fut proposé pour décrire la fonction d'assistance de ces protéines (Ellis *et al.*, 1989). Les membres les plus connus de cette famille protéique sont les protéines Hsp pour « heat shock protein ». Bien qu'initialement décrites chez la *Drosophila* après une exposition à une température supérieure à la température optimale pour la croissance (Ritossa, 1964), ces protéines existent en condition basale et sont impliquées notamment dans le repliement, la translocation ou l'assemblage des autres protéines (Hartl and Hayer-Hartl, 2002). Pour ce qui est des systèmes protéolytiques, on distingue deux voies. La première est celle du système ubiquitine-protéasome qui est très largement impliqué dans la dégradation des protéines de conformation simple et de faible demi-vie (Martinez-Vicente and Vila, 2013). Ce complexe protéique nécessite un marquage des protéines destinées à la dégradation

par une chaîne de molécule d'ubiquitine. Les protéines ainsi ubiquitinylées sont alors reconnues par des sous-unités spécifiques du protéasome 26S, puis désubiquitinylées, dépliées et finalement hydrolysées (Reinstein and Ciechanover, 2006). La seconde voie est celle de l'autophagie et du lysosome notamment impliquée dans la dégradation des complexes protéiques. Les lysosomes sont des organites acides, découverts il y a tout juste 60 ans par Christian De Duve – découverte qui lui a valu le prix Nobel de médecine en 1974 -, contenant des enzymes de dégradation et capables de détruire des composants cellulaires (De Duve *et al.*, 1955; Luzio *et al.*, 2007). Parmi les trois voies qui mènent au lysosome (phagocytose, endocytose et autophagie), l'autophagie (du grec « soi-même » et « manger ») est un mécanisme conservé au cours de l'évolution permettant la dégradation et le recyclage des composants cellulaires (Wong and Cuervo, 2010). On distingue trois voies distinctes dans l'autophagie nommées microphagie, macrophagie et autophagie médiée par les chaperonnes (**Figure 2**). Cette dernière voie implique la reconnaissance sélective d'un motif protéique (KFERQ) puis la liaison avec la protéine Hsc70 et enfin l'import par la protéine membranaire lysosomale LAMP2a. La microphagie implique une invagination de la membrane du lysosome pour séquestrer une portion du cytoplasme tandis que la macroautophagie implique la formation de vésicules, originaires de la membrane du réticulum endoplasmique et appelées autophagosomes, pour séquestrer une large portion du cytoplasme puis sa dégradation par fusion avec le lysosome (Bourdenx *et al.*, 2014a; Dehay *et al.*, 2013; Wong and Cuervo, 2010). La biogénèse lysosomale et le flux autophagique sont modulés par plusieurs cascades de signalisation intracellulaire telle que la cible chez les mammifères de la rapamycine (mTOR) ou le facteur de transcription EB (TFEB) (Cuervo, 2011; Settembre *et al.*, 2011). Récemment, il a été montré que dans un contexte d'inhibition du protéasome, l'autophagie permet la dégradation des sous-unités catalytiques 26S inactives par un mécanisme appelé protéophagie chez la plante *Arabidopsis thaliana* (Marshall *et al.*, 2015; Marshall and Vierstra, 2015). L'existence d'un tel mécanisme chez l'humain ajouterait une complexité supplémentaire dans la régulation du réseau protéostatique et donnerait un angle de vue supplémentaire dans la recherche sur les maladies associées avec une altération du système autophagie-lysosome.

Le dysfonctionnement de l'une des branches de ce réseau extrêmement complexe (impliquant plus de 1000 protéines) peut induire une rupture du réseau conduisant à un état pathologique décrit dans de nombreuses maladies qu'elles soient métaboliques, cardiovasculaires, oncologiques ou neurodégénératives.

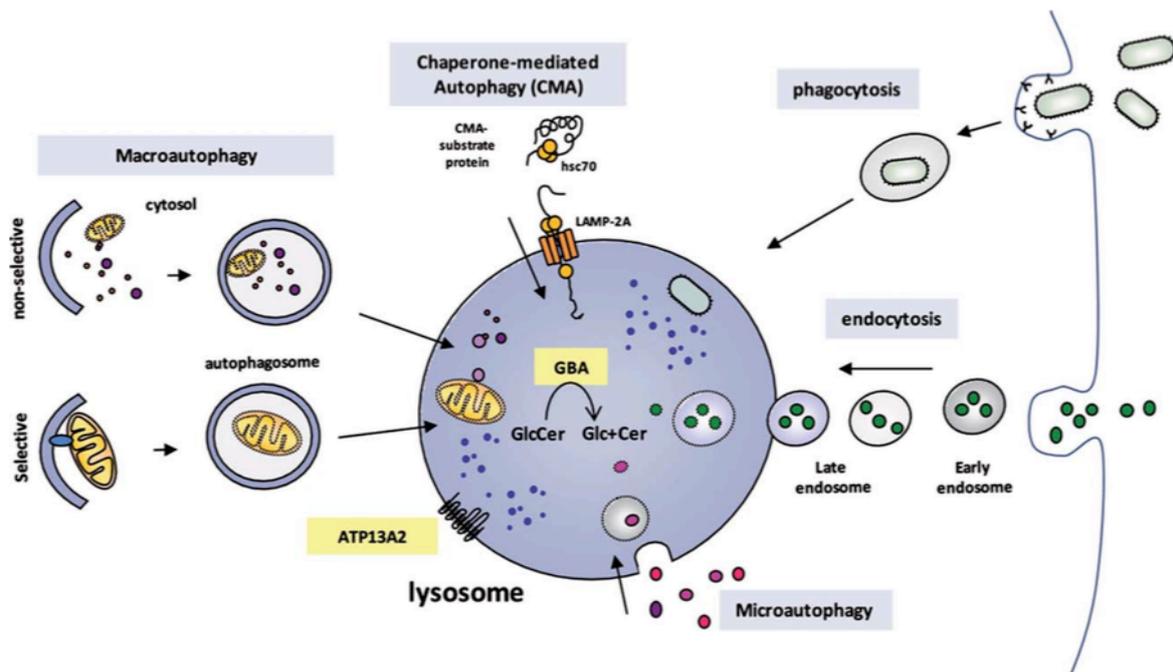


Figure 2. Schéma descriptif des différentes voies dirigées vers le lysosome. Les voies de phagocytose, endocytoses et les trois voies composant l'autophagie convergent vers le lysosome pour permettre la dégradation de composants cellulaires, extracellulaires ou des pathogènes. On distingue une macroautophagie sélective ou non sélective. La macroautophagie sélective permet, après marquage par la protéine adaptatrice p62, la formation de l'autophagosome et la dégradation notamment des mitochondries déficientes. La glucocérébrosidase est une enzyme intralysosomale qui permet la conversion du glycosylcéramide en glucose et céramide. ATP13A2 est protéine transmembranaire ATPase présente à la membrane du lysosome et associée avec l'homéostasie cationique. D'après (Dehay *et al.*, 2013).

1.1 RESEAU PROTEOSTASIQUE AU COURS DU VIEILLISSEMENT

Au cours du vieillissement, les capacités du réseau protéostasique déclinent (Morimoto and Cuervo, 2014). Ce déclin explique en partie pourquoi on considère aujourd'hui que le vieillissement est le facteur de risque non génétique majoritaire pour les maladies neurodégénératives (Mattson and Magnus, 2006). Chez le vers nématode *Caenorhabditis elegans*, le dysfonctionnement du réseau protéostasique apparaît comme un événement précoce au cours du vieillissement, les cellules sénescents démontrant une incapacité à maintenir les protéines dans un état de repliement correct (Ben-Zvi *et al.*, 2009). De manière similaire, il a été montré une diminution significative de la quantité de la protéine LAMP2a chez les animaux âgés (Cuervo and Dice, 2000). En parallèle de la diminution de cette protéine essentielle de la voie de l'autophagie médiée par les chaperonnes, une augmentation de la protéine chaperonne moléculaire heat-shock cognate protein (*hsc73*) a été identifiée et interprétée comme un mécanisme compensatoire (Cuervo and Dice, 2000)

Sur un plan général du réseau protéostasique, on considère que le tableau est globalement altéré avec une diminution de l'ensemble des activités et notamment celles de repliement ou de dégradation (**Figure 3**). Du fait de cette altération globale des systèmes de synthèse, repliement et contrôle qualité des protéines, les cellules doivent faire face à une accumulation de protéines avec un repliement anormal sans avoir les moyens de les prendre en charge (Douglas and Dillin, 2010). L'ensemble des maladies neurodégénératives est associé avec une altération des fonctions du système protéostasique mis en évidence par la présence d'agrégats intra- ou extracellulaires de protéines anormalement repliées. Ces dépôts possèdent la caractéristique commune d'être des agrégats amyloïdes.

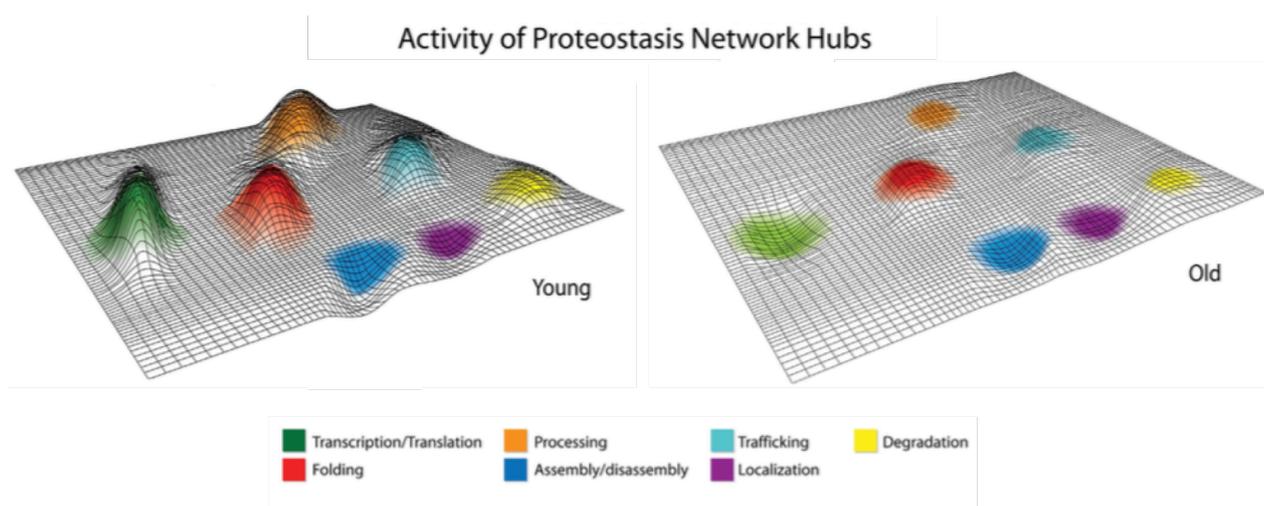


Figure 3. Le paysage d'activité du réseau protéostasique se détériore au cours du temps. Les activités de transcription, traduction, repliement, assemblage, transport, distribution et dégradation sont globalement altérées au cours du vieillissement favorisant la sensibilité des cellules à un stress protéotoxique. Adaptée de (Douglas and Dillin, 2010)

1.2 MECANISME ET INTERET DU REPLIEMENT PROTEIQUE

Il y a maintenant un peu plus de 50 ans, Max Perutz et John Kendrew reçurent le prix Nobel de chimie pour leurs travaux sur la structure des protéines globulaires et notamment la myoglobine. Leurs travaux séminaux sont à l'origine du champ de recherche qu'est aujourd'hui la biologie structurale. Il est intéressant de reprendre les mots de John Kendrew concernant la structure de la myoglobine lors de sa publication en 1958 (Kendrew *et al.*, 1958):

« Perhaps the most remarkable features of the molecule are its complexity and its lack of symmetry. The arrangement seems to be almost totally lacking in the kind of regularities

which one instinctively anticipates, and it is more complicated than has been predicated by any theory of protein structure ».

Ce constat a inévitablement entraîné la question : comment les protéines se replient-elles? Malgré un effort de recherche important pendant un demi siècle, le mécanisme reste à ce jour inconnu (Dill and MacCallum, 2012). Le principe d'Anfinsen stipule que, d'un point de vue thermodynamique, la majorité de l'information nécessaire au bon repliement d'une protéine est contenue dans sa séquence d'acides aminés (Anfinsen *et al.*, 1954). Sur un plan cinétique, ce principe arrive à un paradoxe car une protéine de 101 acides aminés peut adopter 3^{100} différents repliements (Zwanzig *et al.*, 1992). Ce paradoxe, dit de Levinthal, prévoit que même si la protéine « essaie » 10^{13} conformations par seconde, il faudrait 10^{27} ans pour les tester toutes (Zwanzig *et al.*, 1992). Parmi ce nombre astronomique de possibilités, les protéines adoptent une conformation précise en un temps record, de l'ordre de la milliseconde pour la majorité. Cette opposition forte entre une infinité de possibilités et un repliement rapide illustre ce paradoxe.

De nombreux modèles ont été proposés pour expliquer la vitesse de repliement. L'étude de la cinétique de repliement a montré que pour une protéine donnée il n'existe que peu de conformation repliée, native et thermodynamiquement stable, d'énergie faible alors qu'il existe un grand nombre de formes non repliées de haute énergie. L'ensemble des modèles proposés convergent vers le modèle en entonnoir de repliement (**Figure 4**) (Dill and Chan, 1997; Onuchic *et al.*, 1995). Ce modèle stipule que pour une protéine donnée les parois peuvent être plus au moins complexes en présentant des aspérités (correspondant à des intermédiaires de repliement d'énergie intermédiaire) ou une pente faible associée à une

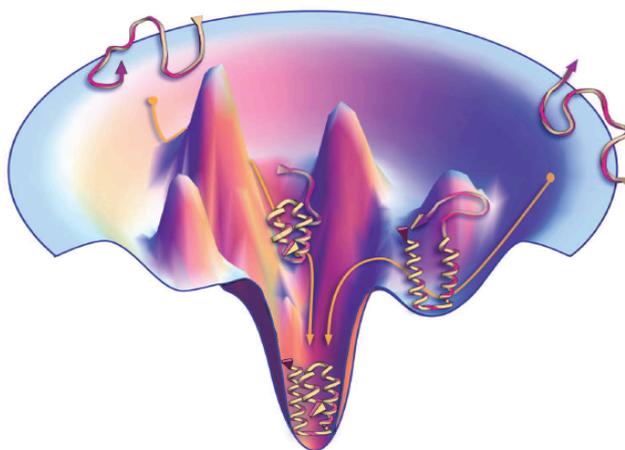


Figure 4. Représentation d'un entonnoir de repliement complexe avec différentes conformations intermédiaires d'énergie intermédiaire entre l'état non replié (énergie haute en haut du cône) et l'état natif (énergie faible au fond du cône). D'après (Dill and MacCallum, 2012).

repliement lent. Nous sommes aujourd'hui capables de prédire les structures des protéines de faible poids moléculaire (Dill and MacCallum, 2012). La communauté CASP (*Critical Assessment of protein Structural Prediction*), qui rassemble 150 groupes de recherche, essaie aujourd'hui d'affiner les modèles de prédiction. Des progrès considérables ont été faits pour les protéines de moins de 100 acides aminés même si elles ne représentent qu'environ 10% des protéines.

L'étude de la conformation des protéines a permis de classer certaines maladies sous le nom de protéinopathies ou maladies « conformationnelles » dans lesquelles une protéine (ou plusieurs) adopte une conformation anormale formant ensuite des agrégats insolubles. À ce jour, 30 maladies sont classées sous le nom de protéinopathies. On y trouve un grand nombre des maladies neurodégénératives avec les encéphalopathies spongiformes transmissibles (protéine prion), la maladie d'Alzheimer (peptide β -amyloïde et protéine tau), la maladie d'Huntington (protéine huntingtin), la maladie de Charcot-Marie-Tooth (protéine superoxyde dismutase 1 (SOD1) et TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43)) et la maladie de Parkinson (protéine α -synucléine). Il apparaît que le nombre de pathologies associées à ce groupe augmente régulièrement. Récemment, des auteurs ont proposé d'inclure le diabète de type II dans ce groupe du fait de la présence d'agrégats de la protéine amyline ou IAPP (*islet amyloid polypeptide*) au niveau des cellules β du pancréas (Mukherjee *et al.*, 2015). De façon intéressante, le diabète de type II est aujourd'hui considéré comme un facteur de risque pour la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson et la voie de l'insuline est aujourd'hui considérée comme une cible intéressante pour les maladies neurodégénératives (Bassil *et al.*, 2014). Il serait donc intéressant d'étudier les connexions entre l'agrégation de l'IAPP hépatique et le peptide β -amyloïde ou la protéine Tau au niveau central (selon l'idée de l'interconnexion des réseaux protéostatiques illustrée dans la **Figure 1**).

1.3 AGREGATION DES PROTEINES SOUS FORME D'AMYLOÏDE

Certaines protéines sont capables de former des agrégats appelés « amyloïdes ». Ces espèces sont caractérisées par la conversion d'une conformation native vers un enrichissement en feuillets β . Cet état, stable sur un plan thermodynamique, est caractérisé par un assemblage de monomères avec une structure particulière observée par diffraction aux rayons X en feuillets β croisés ou β -cross. L'état amyloïde est un état peu énergétique, favorisé sur un plan thermodynamique (**Figure 5**).

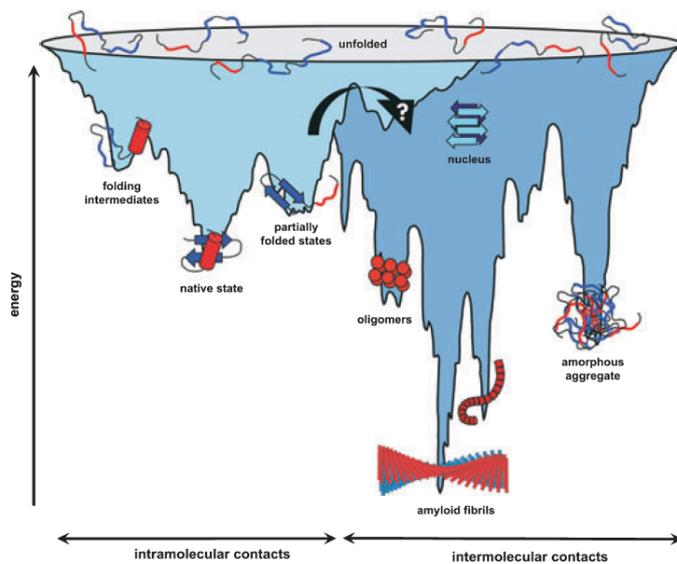


Figure 5. Représentation schématique du paysage énergétique pour le repliement et la formation de fibres amyloïdes. La surface montre des protéines non repliées dirigées vers l'état natif par des contacts intramoléculaires ou vers la formation de fibres amyloïdes par des contacts intermoléculaires. D'après (Jahn and Radford, 2005)

Le terme « amyloïde », introduit par Rudolph Virchow en 1854, provient de l'observation que certains tissus cérébraux prennent, de manière identique à l'amidon, une coloration bleue en présence d'iode puis violette avec l'ajout d'acide sulfurique (Sipe and Cohen, 2000). Les progrès techniques ont permis de mieux caractériser ces protéines. Les dépôts amyloïdes possèdent tous une insolubilité aux détergents. Ils présentent une morphologie fibrillaire allongée (quelques nanomètres de diamètre en moyenne), non ramifiée, et sont colorés par le rouge Congo avec un marquage biréfringent vert pomme en lumière polarisée (Eisenberg *et al.*, 2006). Alors qu'une trentaine de protéines amyloïdes ont été associées avec des maladies humaines, certaines protéines forment des agrégats amyloïdes dans un contexte physiologique. Il a été notamment décrit que les hormones ou peptides pituitaires peuvent être stockés sous forme de fibres amyloïdes dans les granules de sécrétion (Maji *et al.*, 2009).

Parmi les différents modèles expliquant la formation des fibres amyloïdes, le plus populaire est celui de « nucléation-polymérisation » (Jarrett and Lansbury, 1993). L'étape initiale, appelée phase de nucléation, est une étape lente et limitante, qui permet la formation des noyaux amyloïdes. Une fois le noyau formé, la croissance se fait par ajout de monomères ou d'oligomères sur les deux extrémités de la fibre amyloïde naissante (Jucker and Walker, 2013). Dans ce modèle, la formation de dépôts amyloïdes passe par un mécanisme autoalimenté dans lequel toutes les étapes servent de base et modèle à l'étape suivante en formant des « graines amyloïdes » (**Figure 6A**). Les fibres amyloïdes peuvent aussi se fragmenter pour à nouveau entrer dans une phase de croissance (Jucker and Walker, 2013). La cinétique de formation de la fibre amyloïde dépend donc de la quantité de graines amyloïdes et de la fréquence de fragmentation. L'étape initiale de nucléation peut être accélérée par l'ajout de graines amyloïdes exogènes déjà formées (**Figure 6B**).

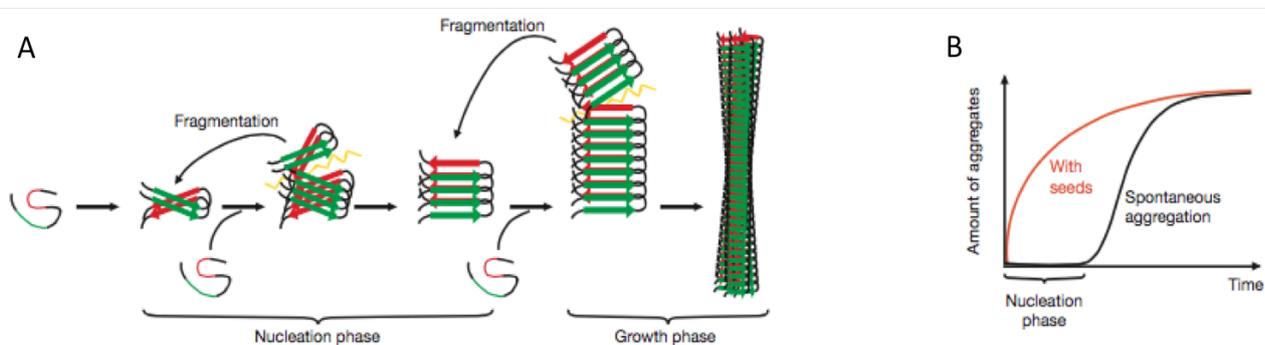


Figure 6. (A) Formation de fibres amyloïdes. (B) Cinétique d'agrégation en condition basale (courbe noire) ou avec l'ajout de graines amyloïdes exogènes (courbe rouge). D'après (Jucker and Walker, 2013)

1.4 DE L'AGREGAT A LA MALADIE

Grâce au réseau protéostatique, la cellule maintient un équilibre délicat et dynamique entre le repliement d'une protéine vers son état natif et la dégradation des protéines mal repliées. L'équilibre entre les activités de repliement effectuées par les protéines chaperonnes et la dégradation par le système ubiquitine-protéasome ou la voie autophagie-lysosome est normalement suffisant pour maintenir un environnement cellulaire sain. De très nombreuses maladies, notamment neurodégénératives, sont associées avec une accumulation de protéines mal repliées sous forme d'agrégats insolubles (**Figure 7**) (Bourdenx *et al.*, 2015b; Jellinger, 2009).

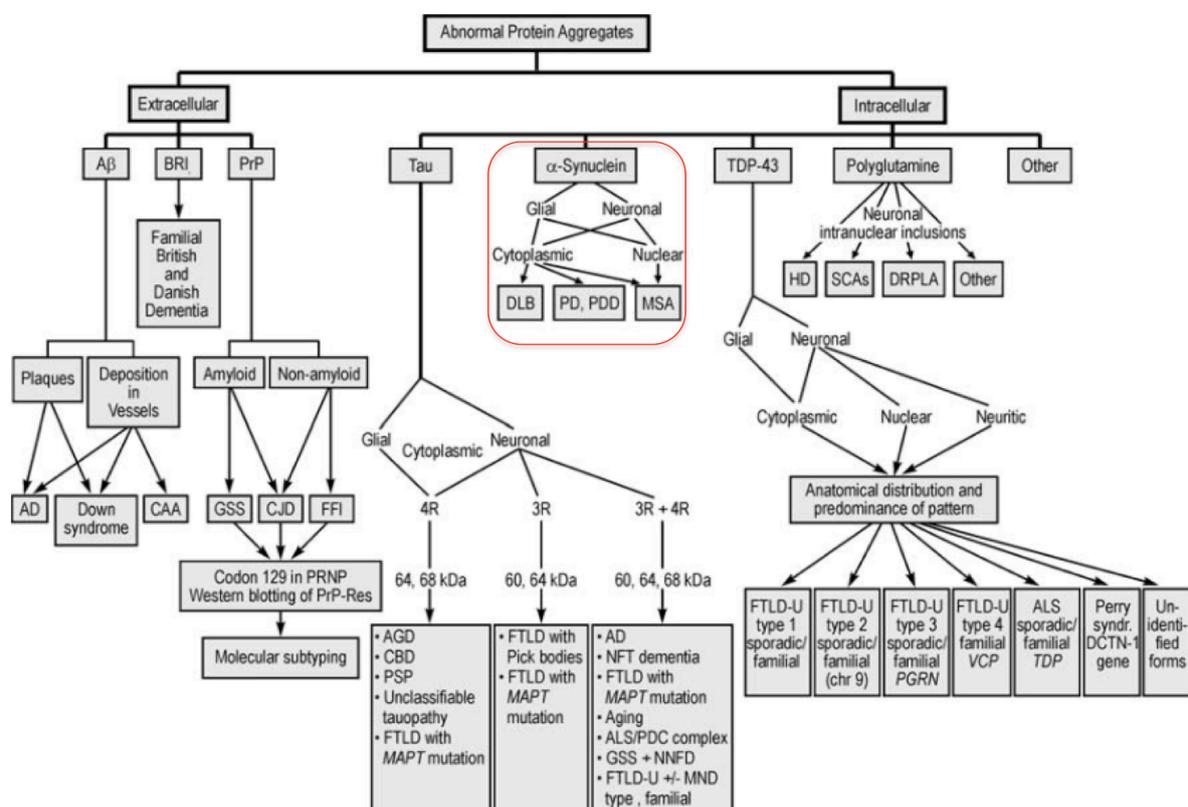


Figure 7. Classification des protéinopathies en fonction du type d'agrégats. Les synucléinopathies sont entourées en rouge. D'après (Jellinger, 2009)

Le *primum movens* de la formation de ces inclusions est à ce jour inconnu. On peut envisager au moins deux hypothèses. Selon la première, l'altération des capacités de repliement ou de dégradation de la cellule entraînerait la formation d'agrégats insolubles par accumulation de protéines mal repliées. Un des facteurs initiateurs de cette altération du système protéostatique pourrait être l'âge. Selon la seconde, un facteur inconnu induirait la conversion d'une protéine dans un état pathologique anormalement replié, cet état se propagerait ensuite et dépasserait les capacités du système protéostatique. Dans un article

récemment publié, nous mettons en parallèle trois protéinopathies prototypiques : les amyloïdopathies, tauopathies et synucléinopathies (Bourdenx *et al.*, 2015b). (Voir page 184) La comparaison de ces trois groupes de protéinopathies permet de mettre en exergue la grande similarité dans le processus pathogénique.

2. L'ALPHA-SYNUCLEINE

Au sein des protéinopathies, on distingue une sous-classe appelée synucléinopathie associée avec l'accumulation intracytoplasmique de la protéine α -synucléine (α -syn). Cette petite protéine synaptique a été placée au centre de ce groupe de maladie incluant la maladie de Parkinson, la démence à corps de Lewy et l'atrophie multisystématisée par deux découvertes fondamentales : (i) des mutations génétiques ou des duplications/triplications du locus *SNCA* contenant le gène de l' α -syn induisent une forme héréditaire, autosomique dominante, de la maladie de Parkinson ; (ii) l' α -syn a été identifiée comme étant le composant protéique majoritaire des corps de Lewy et des inclusions gliales cytoplasmiques qui sont respectivement la caractéristique anatomopathologique de la maladie de Parkinson, de la démence à corps de Lewy et de l'atrophie multisystématisée (Bourdenx *et al.*, 2015b; Dehay *et al.*, 2015a).

2.1 STRUCTURE ET FONCTION

Bien que sa fonction exacte reste à ce jour inconnue, l' α -syn a été impliquée dans la régulation de l'activité synaptique par le contrôle de la libération des vésicules synaptiques (Bendor *et al.*, 2013) et l'apprentissage du chant chez le Diamant mandarin (George *et al.*, 1995). Cette protéine de 14 kDa possède trois domaines distincts : un domaine comprenant la terminaison aminée (acides aminés 1 à 60), un domaine central appelé non-amyloïde (acides aminés 61 à 95) et un domaine comprenant la terminaison carboxyle (acides aminés 96 à 140) (Rochet *et al.*, 2012) (**Figure 8 ci-après**). De manière surprenante, l'ensemble des mutations identifiées chez les patients est localisé dans le premier domaine. Ce domaine est caractérisé par six répétitions d'un motif riche en lysine, très conservé, identique à ceux contenus dans les lipoprotéines (Rochet *et al.*, 2012). Le domaine central non-amyloïde, riche en acides aminés hydrophobes, s'avère essentiel pour les propriétés d'agrégation de l' α -syn (Giasson *et al.*, 2001).

1 MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGVAEAAAGKTKEGVLVYVGSKTKEGVVHGVA TV 55
 56 AEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQE 110
 111 GILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPEA 140

Figure 8. Séquence polypeptidique de l'α-syn, domaines et principaux sites de modifications post-traductionnelles. (Séquence UniProtKB/Swiss-Prot : P37840). Les sites des mutations identifiées chez l'humain sont surlignés en rouge (voir partie 3.1.3). Le domaine comprenant la terminaison aminée contient six répétitions imparfaites, surlignées en gris, du motif (KTKEGV) impliqué dans la liaison aux lipides. Le domaine central avec le composant non-peptide β-amyloïde est souligné. Les deux sites principaux de phosphorylation (Ser87 et Ser129) sont surlignés en vert. Les sites de nitration sont surlignés en bleu (Tyr39, Tyr125, Tyr133 et Tyr136). Enfin, le domaine de reconnaissance pour l'autophagie médiée par les chaperones est surligné (séquence KFERQ dégénérée en VKKDQ) en vert. D'après (Dehay *et al.*, 2015a).

La structure secondaire de la protéine reste extrêmement contestée. En effet, certaines études ont montré que l'α-syn existait sous la forme d'un tétramère stable avec un repliement sous forme d'hélice α alors que d'autres études suggèrent que l'α-syn est majoritairement présente sous la forme d'une protéine non repliée (Bartels *et al.*, 2011; Gould *et al.*, 2014; Weinreb *et al.*, 1996). Ces différentes conformations dépendraient d'un équilibre dynamique. L'α-syn serait non repliée en solution aqueuse mais adopterait un repliement secondaire contenant des hélices α lors de l'interaction avec des membranes lipidiques. Les mutations de l'α-syn induiraient des modifications dans cet équilibre en favorisant une forme particulière parmi les formes monomériques, oligomériques ou fibrillaires (Conway *et al.*, 1998; Conway *et al.*, 2000).

Plusieurs modifications post-traductionnelles de l'α-syn ont été décrites puis identifiées dans les corps de Lewy. La plus étudiée est de loin la phosphorylation de la sérine 129. Plus de dix ans après son identification (Fujiwara *et al.*, 2002), il est difficile de conclure quant à sa conséquence fonctionnelle et éventuellement toxique du fait d'une variabilité importante dans les méthodes et résultats présentés dans la littérature. D'autres modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation de la sérine 87, la troncation de la terminaison carboxyle, la nitration des tyrosines 39, 125 ou 133 ont aussi été décrites dans des tissus provenant de patients parkinsoniens (Giasson *et al.*, 2000; Kellie *et al.*, 2014). Des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les conséquences fonctionnelles ou sur le processus agrégatifs de ces modifications post-traductionnelles.

L'α-syn est dégradée à la fois par le système ubiquitine-protéasome et le système autophagie-lysosome (Bourdenx *et al.*, 2014a; Webb *et al.*, 2003). Dans le domaine contenant

la terminaison carboxyle, la protéine possède une séquence de reconnaissance par la voie de l'autophagie médiée par les chaperonnes, VKKDQ, ce qui permet sa reconnaissance par la chaperonne cytosolique Hsc70 (*heat shock cognate 70 protein*) et sa translocation vers le lumen du lysosome par la protéine membranaire LAMP2a. Des données *in vitro* montrent que l' α -syn avec les mutations A30P, A53T ou altérée par la dopamine forment un « bouchon » au niveau de la partie cytosolique du transporteur LAMP2a entraînant une accumulation des protéines normalement dégradées par cette voie protéolytique (Cuervo *et al.*, 2004; Martinez-Vicente *et al.*, 2008). Des données *in vivo* suggèrent que les formes monomériques d' α -syn sont dégradées par le système ubiquitine-protéasome alors que les formes complexes, voire agrégées, sont prises en charge par l'autophagie via la voie de la macroautophagie (Bourdenx *et al.*, 2014a). Cette voie de dégradation permet la dégradation d'une portion du cytoplasme après séquestration dans l'autophagosome. Cette dernière voie de dégradation pourrait aussi être altérée par les agrégats d' α -syn (Tanik *et al.*, 2013). L'étude de tissus *post-mortem* provenant de patients atteints de la maladie de Parkinson a permis de confirmer ces résultats expérimentaux. En effet, ces études ont rapporté une déplétion de certains composants du protéasome associée à une altération de la fonction des lysosomes mise en évidence par une diminution du nombre de lysosomes et une perte des activités catalytiques de cette organelle (Chu *et al.*, 2009; Dehay *et al.*, 2010). Nous avons proposé que l'interaction entre la dysfonction lysosomale et l'agrégation de l' α -syn formerait un cercle vicieux aggravant la dysfonction des systèmes de dégradation et favorisant l'agrégation (Bourdenx *et al.*, 2014a).

2.2 AGREGATION ET TOXICITE

Les inclusions d' α -syn sont la caractéristique des synucléinopathies. Les différentes pathologies de ce groupe présentent des caractéristiques différentes vis-à-vis de la forme ou de la localisation des accumulations. La première description date de 1912 quand Friedrich Heinrich Lewy identifia pour la première fois ces inclusions au niveau du noyau dorsal du nerf vague et de la *substantia innominata* sur du tissu *post-mortem* provenant de patients atteints de la maladie de Parkinson (Goedert *et al.*, 2013; Parent and Parent, 2010). Quelques années plus tard, en 1919, Constantin Trétiakoff identifia ces inclusions cette fois-ci au niveau de la substance noire et choisit de les nommer après Lewy.

Les corps et neurites de Lewy sont les caractéristiques anatomopathologiques de la maladie de Parkinson et de la démence à corps de Lewy. Les corps de Lewy sont des inclusions sphéroïdes, de 5 à 25 μm de diamètre, majoritairement retrouvés au niveau des

perikarya (**Figure 9A,B ci-après**). Ces inclusions peuvent être visualisées par coloration avec l'hématoxyline-éosine et présentent un centre éosinophile dense et une couronne pâle. Les neurites de Lewy sont des inclusions filiformes retrouvées dans les neurites (**Figure 9C ci-après**). Dans le cas de l'atrophie multisystématisée, les tissus *post-mortem* présentent des inclusions d' α -syn dans les oligodendrocytes, appelées inclusions gliales cytoplasmiques (**Figure 9D ci-après**).

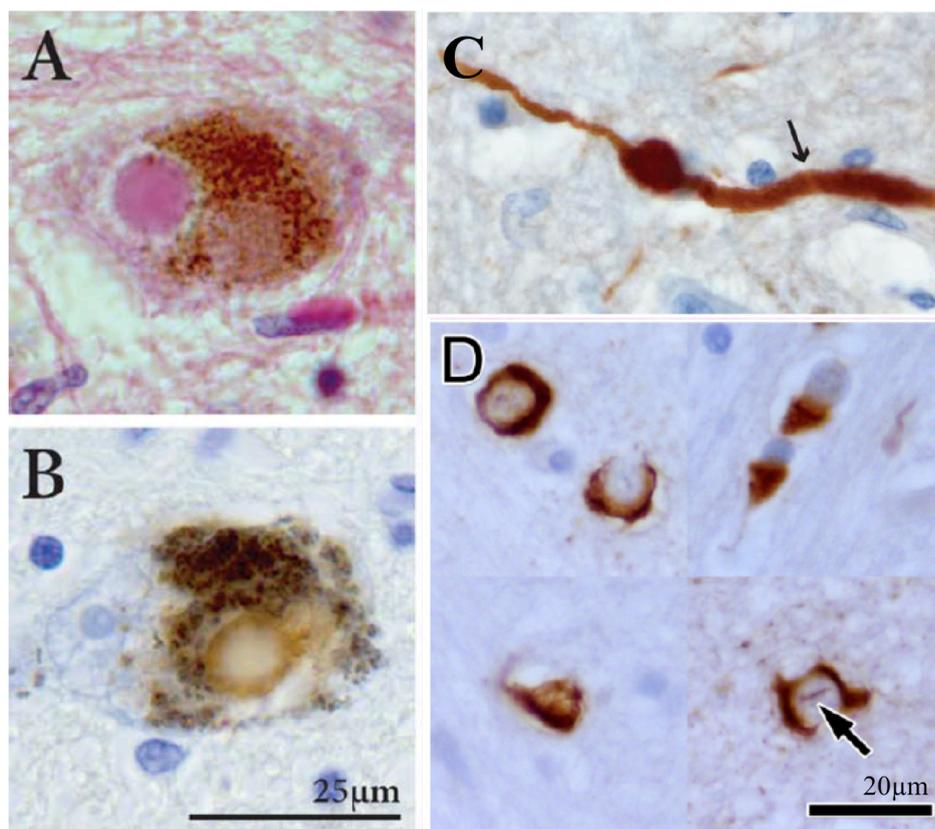


Figure 9. Inclusions immunoréactives pour l' α -syn chez les patients parkinsoniens et atteints de l'atrophie multisystématisée. (A,B) Corps de Lewy classique un cœur éosinophile et un halo en (A) coloration hématoxyline-éosine ou (B) avec un immunomarquage contre l' α -syn. (C) Neurite de Lewy identifié en immunomarquage contre l' α -syn. (D) Inclusions gliales cytoplasmiques, de différentes tailles et morphologies, retrouvées dans les oligodendrocytes du putamen de patients atteints de l'atrophie multisystématisée. Certains oligodendrocytes présentes aussi des inclusions nucléaires (flèche en D). D'après (McCann *et al.*, 2015) (images A,B,C) et (Ahmed *et al.*, 2012) (image D).

Dans les corps de Lewy, l' α -syn est présente sous la forme de fibres avec un enrichissement en feuillets β mis en évidence notamment par un marquage avec la Thioflavine-S. L'appartenance de l' α -syn au groupe des protéines amyloïdes pose un problème sémantique puisque par définition les agrégats amyloïdes sont extracellulaires (Sipe *et al.*, 2014). Le consortium « Nomenclature committee of the International Society of Amyloidosis » recommande l'utilisation du terme *amyloid-like* pour décrire les fibres formées par l' α -syn ou la protéine tau (Sipe *et al.*, 2014). Ce terme étant peu précis, nous utiliserons le

terme amyloïde pour la suite de ce manuscrit. L'identification de familles présentant une duplication ou une triplification du bras long du chromosome 4, incluant le gène de l' α -syn, a permis d'établir une corrélation entre la quantité de la protéine et la sévérité de la forme clinique (Chartier-Harlin *et al.*, 2004; Olgiati *et al.*, 2015; Singleton *et al.*, 2003). En effet, les familles présentant une triplification du locus ont une forme cliniquement plus sévère que les familles n'ayant qu'une duplication.

La recherche actuelle se focalise sur l'identification de la ou des espèce(s) toxique(s) de l' α -syn. La formation des fibres amyloïdes suit un mécanisme de nucléation-polymérisation qui implique la formation de formes pré-fibrillaires appelées oligomères. Deux hypothèses sont envisagées quant à l'identité de l'espèce toxique : selon la première, les espèces toxiques seraient les agrégats amyloïdes matures tels que les corps de Lewy, et, selon la seconde, les espèces toxiques seraient des formes de poids moléculaires inférieurs tels que des oligomères. Au vu des études récentes, la seconde hypothèse semblerait la plus probable avec notamment la description d'une toxicité accrue pour des formes mutées incapables de former des fibrilles (Cremades *et al.*, 2012; Winner *et al.*, 2011). Une hypothèse intensément débattue suggère que les corps de Lewy seraient des formes d'agrégats stables sur un plan thermodynamique et probablement cytoprotectrices permettant de « piéger » les espèces oligomériques toxiques (Dehay *et al.*, 2015a; Tanaka *et al.*, 2004). D'une part, des données récentes suggèrent une dégénérescence préférentielle des neurones contenant des inclusions d' α -syn (Osterberg *et al.*, 2015). D'autre part, des données récentes sur la protéine tau montrent que des neurones du cortex visuel, contenant des inclusions neurofibrillaires, ne présentent pas d'altérations fonctionnelles (Kuchibhotla *et al.*, 2014). Ce résultat suggère que la présence des agrégats de protéine tau *per se* ne met pas en péril la fonction de cette population de neurones et renforce l'hypothèse de l'existence d'agrégats « cytoprotecteurs ». Une critique pouvant être adressée à cette étude est qu'elle se focalise sur des neurones du cortex visuel qui ne figurent pas parmi les populations neuronales fortement affectées dans les tauopathies suggérant ainsi une éventuelle vulnérabilité différentielle de certaines populations neuronales. En conclusion, bien que la toxicité de l' α -syn puisse être difficilement remise en cause aujourd'hui, des études complémentaires sont nécessaires pour définir si la formation des inclusions est une forme de réaction cellulaire pour se protéger de la présence de l' α -syn ou au contraire si la formation des inclusions est une propriété toxique intrinsèque de l' α -syn.

Les oligomères d' α -syn, qui sont considérés actuellement comme les formes les plus toxiques, possèdent une propension accrue aux liaisons lipidiques ce qui peut avoir un effet délétère sur la perméabilité membranaire de diverses organelles telles que les mitochondries ou les lysosomes (Danzer *et al.*, 2007; Volles and Lansbury, 2002). Ces propriétés sont

communes à la majorité des protéines à tendance agrégative retrouvées dans les maladies neurodégénératives.

La toxicité médiée par l' α -syn est clairement multifactorielle (**Figure 10 ci-dessous**) (Bourdenx *et al.*, 2014a; Bourdenx *et al.*, 2015b; Dehay *et al.*, 2015a). Comme nous l'avons décrit précédemment, l' α -syn induit des dysfonctions des systèmes de contrôle qualité des protéines. De plus, elle inhibe le transport des protéines du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi, ce qui a pour conséquence d'activer les mécanismes de détection du stress du réticulum endoplasmique. Du fait de son interaction avec les membranes lipidiques, elle altère la physiologie et la morphologie des mitochondries, perméabilise la membrane plasmique, perturbe la transmission synaptique et l'homéostasie calcique. À ce jour, malgré que de nombreuses études aient montré une implication délétère de l' α -syn dans de mécanismes cellulaires variés, il est impossible de décrire un mécanisme complet ou d'en ordonner les différents événements.

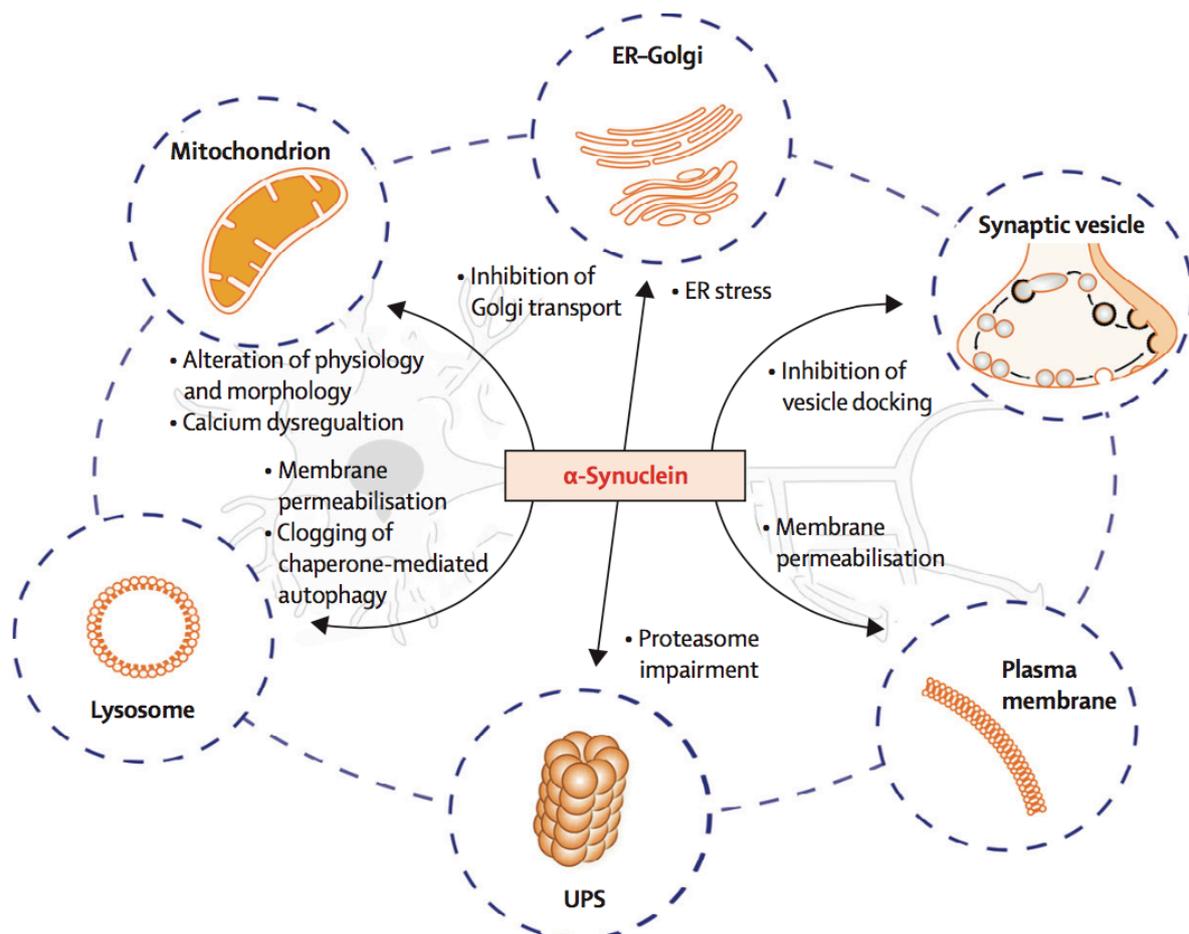


Figure 10. Schéma explicatif des interactions connues entre l' α -syn et les différents composants cellulaires. Sur ce schéma, six fonctions cellulaires sont représentées. L' α -syn étant une protéine synaptique, elle est présente en grande concentration dans ce compartiment cellulaire et module la communication synaptique en participant au recyclage des vésicules de neurotransmetteurs. L' α -syn est dégradée à la fois par le système ubiquitine-protéasome (UPS) et dans le lysosome. L' α -syn présente une affinité importante pour les lipides et interagit particulièrement avec les membranes

qu'elles soient plasmiques ou mitochondriales. Les espèces toxiques de l' α -syn altèrent notamment les échanges entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, les fonctions de l'UPS et du lysosome, altèrent le fonctionnement mitochondrial et provoquent la perméabilisation de la membrane plasmique. D'après (Dehay *et al.*, 2015a).

3. LES SYNUCLEINOPATHIES

Les synucléinopathies sont un ensemble de maladies neurodégénératives caractérisées par la présence d'inclusions protéiques contenant de l' α -syn. Malgré cette apparente unicité, ce groupe de maladie englobe des maladies associées avec la dégénérescence de différentes régions cérébrales et populations neuronales. Aux trois principales synucléinopathies que sont la maladie de Parkinson, la démence à corps de Lewy et l'atrophie multisystématisée, s'ajoutent également les atteintes autonomiques pures, la neurodégénérescence avec accumulation de fer de type I (ou maladie de Hallervorden–Spatz), et des maladies à corps de Lewy telles que les variantes à corps de Lewy de la maladie d'Alzheimer (Uversky, 2007).

3.1 LA MALADIE DE PARKINSON

Dans son ouvrage « *An essay on the shaking palsy* » publié en 1817, James Parkinson décrivit les symptômes d'une maladie qu'il nomma « *paralysis agitans* » (Parkinson, 1817). À la fin du XIX^{ème} siècle, Jean-Martin Charcot et ses collègues de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière contribuèrent significativement à la connaissance sur cette pathologie. Jean-Martin Charcot confirma la tétrade classique des symptômes de la maladie de Parkinson : tremblement, bradykinésie, rigidité articulaire et instabilité posturale. Bien que le tremblement soit un symptôme cardinal, Jean-Martin Charcot insista sur le fait qu'il n'est pas présent chez tous les patients. Il choisit alors de renommer la « *paralysis agitans* », terme impropre selon lui, en maladie de Parkinson (Parent and Parent, 2010).

Deux siècles après la description initiale, la maladie de Parkinson est la seconde pathologie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer et affecte 1 à 3% de la population de plus de 50 ans pour environ 5 millions de patients dans le monde (Dehay *et al.*, 2015a). En Europe, elle atteint autant les hommes que les femmes et représente la seconde cause de handicap moteur chez le sujet âgé après les accidents vasculaires cérébraux. Les coups directs et indirects associés à cette maladie ont été estimés à 138 000€ par an par patient avec une croissance annuelle de 5% (Gammon, 2014). Cette prévalence

tend à s'accroître avec le vieillissement démographique et confère donc à cette affection un poids socio-économique considérable.

3.1.1 Description clinique

La description classique consiste en une tétrade de symptômes moteurs. Tout d'abord l'**akinésie** et la **bradykinésie** correspondent respectivement à la raréfaction des mouvements et à la lenteur de leur exécution (Samii *et al.*, 2004). Ces symptômes sont observés dès le début de la maladie. Il s'agit d'un ralentissement notamment de l'initiation du mouvement avec une hésitation au démarrage caractérisée par un délai entre la volonté d'initier un mouvement et son exécution. La bradykinésie est un symptôme particulièrement handicapant dans la vie de tous les jours car il met en péril l'autonomie des patients en les mettant en difficulté face à des tâches telles que l'habillement ou la prise de nourriture. Lors de ces déplacements, le patient parkinsonien présente une lenteur de la marche.

La **rigidité articulaire** est assimilée à une hypertonie musculaire généralisée entraînant une résistance augmentée des mouvements faisant intervenir des articulations. Cette rigidité concerne la quasi-totalité des muscles avec une prédominance du versant fléchisseur sur le versant extenseur (Delwaide *et al.*, 1986).

L'**instabilité posturale** est une manifestation plus tardive dans l'histoire de la maladie. Elle se réfère au développement d'un déséquilibre, menant à de nombreuses chutes. Léopold Ordenstein en fait la description suivante : « Après quelques pas faits lentement, le malade accélère sa marche, et se met au pas de course comme si c'était son intention de courir. Questionné sur cette singularité, il répond qu'il ne peut se retenir et qu'il tomberait, s'il n'adoptait ce mode de progression ; et quelques fois en effet, comme nous l'avons dit, il tombe la face contre terre » (Ordenstein, 1868). Charcot décrira que le patient paraît « courir après son centre de gravité ». Les chutes se faisant de plus en plus fréquentes avec l'évolution de la maladie, ce symptôme est considéré comme le plus handicapant pour les patients (Bloem, 1992).

Enfin, le **tremblement de repos** est certainement le symptôme le plus caractéristique associé avec la maladie, même si il est absent chez 20 à 30% des patients. C'est un tremblement lent et régulier, d'une fréquence de 4 à 6 hertz, qui apparaît généralement de façon unilatérale et prédomine au niveau des extrémités supérieures (Stanley-Jones, 1956).

Ces manifestations cliniques peuvent être influencées par les émotions, l'état de stress, les stimuli auditifs et visuels. Chaque patient présente une combinaison différente des symptômes décrits précédemment. Face à cette diversité clinique, il a été établi que le diagnostic de maladie de Parkinson repose sur l'observation clinique d'un syndrome parkinsonien qui se définit par : une bradykinésie associée avec au moins un des trois autres symptômes que sont la rigidité articulaire, l'instabilité posturale ou le tremblement de repos (Quinn, 1997).

Souvent méconnus et associés à cette maladie longtemps considérée comme purement motrice, des symptômes non-moteurs ont été décrits. Souvent observés dans les phases précoces de la maladie, on retrouve des symptômes cognitifs avec notamment un syndrome frontal (rigidité mentale et inflexibilité) mais aussi des manifestations anxieuses et dépressives, des altérations du sommeil (sommolence diurne excessive et diminution du sommeil lent profond), une anosmie, des évanouissements attribuables à une hypotension orthostatique, des douleurs neuropathiques et des désordres autonomes (constipation et dysphagie dans environ 50% des cas) (Jankovic, 2008).

3.1.2 Anatomopathologie

Le diagnostic de la maladie de Parkinson est avant tout clinique mais, comme c'est le cas pour la majorité des maladies neurodégénératives, la confirmation du diagnostic est obtenue après le décès du patient par observation des lésions cérébrales caractéristiques associées avec la pathologie. Les deux éléments recherchés sont la dépigmentation de la substance noire et la présence des corps de Lewy.

L'implication des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* (SNpc), dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson revient encore une fois à l'équipe de Jean-Martin Charcot (Parent and Parent, 2010). L'hypothèse initiale provient de l'observation d'un patient présentant une rigidité articulaire et un tremblement de repos seulement dans l'hémicorps gauche. Georges Marinesco et Paul O. Blocq identifièrent une lésion de la taille d'une noisette dans le mésencéphale droit (Blocq and Marinesco, 1893). L'hypothèse est ensuite formulée par Edouard Brissaud (Brissaud, 1895) et confirmée en 1919 par Constantin Trétiakoff (Trétiakoff, 1919) puis par Rolf Hassler en 1938 (Hassler, 1938). Cette perte des neurones dopaminergiques est mise en évidence au niveau macroscopique par la dépigmentation de la substance noire, les neurones dopaminergiques accumulant un pigment brunâtre appelé neuromélanine (Graham, 1978). Cette perte des

niveau de la partie dorsale du pons. (c) Stades 3 et 4 : les lésions atteignent le noyau pédonculopontin, le noyau basal de Meynert et la SNpc (stade 3) puis l'hypothalamus, le thalamus et le cortex temporal antéromédial (stade 4). L'apparition des premiers symptômes cliniques se fait au moment du stade 3 ou au début de stade 4. (d) Stades 5 et 6 : les lésions atteignent les régions néocorticales au stade 5 puis les aires associatives et primaires au stade 6. D'après (Goedert *et al.*, 2013)

L'observation de neurites de Lewy, à des stades non symptomatiques, dans des régions distantes de la SNpc a soulevé la question de l'origine, centrale ou non, de la synucléinopathie. L'observation ultérieure, par le même laboratoire, de l'existence d'agrégats d' α -syn au niveau des plexi de Meissner et d'Auerbach a permis de formuler l'hypothèse double « attaque » pour la maladie de Parkinson (Braak *et al.*, 2006; Hawkes *et al.*, 2009). Cette hypothèse propose que l'inhalation d'un agent infectieux entrainerait la formation d'agrégats d' α -syn au niveau nasal et que l'absorption du mucus nasal dans la salive et la déglutition entrainerait ensuite la formation d'agrégats au niveau entérique. S'en suivrait une progression antérograde de la pathologie depuis l'épithélium olfactif vers le lobe temporal et une progression rétrograde depuis l'épithélium entérique, passant par le nerf vague, vers le noyau dorsal du nerf vague (Hawkes *et al.*, 2009). L'existence de l'agent infectieux en question reste toutefois à démontrer.

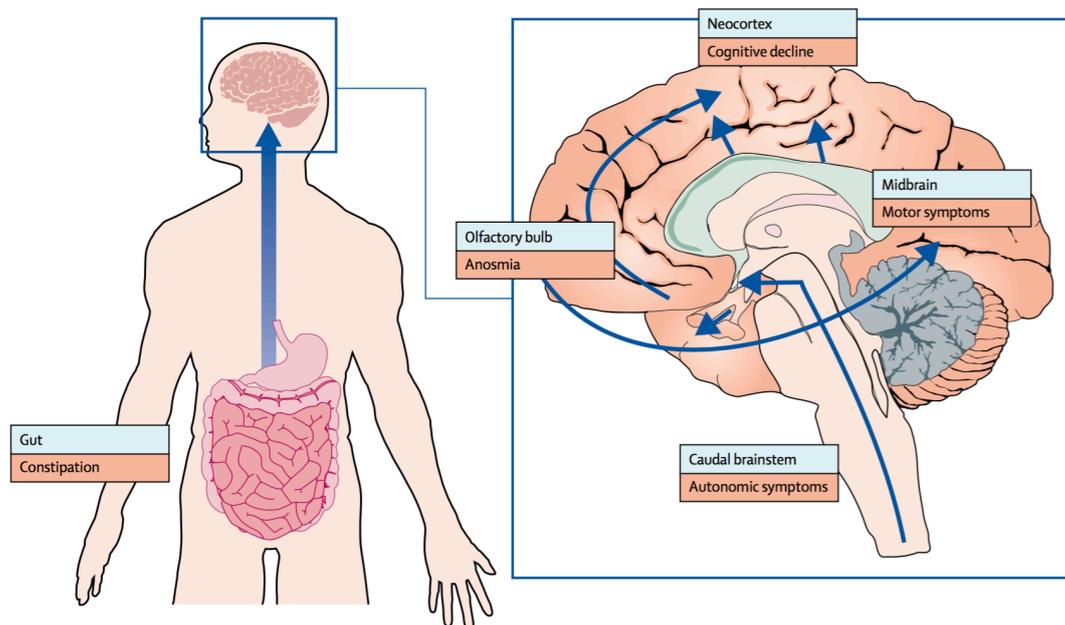


Figure 12. Hypothèse de double-« attaque » pour la progression de la synucléinopathie au cours de la maladie de Parkinson. Les atteintes neuropathologiques observées dans la maladie de Parkinson débuterait au niveau de l'estomac (première « attaque ») ou au niveau nasal (deuxième « attaque ») et progresserait ensuite vers le tronc cérébral et le lobe temporal. La synucléinopathie atteindrait ensuite le mésencéphale et les aires corticales. Les flèches bleues représentent l'ordre proposé d'ascension progressive de la pathologie. D'après (Angot *et al.*, 2010).

3.1.3 Formes héréditaires

La maladie de Parkinson est majoritairement une maladie sporadique. Les formes génétiques héréditaires de la maladie sont rares et représente un peu moins de 10% de la population de patients (Corti *et al.*, 2011; Verstraeten *et al.*, 2015). La première forme familiale (à transmission autosomique dominante) de la maladie de Parkinson a été décrite en 1997 chez une famille italienne et trois familles grecques possédant une mutation dans le gène *SNCA* situé sur le bras long du chromosome 4 (régions 4q21-q23) et codant pour la protéine α -syn avec la mutation Ala53Thr (Polymeropoulos *et al.*, 1997). Depuis lors, cinq autres mutations faux-sens de l' α -syn ont été identifiées (locus *PARK1*): Ala30Pro, Glu46Lys, His50Gln, Gly51Asp et Ala53Glu (Appel-Cresswell *et al.*, 2013; Kruger *et al.*, 1998; Lesage *et al.*, 2013; Pasanen *et al.*, 2014; Proukakis *et al.*, 2013; Zarranz *et al.*, 2004). Bien que ces mutations restent extrêmement rares, il est intéressant de noter qu'elles entraînent des syndromes cliniques distincts. En effet, seule la mutation Ala30Pro induit une maladie de Parkinson identique à la forme sporadique alors que les autres mutations induisent des formes cliniquement plus précoces associées à une progression rapide et des symptômes secondaires tels que des hallucinations, des démences, des altérations du tractus pyramidal ou des dysfonctionnements autonomiques. De plus, comme décrit précédemment, l'identification des familles ayant une duplication ou triplification d'une large portion du bras long du chromosome 4 (locus *PARK4*) a permis d'établir une corrélation entre la quantité de protéine et la sévérité de la maladie. Il est toutefois important de prendre en compte que ces duplications/triplifications concernent une large région qui implique au total 17 autres gènes que *SNCA* sont aussi dupliqués/tripliqués. À ce jour, ces autres cibles n'ont pas fait l'objet d'investigation sur leur importance ou leur contribution.

En dehors de l' α -syn, d'autres gènes ont été impliqués dans des formes familiales de la maladie de Parkinson. Bien que 15 loci ont été rapportés dans la littérature, certains ne sont pas encore confirmés par une seconde publication ou sont seulement des facteurs de risque (**Tableau 1**) (Klein and Westenberger, 2012). Seuls cinq loci autre que *PARK1/4* ont été confirmés comme induisant une maladie de Parkinson. Parmi eux, on distingue le locus *PARK8* (protéine leucine-rich repeat kinase 2 – LRRK2) qui est associé à une transmission autosomique dominante et les loci *PARK2* (protéine parkin), *PARK6* (protéine PTEN-induced putative kinase 1 – PINK1), *PARK7* (protéine DJ1), *PARK9* (protéine ATP13A2) associés à une transmission autosomique récessive (Klein and Westenberger, 2012). L'ensemble de ces six loci n'explique toutefois que 10% des formes familiales de la maladie de Parkinson (Verstraeten *et al.*, 2015).

Bien que les rôles exacts des différentes protéines associées avec ces loci restent méconnus, il est particulièrement intéressant de remarquer que l'ensemble des loci mentionnés précédemment est associé avec le système de contrôle qualité des protéines et des organelles (Bourdenx *et al.*, 2014a). En effet, les protéines PINK1, DJ1 et parkin sont toutes trois impliquées dans la voie de la mitophagie permettant de dégradation des mitochondries déficientes (Schon and Przedborski, 2011). ATP13A2 est une protéine transmembranaire lysosomale P5-type ATPase dont le rôle a été associé avec l'homéostasie cationique (Gitler *et al.*, 2009; Ramonet *et al.*, 2012). A ce jour, le substrat transporté à travers ATP13A2 reste inconnu. L'altération de la protéine ATP13A2 provoque de sévères perturbations du fonctionnement des lysosomes dans des fibroblastes de patient parkinsoniens porteurs d'une mutation sur le gène *PARK9* (Dehay *et al.*, 2012b). Des données *in vitro* suggèrent que le knockdown d'ATP13A2 entraîne l'accumulation d' α -syn suite à la dysfonction lysosomale (Usenovic *et al.*, 2012). Un premier modèle murin transgénique avec knockout d'ATP13A2 montre une modeste accumulation d' α -syn au niveau de l'hippocampe sans dégénérescence des neurones dopaminergiques (Schultheis *et al.*, 2013). Cependant, des données obtenues avec une autre souris transgénique knock-out pour ATP13A2 n'ont pas permis de retrouver cette accumulation d' α -syn (Kett *et al.*, 2015). En effet, malgré l'apparition de dysfonctions motrices (en l'absence de dégénérescence des neurones dopaminergiques), la présence d'agrégats protéiques (immunoréactifs pour l'ubiquitine) mais sans altération fonctionnelle des lysosomes, les animaux ne présentent pas d'accumulation d' α -syn dans sa forme native ou phosphorylée en Ser129. Les auteurs situent la dysfonction au niveau du transport endolysosomal avec accumulation de protéines lysosomales, altération de la maturation de la cathepsin D et diminution de la dégradation de substrats autophagiques tels que p62. Ces altérations seraient toutefois indépendantes de la présence d' α -syn. L'absence de pathologie plus importante chez des animaux knock-out pour ATP13A2 mais surexprimant l' α -syn humaine et l'absence de protection des neurones dopaminergiques, par la surexpression d'ATP13A2, dans un modèle de surexpression virale de l' α -syn tend à confirmer cette dernière hypothèse (Daniel *et al.*, 2014; Kett *et al.*, 2015). Des études complémentaires sont nécessaires pour conclure quant à cette relation car nous pouvons aisément imaginer que le knockout total induit l'apparition de mécanismes compensatoires au cours du développement masquant l'effet de la perte de fonction d'ATP13A2.

Gène	Transmission	Phénotype	Progression	Synucléinopathie
<i>SNCA</i>	AD	Précoce ou Tardif	Rapide	✓
<i>PARK2</i>	AR	Précoce	Lente	?
<i>PARK7</i>	AR	Précoce	Lente	ND

<i>LRRK2</i>	AD	Tardive	Classique	✓ (Tau/TDP-43)
<i>PINK1</i>	AR	Précoce	Lente	✓
<i>ATP13A2</i>	AR	Juvenile	Atypique	?
<i>FBXO7</i>	AR	Juvenile	Atypique	ND
<i>PLA2G6</i>	AR	Juvenile	Atypique	✓ (Dépôts de fer)
<i>VPS35</i>	AD	Tardive	Classique	ND
<i>EIF4G1</i>	AD	Tardive	Classique	✓ (Tau/Aβ)
<i>DNAJC6</i>	AR	Juvenile	Atypique	ND
<i>ATP6AP2</i>	Liée à l'X	Juvenile ou Précoce	Atypique	✗ (Tau)
<i>COQ2</i>	AR	Tardive	Atypique (AMS)	✓
<i>SYNJ1</i>	AR	Juvenile	Atypique	ND
<i>DNAJC13</i>	AD	Tardif	Classique ou Atypique	✓

Tableau 1. Caractéristiques des formes familiales identifiées. AD : autosomique dominante. AR : autosomique récessive. ND : non déterminé. Adapté de (Verstraeten *et al.*, 2015).

Il est intéressant de noter que certaines mutations induisant un syndrome parkinsonien ne sont pas associées avec une synucléinopathie. Bien que cela reste soumis à débat du fait du faible nombre de cas rapportés dans la littérature, il semblerait que les mutation du locus *PARK2* ne soient pas associées avec une synucléinopathie (Miyakawa *et al.*, 2013). Il reste cependant à déterminer si l'ensemble des mutations du locus *PARK2* (170 identifiées à ce jour- pour revue voir (Corti *et al.*, 2011)) présente cette caractéristique. De façon plus générale et face à ce constat, nous pouvons imaginer que plusieurs causes pourraient entraîner des syndromes parkinsoniens impossibles à distinguer en clinique ce qui laisserait envisager l'existence de formes différentes de la maladie et appellerait à un diagnostic clinique plus strict.

3.1.4 Traitements

Il n'existe à ce jour aucun traitement agissant sur l'évolution du processus neurodégénératif au centre de la maladie de Parkinson (Meissner *et al.*, 2011). Les traitements actuels visent uniquement à prendre en charge la symptomatologie motrice et non-motrice de la maladie (Meissner *et al.*, 2011). On distingue classiquement les traitements pharmacologiques et chirurgicaux. Les symptômes moteurs tels que la bradykinésie, la rigidité articulaire ou le tremblement de repos sont améliorés par l'utilisation de traitement à visée de restauration des niveaux centraux de dopamine. Presque 50 ans après sa découverte,

la levodopa (L-3,4-dihydroxyphenylalanine, le précurseur direct de la dopamine) reste à ce jour le traitement de référence de la maladie de Parkinson. Cependant, ce traitement induit inévitablement l'apparition d'effets secondaires indésirables que sont les dyskinésies induites par la levodopa (Bastide *et al.*, 2015).

3.1.5 Modélisation expérimentale de la maladie de Parkinson

De très nombreux modèles de la maladie de Parkinson ont été développés au cours des 40 dernières années. Dans cette partie nous ne décrivons que les modèles utilisant des neurotoxines et les modèles transgéniques relatifs à l' α -syn par transgénèse classique ou utilisation de vecteurs viraux. Les modèles relatifs à l'hypothèse « prion » seront détaillés dans la partie 4.2.

Les modèles les plus utilisés restent les modèles toxiques ciblant spécifiquement les neurones monoaminergiques et permettant d'induire chez les rongeurs et le primate non-humain des symptômes parkinsoniens (akinésie, bradykinésie principalement) ainsi que des mouvements anormaux involontaires après le traitement avec la levodopa. Au sein de ces modèles toxiques, le modèle utilisant l'analogue de la mépéridine qu'est le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) présente un intérêt particulier car il permet de reproduire certains aspects de la dégénérescence parkinsonienne (notamment les altérations mitochondriales et lysosomales) (Bove *et al.*, 2014; Dauer and Przedborski, 2003). Cependant, ces modèles ne présentent pas d'agrégation d' α -syn après intoxication au MPTP même si la phosphorylation ou la nitrosylation de l' α -syn ont été rapportées chez la souris ou le singe écureuil (*Saimiri sciureus*) (McCormack *et al.*, 2008; Przedborski *et al.*, 2001). Au moins une étude a montré une forme de synucléinopathie chez le primate traité au MPTP avec la présence d'inclusions immunoréactives pour l' α -syn chez le babouin (*Papio anubis*) (Kowall *et al.*, 2000). L'absence de réelle caractérisation du stade agrégatif ne permet toutefois pas de conclure quant à l'existence d'une agrégation d' α -syn induite par le MPTP et des études complémentaires sont nécessaires.

Depuis les années 2000, un grand nombre de modèles murins transgéniques ont été développés exprimant notamment l' α -syn humaine sauvage, mutée ou tronquée sous différents promoteurs. Les résultats rapportés dans la littérature sont variables et contradictoires avec certaines souches présentant agrégation d' α -syn sans dégénérescence et vice versa (Blesa and Przedborski, 2014). Pour ces raisons, des modèles transgéniques commencent à apparaître avec notamment l'utilisation du chromosome artificiel d'origine

bactérienne en transgénèse chez le rat (Nuber *et al.*, 2013). Ce modèle présente une association intéressante de marqueurs pathologiques avec une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques associée à des altérations comportementales et une agrégation progressive d' α -syn. De façon quasiment concomitante, les modèles basés sur la surexpression virale de l' α -syn sont apparus. Depuis le premier modèle apparu en 2002, utilisant un virus adéno-associé recombinant (rAAV) de pseudotype 2/2 (rAAV2/2), de très nombreuses études ont été publiées (Van der Perren *et al.*, 2015b). Malgré une grande diversité dans les virus, capsides ou promoteurs utilisés, les études montrent toutes une dégénérescence des neurones dopaminergiques et la dernière génération permet d'atteindre 80% de neurodégénérescence avec accumulation d' α -syn et altérations comportementales (**Tableau 2**) (Van der Perren *et al.*, 2015b).

Table 2 Human α -synuclein viral vector-based rodent models

α -Synuclein	Vector system	Promoter	Species	DN loss in SN	Time course	α -SYN aggregates	Ubiq. phos. S129	Motor phenotype	L-dopa reversible
First generation									
WT, A53T (Kirik <i>et al.</i> 2002)	rAAV2/2	CBA	Rat	30–80 %	8–16 weeks	Yes	–	Mild	–
A30P (Klein <i>et al.</i> 2002)	rAAV2/2	CBA	Rat	53 %	1 year	Yes	–	–	–
WT, A30P, A53T (Lo Bianco <i>et al.</i> 2002)	LV	PGK	Rat	24–35 %	20 weeks	Yes	No	–	–
WT, A30P (Lauwers <i>et al.</i> 2003)	LV	CMV	Mice	10–25 %	40–52 weeks	Yes	Yes	–	–
WT, A53T (Kirik <i>et al.</i> 2003)	rAAV2/2	CBA	Prim.	30–60 %	16 weeks	Yes	–	Mild	–
WT (Yamada <i>et al.</i> 2004)	rAAV2/2	ND	Rat	50 %	13 weeks	Yes	No	Yes	No/mild
A53T (Maingay <i>et al.</i> 2006)	rAAV2/2	CBA	Rat	\pm 40 %	14 weeks	–	–	–	–
A30P (Lauwers <i>et al.</i> 2007)	LV	CMV	Rat	21–52 %	46 weeks	Yes	Yes	–	Mild
WT (St Martin <i>et al.</i> 2007; Theodore <i>et al.</i> 2008)	rAAV2/2	CBA	Mice	25 %	24 weeks	No	–	–	–
A53T (Chung <i>et al.</i> 2009)	rAAV2/2	Syn-1	Rat	35 %	17 weeks	–	–	–	–
Second generation									
WT, A53T (Eslamboli <i>et al.</i> 2007)	rAAV2/5	CBA	Prim.	A53T 40 %	1 year	Yes Θ	Yes	Yes	Moderate
WT, S129D/A (Gorbatyuk <i>et al.</i> 2008)	rAAV2/5	CBA	Rat	WT 60 % S129A 70 %	26 weeks 4 weeks	Yes	–	–	–
WT, A30P, S129D/A (Azeredo da Silveira <i>et al.</i> 2009)	rAAV2/6	CMV	Rat	WT, A30P 20 % S129A 70 %	8 weeks	Yes Θ	–	Yes	–

(continued)

Table 2 (continued)

α -Synuclein	Vector system	Promoter	Species	DN loss in SN	Time course	α -SYN aggregates	Ubiq. phos. S129	Motor phenotype	L-dopa reversible
WT, S129D/A (McFarland <i>et al.</i> 2009a)	rAAV2/8	CBA	rat	26 %	6 weeks	yes	yes	–	–
A53T (Koprich <i>et al.</i> 2011)	rAAV1/2	CBA	rat	28 %	6 weeks	yes Θ	–	–	mild
WT, A53T, A30P (Winner <i>et al.</i> 2011), E46K, E57K*, E35K*	LV	CMV	rat	17–40 %	3 weeks	–	–	–	–
Third generation									
WT (Decressac <i>et al.</i> 2012)	rAAV2/6	Syn-1	rat	80 %	6–16 weeks	yes	–	yes	good
A53T (Van der Perren <i>et al.</i> 2014)	rAAV2/7	CMV/Syn-1	rat	80–90 %	4 weeks	yes	yes	–	good
A53T, WT (Oliveras-Salvá <i>et al.</i> 2013)	rAAV2/7	CMV/Syn-1	mice	82 %	8 weeks	yes	–	yes	–

Tableau 2. Modèles de surexpression virale de l' α -syn chez les rongeurs et primates non-humains. rAAV : virus adéno-associé recombinant. LV : lentivirus. CBA : promoteur chicken β -actin. PGK : promoteur de la phosphoglycerate kinase. CMV : promoteur du cytomegalovirus. Syn-1 :

promoteur de la synapsin. CMV/Syn-1 : promoteur Syn-1 hybride avec l'enhancer du CMV. (-) : présence d'agrégats d' α -syn résistant à la digestion par la protéinase K. D'après (Van der Perren *et al.*, 2015b)

Ces modèles, malgré une expression forte de la protéine questionnant sa valeur physiologique, présentent l'intérêt immense de pouvoir être facilement appliqués dans un grand nombre d'espèces du rongeur au primate comme nous l'avons fait dans le projet 1 (Bourdenx *et al.*, 2015a). Bien qu'il soit difficile et critiquable de conclure quant à la réelle validité d'un modèle par rapport à la pathologie humaine, il est intéressant de noter que les modèles de surexpression virale avaient montré, contrairement aux modèles toxiques, une absence de neuroprotection des facteurs neurotrophiques gliaux (GDNF notamment) (Decressac *et al.*, 2011; Lo Bianco *et al.*, 2004), prédisant ainsi les résultats obtenus dans les essais cliniques ultérieurs (Marks *et al.*, 2010).

De façon générale, il n'existe aujourd'hui aucun modèle représentant tous les aspects de la maladie humaine (Bezard and Przedborski, 2011; Bezard *et al.*, 2013; Dehay *et al.*, 2015b). Les confirmations d'efficacité de potentielles thérapies doivent donc se faire à l'heure actuelle dans plusieurs modèles pour espérer une translation vers la clinique réussie.

3.2 DEMENCE A CORPS DE LEWY

La démence à corps de Lewy est la seconde cause de démence chez le sujet âgé après la maladie d'Alzheimer et on estime que 15 à 25% des patients âgés déments ont une démence à corps de Lewy (Hanson and Lippa, 2009). Bien que certaines formes familiales ont pu être décrites, nous ne connaissons actuellement pas de gène spécifique à la démence à corps de Lewy (Tsuang *et al.*, 2004). Les gènes décrits dans le **Tableau 1** sont décrits souvent par la dénomination clinique des syndromes parkinsoniens, il serait intéressant de déterminer si les loci associés avec un développement atypique sont plus proches d'une démence à corps de Lewy ou d'une maladie de Parkinson. Certains auteurs ont proposé l'existence de forme familiale, héréditaire, de démence à corps de Lewy par l'identification de familles avec syndromes parkinsoniens et démence ayant au moins un parent avec un cas confirmé de démence à corps de Lewy par analyse anatomo-pathologique (Tsuang *et al.*, 2004). Néanmoins, il n'existe à ce jour aucun locus directement associé avec la démence à corps de Lewy. Comme ce fut le cas avec la maladie de Parkinson, l'identification d'un locus permettrait très probablement des avancées dans la compréhension de l'étiologie de la maladie. Les symptômes principaux sont une démence, un syndrome parkinsonien, des hallucinations et une confusion. Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif.

Les démences sont des symptômes fréquents dans la maladie de Parkinson avec une prévalence globale de 30% (Irwin *et al.*, 2013b). En ce qui concerne la maladie de Parkinson, suite à l'hypothèse de Braak il a été proposé que l'apparition des altérations cognitives corresponde à la progression de la synucléinopathie vers les régions corticales. Le diagnostic différentiel entre les maladies de Parkinson avec démence et les démences à corps de Lewy se fait en fonction de la dominance des syndromes extrapyramidaux ou de la démence dans le phénotype clinique (Halliday *et al.*, 2011). Il arrive cependant que la concomitance des symptômes pose problème dans le diagnostic final. Un critère a été défini pour la recherche : le délai d'apparition des démences après le diagnostic de syndromes extrapyramidaux parkinsonien (<1 an pour les démences à corps de Lewy et >1 an pour les maladies de Parkinson avec démence) (Irwin *et al.*, 2013b).

Sur un plan anatomopathologique, l'absence de corrélation entre la quantité de corps de Lewy corticaux et mésencéphaliques laisse supposer que la maladie de Parkinson et la démence à corps de Lewy repose sur des mécanismes distincts (Gomez-Tortosa *et al.*, 1999). Les corps de Lewy corticaux observés dans ces deux affections présentent un aspect moins dense que les corps de Lewy observés dans le tronc cérébral (Dickson *et al.*, 2009). Cette différence structurelle laisse supposer soit une absence de maturité des agrégats soit l'existence d'un mécanisme d'agrégation de l' α -syn différent entre les deux maladies ou les deux régions cérébrales ou types de neurones.

L'existence d'une différence anatomopathologique entre la démence à corps de Lewy et la maladie de Parkinson avec démence reste intensément débattue (Dickson *et al.*, 2009). Notons que de façon similaire, une large proportion des patients avec un diagnostic clinique de maladie d'Alzheimer (jusqu'à 60%) présente une synucléinopathie (Hamilton, 2000). Ainsi même les formes de démences à corps de Lewy dites « pures » présentent une pathologie β -amyloïde (souvent importante) et plus rarement une tauopathie. Plus que la pathologie β -amyloïde qui apparaît fréquente dans tous les types de maladies chez le sujet âgé, l'importance relative de la synucléinopathie ou tauopathie semble déterminer le diagnostic entre : démence à corps de Lewy pure, démence à corps de Lewy avec maladie d'Alzheimer, maladie d'Alzheimer avec synucléinopathie amygdalienne et maladie d'Alzheimer pure (Halliday *et al.*, 2011).

3.3 ATROPHIE MULTISYSTEMATISEE

L'atrophie multisystématisée est une synucléinopathie rare et fatale avec une prévalence de 1.9 to 4.9 pour 100 000 personnes. Elle était initialement connue sous la forme de trois maladies distinctes : le syndrome de Shy-Drager, l'atrophie olivo-ponto-cérébelleuse et la dégénérescence striatonigrale (Graham and Oppenheimer, 1969). La symptomatologie combine un syndrome parkinsonien et cérébelleux (ataxie) et des altérations du système nerveux autonome. On distingue deux sous-types de cette maladie en fonction de la prédominance de symptômes moteurs (forme P) ou cérébelleux (forme C).

Sur un plan anatomopathologique, en plus d'inclusions intraneuronales contenant de l' α -syn, l'atrophie multisystématisée est caractérisée par la présence d'inclusions cytoplasmiques dans les oligodendrocytes nommées inclusions cytoplasmiques gliales ou corps de Papp-Lantos (Halliday *et al.*, 2011; Papp *et al.*, 1989). Outre cette synucléinopathie, le tissu cérébral des patients présente une astroglie, une dégénérescence neuronale (majoritairement dans le putamen, le cervelet et la région olivo-ponto-cérébelleuse), une vacuolisation du tissu cérébral et une perte de myéline (Wenning *et al.*, 2008).

L'origine de la présence d'inclusion d' α -syn dans les oligodendrocytes reste intensément débattue. En effet, bien que les oligodendrocytes expriment transitoirement l' α -syn au cours du développement, des études en hybridation *in situ* n'ont pas pu conclure à une production locale d' α -syn oligodendrogliale alors que des études en PCR quantitative suggèrent l'inverse (Fernagut *et al.*, 2014). L'observation expérimentale que l' α -syn neuronale peut être importée dans les oligodendrocytes par un mécanisme dépendant de la dynamine suggère une production neuronale et un transfert (Reyes *et al.*, 2014). Des études complémentaires sont nécessaires pour conclure.

Sur un plan thérapeutique, il n'existe à ce jour aucun traitement curatif pour l'atrophie multisystématisée. Contrairement à son efficacité dans la maladie de Parkinson, la levodopa ne présente un effet que chez 10 à 20% des patients atteints de l'atrophie multisystématisée (Wenning *et al.*, 2008). Les seuls traitements disponibles sont donc symptomatiques et concernent majoritairement les symptômes non moteurs.

4. HYPOTHESE PRION POUR LES SYNUCLEINOPATHIES

En 2008, trois groupes indépendants ont étudié la présence ou non d'une synucléinopathie dans des cerveaux de patients ayant reçus une greffe de neurones mésencéphaliques embryonnaires dans le putamen. Ces trois études montrent que 3 patients (sur 8 étudiés au total) présentent une synucléinopathie dans le greffon, avec des inclusions présentant des caractéristiques communes avec les corps de Lewy (Kordower *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Mendez *et al.*, 2008). Ces résultats, en cohérence avec l'hypothèse de Braak, sont à l'origine de l'hypothèse prion pour la maladie de Parkinson ou encore hypothèse de « l'hôte au greffon ».

4.1 CARACTERE PRION DE L'ALPHA-SYNUCLEINE

Après avoir été longtemps mystérieux, les prions ont été finalement identifiés par Stanley B. Prusiner en 1982 qui comprit leur nature protéique et forgea ainsi le terme de « PROteïnaceous INFectious particles », prion. Leur propriété exceptionnelle relève de l'acquisition d'un caractère infectieux par la protéine prion (PrP) à la suite d'un changement conformationnel. La protéine PrP adopte une conformation pathologique suite à un événement post-traductionnel, inconnu à ce jour, entraînant un enrichissement de son repliement tridimensionnel en feuillets β . Les protéines PrP dans cette conformation pathologique forment ensuite des fibres de types amyloïdes. La particularité des protéines prion est que sous leur état pathologique elles influencent le repliement d'autres protéines PrP vers cette conformation pathologique, on parle alors de transconformation. Parmi les encéphalopathies spongiformes transmissibles chez l'humain, on peut citer la maladie de Creutzfeldt-Jakob, la maladie de Gerstmann-Straüssler-Scheinker, l'insomnie familiale fatale et le kuru.

Au cours des dix dernières années, des hypothèses similaires ont été émises pour la majorité des maladies neurodégénératives. Un comportement de type prion a été décrit pour les protéines impliquées dans ces différentes maladies : α -syn pour la maladie de Parkinson, huntingtine pour la maladie de Huntington, tau pour la maladie d'Alzheimer et les autres tauopathies, A β pour la maladie d'Alzheimer, SOD1 et TDP-43 pour la sclérose latérale amyotrophique. Bien que de telles hypothèses ont été formulées, il paraît encore difficile d'adopter le terme de « prion » étant donné l'absence de preuve d'une propriété essentielle : la transmission entre individu. Malheureusement, la littérature est quasiment inexistante sur le sujet. Une étude de Irwin et collaborateurs démontre une absence de transmission de maladie

de Parkinson ou d'Alzheimer chez des sujets ayant reçu des hormones de croissance dérivées de cadavres (Irwin *et al.*, 2013a). Très récemment, une étude démontre la présence d'une amyloïdopathie, sans manifestation clinique de maladie d'Alzheimer, chez 4 sujets (sur 8 étudiés) ayant reçu des hormones de croissances dérivées de cadavres pendant l'enfance (Jaunmuktane *et al.*, 2015). Cette étude suggère une éventuelle transmission interindividuelle pour la protéine A β . Il faut cependant garder à l'esprit que les patients ne sont pas décédés des conséquences de cette amyloïdopathie mais d'une maladie de Creutzfeldt-Jakob et seule l'étude du matériel original administré chez ces patients pourrait répondre à la question d'une contamination par des « graines » amyloïdes. Dans la suite de ce travail nous ferons référence aux propriétés de transmission lorsque l'injection d' α -syn exogène induit l'agrégation de l' α -syn endogène et de propagation lorsqu'il est possible d'observer une séquence cohérente de développement d'une synucléinopathie entre des régions interconnectées

De nombreuses études ont montré *in vitro* que l' α -syn recombinante s'agrège spontanément en solution aqueuse contrairement à la protéine tau qui nécessite l'ajout d'agent induisant l'agrégation (Conway *et al.*, 1998; Lim *et al.*, 2014). Cette réaction est accélérée par l'ajout de « graines amyloïdes » déjà formées. À ce jour, il n'existe aucune preuve expérimentale d'une autre propriété essentielle des prions qu'est la transconformation. Cela impliquerait de mettre en évidence un contact entre une protéine en conformation « pathologique » et l'autre en conformation « normale » associé à un changement de conformation de la protéine « normale » induit par la protéine « pathologique ».

L'hypothèse de Braak concernant la propagation de la synucléinopathie selon un schéma prévisible suggère un passage d'aire cérébrale à aire cérébrale d' α -syn sous une forme pathologique. Néanmoins et malgré des résultats expérimentaux récents, le mécanisme d'import, l'existence d'un récepteur ou le mécanisme de libération extracellulaire reste inconnu à ce jour. Une étude récente a montré que la sous-unité $\alpha 3$ de la pompe ATPase Na⁺/K⁺ présente au niveau de la membrane plasmique serait un partenaire d'interaction avec les fibres d' α -syn présentes dans le compartiment extracellulaire (Shrivastava *et al.*, 2015). Plusieurs autres mécanismes ont été suggérés allant de l'endocytose classique en passant par l'existence hypothétique de structure « tunnel » permettant un passage direct d'une cellule à une autre (Gousset *et al.*, 2009). L'absence dans la séquence de l' α -syn d'une séquence d'adressage au réticulum endoplasmique prévient sa sécrétion par les mécanismes classiques de l'exocytose. Malgré cela, de nombreuses études ont pu identifier de l' α -syn dans le milieu extracellulaire (plasmatique ou dans le liquide céphalo-rachidien) chez l'humain ainsi que dans le milieu de culture de cellules neuronales (Danzer *et al.*, 2007; El-Agnaf *et al.*, 2003;

Emmanouilidou *et al.*, 2010). Par ailleurs, une étude suggère que la libération de l' α -syn se ferait par un mécanisme dépendant du calcium (Emmanouilidou *et al.*, 2010).

Malgré un domaine de recherche en pleine expansion, de nombreuses preuves expérimentales sont encore nécessaires pour considérer l' α -syn comme membre de la famille des prions.

4.2 INOCULATION, TRANSCONFORMATION ET PROPAGATION DE L'ALPHA-SYNUCLEINE CHEZ L'ANIMAL

Les études chez l'animal, publiées dans les 3 dernières années, ont largement permis de renforcer et d'arriver à un consensus concernant l'hypothèse « prion » pour les synucléinopathies. Bien que de nombreuses études utilisant différents paradigmes expérimentales ont maintenant été publiées, nous nous focaliserons ici sur les injections d' α -syn recombinante ou dérivée de tissu humain chez des animaux sauvages.

Une première étude chez l'animal non-transgénique a montré que l'injection intrastriatale d' α -syn synthétisée et agrégée *in vitro* induit l'agrégation de l' α -syn endogène (rongeur), une dégénérescence des neurones dopaminergiques et une synucléinopathie progressant au cours du temps dans des régions interconnectées associée avec des altérations comportementales (Luk *et al.*, 2012a). De façon très intéressante, l'injection du même matériel n'a pas d'effet chez des animaux knock-out pour l' α -syn (Luk *et al.*, 2012a). Ce résultat confirme l'importance de la protéine endogène dans la sensibilité, l'initiation et la propagation de la synucléinopathie. Ce résultat expérimental est une des preuves, bien qu'indirecte, de l'éventuelle existence d'une transconformation chez l'animal. Un second travail a montré que l'injection dans la SNpc d' α -syn agrégée induit aussi une progression de la synucléinopathie même si dans ce cas il n'a pas été observé de dégénérescence des neurones dopaminergiques (Masuda-Suzukake *et al.*, 2013). Une dernière étude n'a pas pu confirmer l'induction d'une pathologie chez des animaux non transgéniques (Sacino *et al.*, 2014c). Ces études ont toutefois utilisées des méthodes de synthèse, des protocoles d'agrégation et d'injections différents, ce qui empêche toute comparaison claire des résultats obtenus.

Une critique globale pouvant être adressée à ces études est l'utilisation d'agrégats synthétiques d' α -syn qui sont généralement considérés comme faiblement pathogènes, induisant difficilement une nucléation, et dont l'existence dans le cerveau des patients reste discutable (Jucker and Walker, 2011; Recasens and Dehay, 2014). En effet, les agrégats

provenant des patients auraient des propriétés pathogéniques à ce jour non identifiées qui ne peuvent pour le moment être reproduites par les agrégats synthétiques. Une étude récente du laboratoire a utilisé des corps de Lewy purifiés par gradient de sucrose à partir de mésencéphales de patients atteints de synucléinopathie. Dans cette étude, l'inoculation de ces corps de Lewy purifiés a induit une accumulation intracellulaire d' α -syn pathologique (forme phosphorylée), la progression dans des régions interconnectées et la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques chez la souris sauvage et le primate non-humain (Recasens *et al.*, 2014). L'absence de pathologie induite par les corps de Lewy privés d' α -syn par immunoprécipitation ou chez l'animal knock-out pour l' α -syn renforce le rôle central et en duo de l' α -syn endogène et exogène dans l'initiation de la synucléinopathie. Il est intéressant de noter que les doses injectées nécessaires à l'induction d'une synucléinopathie sont très différentes selon l'inoculum utilisé, synthétique ou purifié à partir de cerveaux de patients. Deux études récentes ont réalisé une expérience similaire mais en utilisant du matériel provenant de patients atteints de l'atrophie multisystématisée mais chez des animaux transgéniques exprimant l' α -syn humaine (Prusiner *et al.*, 2015; Watts *et al.*, 2013). L'absence de caractérisation de l'inoculum (broyat de cerveau de patients) et l'utilisation d'animaux transgéniques pour l' α -syn, même asymptomatiques, empêche de conclure quant aux agrégats présents dans l'atrophie multisystématisée.

Concernant l'hypothèse de la double-« attaque » détaillée précédemment, plusieurs études ont été menées. Tout d'abord l'injection de virus AAV dans le nerf vague a permis la transduction des neurones cholinergiques et l'initiation d'une synucléinopathie progressant des régions interconnectées (Ulusoy *et al.*, 2013). Deuxièmement, l'injection de formes recombinantes d' α -syn au niveau des bulbes olfactifs induit une propagation très rapide de formes monomériques et oligomériques, mais pas fibrillaires vers des régions directement connectées aux bulbes olfactifs (cortex piriforme, amygdale par exemple) (Rey *et al.*, 2013). La rapidité avec laquelle les monomères ou oligomères d' α -syn se propagent apparaît toutefois étonnante (bulbe olfactif – cortex piriforme : 1,5h) en comparaison des autres études. Enfin, une étude s'est récemment intéressée à l'injection dans la paroi ventrale du duodénum de broyat de cerveau de patients parkinsoniens (sans caractérisation biochimique) ou d'agrégats d' α -syn recombinante chez le rat sauvage (Holmqvist *et al.*, 2014). Six jours après l'injection entérique, des cellules immunopositives pour l' α -syn humaine peuvent être identifiées au niveau du noyau dorsal du nerf vague des différentes espèces injectées. En contradiction avec l'étude précédente, les formes fibrillaires, pourtant synthétisées par la même équipe, présentaient ici une propagation le long du nerf vague équivalente au broyat de

cerveau de patient parkinsonien (Holmqvist *et al.*, 2014). Des études complémentaires restent nécessaires pour préciser les propriétés spécifiques des différentes espèces d' α -syn.

Récemment, plusieurs laboratoires ont décrit l'existence de différentes souches de formes fibrillaires d' α -syn ayant des propriétés distinctes. L'identification de souches associées avec des pathologies distinctes serait une étape de plus vers l'appartenance de l' α -syn à la famille des protéines prions. En 2013, il a été montré que certaines souches d' α -syn synthétique initiaient l'agrégation de la protéine tau, suggérant ainsi des mécanismes communs et croisés dans les maladies neurodégénératives (Guo *et al.*, 2013). Plus récemment le groupe de Ronald Melki a montré l'existence de différentes formes fibrillaires d' α -syn ayant des propriétés distinctes en terme de toxicité *in vitro* (Bousset *et al.*, 2013). L'injection chez le rat de ces différentes formes fibrillaires purifiées et caractérisées ne montre finalement que peu ou pas d'altération comportementale, et une différence anatomopathologique uniquement si les animaux ont au préalable reçu une injection d'un virus adéno-associé permettant la surexpression de la forme humaine de l' α -syn mutée Ala53Thr (Peelaerts *et al.*, 2015). L'absence de dégénérescence et la faible synucléinopathie induite par les inoculations pourrait être due à une faible infectivité des espèces recombinantes ou à une résistance du modèle rongeur utilisé (ici le rat). Cette étude a le mérite d'utiliser des espèces caractérisées précisément sur un plan biochimique car il apparaît des problèmes de reproductibilité dans les modèles utilisant la protéine recombinante du fait d'une absence de réelle caractérisation autre qu'une confirmation en microscopie électronique de la présence de formes fibrillaires. L'identification de souches différentes d' α -syn induisant des synucléinopathies distinctes telles que la maladie de Parkinson, l'atrophie multisystématisée ou la démence à corps de Lewy serait un pas de plus dans la confirmation de l'hypothèse « prion » en gardant à l'esprit que la démonstration expérimentale reste à faire. Le tableau 3 propose de résumer les principales questions ouvertes de ce champ de recherche dont l'absence de réponse prévient l'utilisation du terme « prion » (**Tableau 3**).

Questions ouvertes et preuves expérimentales manquantes

- Quelle est la structure moléculaire des souches pathogéniques ?
- Existe-t-il un cofacteur, inconnu à ce jour, expliquant la différence de toxicité entre souches humaines et agrégats recombinants ?
- Existe-t-il des souches responsables des différentes maladies ou des différentes propriétés (transmission, propagation, toxicité) ?
- Existe-t-il un récepteur à l' α -syn ?
- Comment l' α -syn est-elle libérée dans le milieu extracellulaire ?
- Quel est le rôle des cellules gliales dans la transmission et la toxicité liée à l' α -syn ?
- Les espèces présentent-elles une susceptibilité équivalente à l' α -syn ?
- L' α -syn pathologique peut-elle « corrompre » d'autres protéines telles que la protéine tau ?
- Quelle est l'importance du mécanisme « prion » dans l'étiologie de la maladie ?

Tableau 3. Résumé des questions ouvertes ou des preuves expérimentales manquantes dans l'hypothèse « prion » pour les synucléinopathies. Adapté de (Jucker and Walker, 2011; Recasens and Dehay, 2014)

OBJECTIFS DE LA THESE

Comme nous avons pu le voir dans ce chapitre introductif, malgré l'existence de traitements symptomatiques efficaces pour la maladie de Parkinson, les synucléinopathies dans leur ensemble manquent d'un traitement neuroprotecteur ou neurorestaurateur permettant de ralentir ou d'arrêter le processus neurodégénératif.

Ce travail de thèse a consisté à mener une approche multifactorielle à visée mécanistique, de modélisation et vers des stratégies thérapeutiques (**Figure 13**). Ces travaux, menés parallèlement, se sont intéressés à : développer de nouvelles méthodes pour générer des modèles animaux en utilisant des vecteurs viraux, étudier la dysfonction lysosomale et son ciblage thérapeutique, et évaluer l'hypothèse prion pour les synucléinopathies dans un contexte de modélisation et thérapeutique. Ces trois axes constituent les trois sous-parties de la section Résultats. Le cœur de ce travail est l' α -syn ou ses conséquences au niveau cellulaire (dysfonction lysosomale notamment) car elle permet notamment de faire le lien entre les formes familiales héréditaires et sporadiques de la maladie. Dix-huit ans après son identification comme élément constituant des corps de Lewy, l' α -syn a aujourd'hui pris une place considérable dans la recherche sur les synucléinopathies et, comme le prouvent les essais cliniques en cours (Dehay *et al.*, 2015a), elle est maintenant considérée comme une cible importante et centrale dans la pathologie.

Tout d'abord, nous avons cherché à définir la cinétique de dégénérescence du modèle rat de surexpression virale de l' α -syn et à évaluer l'effet de l'âge sur la susceptibilité vis à vis de la dégénérescence induite par l' α -syn dans 3 modèles de mammifères. Ensuite, nous avons proposé deux approches pour générer de nouveaux modèles transgéniques, applicables à l'étude des maladies neurodégénératives, en administrant des vecteurs viraux au premier jour de vie ou *in utero*. Ces méthodes ont été développées afin d'être utilisées dans une approche translationnelle.

Dans la seconde partie, nous nous sommes intéressés au lysosome seul ou avec l'ensemble du processus autophagique comme cible thérapeutique pour contrecarrer la dysfonction lysosomale dans des modèles de la maladie de Parkinson. La première approche a consisté à améliorer la fonction en utilisant des nanoparticules acidifiantes permettant de restaurer la perte d'acidité des lysosomes à la fois *in vitro* et *in vivo*. La seconde approche a été basée sur la quantité de lysosomes et l'importance du flux autophagique avec l'utilisation de vecteurs viraux permettant la surexpression d'un facteur de transcription central dans la régulation de la biogénèse lysosomale chez le rongeur et chez le primate.

Dans la dernière partie, nous nous sommes focalisés sur l'hypothèse prion dans la maladie de Parkinson. Nous avons tout d'abord développé une approche de modélisation chez le primate non-humain. Puis, chez le rongeur, nous avons examiné l'intérêt d'un modulateur allostérique des oligomères dans un modèle murin développé pour l'étude de l'hypothèse « prion » dans la maladie de Parkinson.

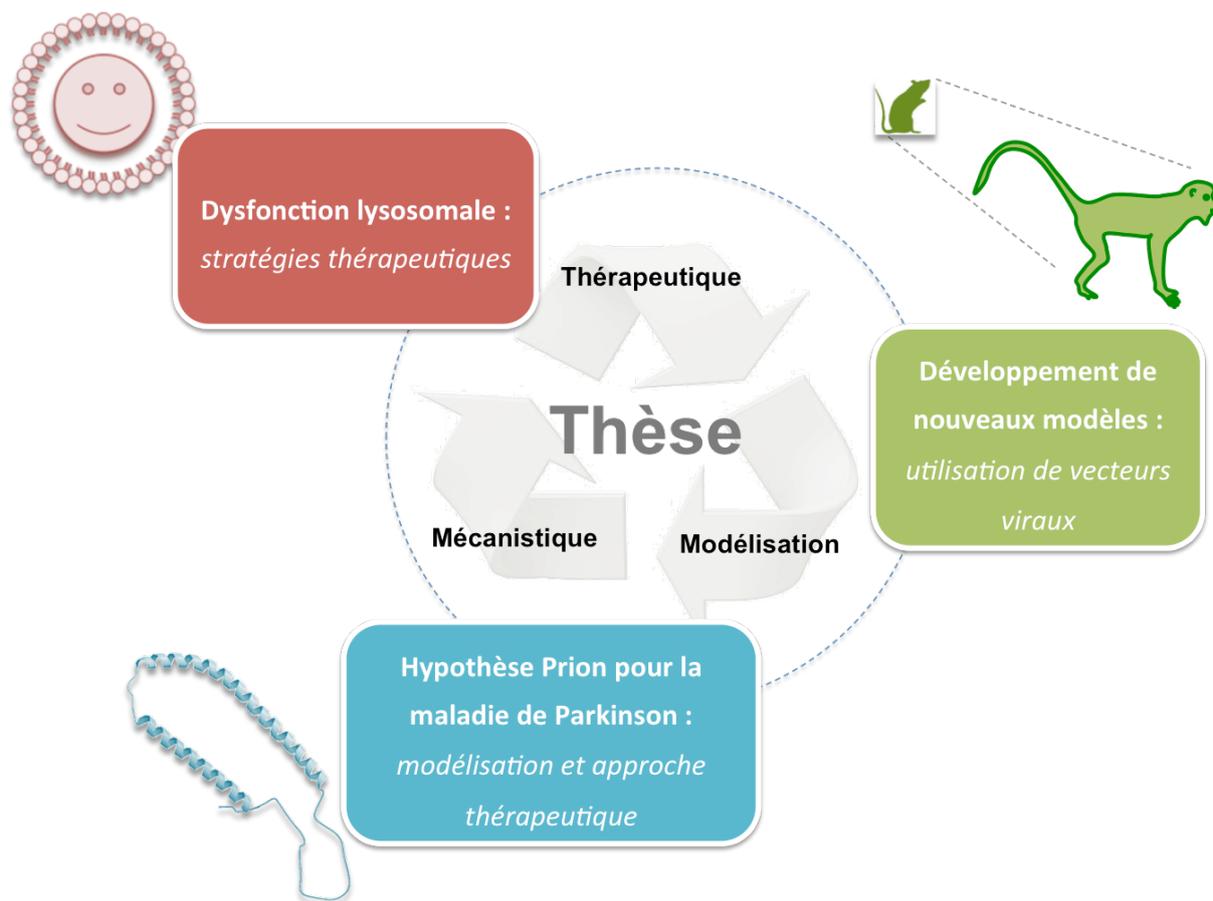


Figure 13. Objectifs et principales directions présentées dans ce travail de thèse.

Résultats

PARTIE 1 : MODELISATION EXPERIMENTALE DE LA MALADIE DE PARKINSON PAR UTILISATION DE VECTEURS VIRAUX

PROJET 1. ABSENCE DE ROLE ADDITIF DU VIEILLISSEMENT DANS LA DEGENERESCENCE DES NEURONES DOPAMINERGIQUES DANS UN MODELE DE SUREXPRESSION VIRALE DE L'ALPHA-SYNUCLEINE HUMAINE MUTEE.

Mathieu Bourdenx^{1,2†}, Sandra Dovero^{1,2†}, Michel Engeln^{1,2}, Simone Bido^{1,2}, Matthieu F. Bastide^{1,2}, Nathalie Dutheil^{1,2}, Isabel Vollenweider³, Laetitia Baud³, Camille Piron^{1,2}, Virginie Grouthier^{1,2}, Thomas Boraud^{1,2}, Grégory Porras⁴, Qin Li^{4,5}, Veerle Baekelandt⁶, Dieter Scheller⁷, AnneMichel⁷, Pierre-Olivier Fernagut^{1,2}, François Georges^{8,9}, Grégoire Courtine³, Erwan Bezard^{1,2*} and Benjamin Dehay^{1,2*}

†,*: Contribution équivalente.

Acta Neuropathologica Communication 2015.

Le vieillissement est considéré comme le principal facteur de risque non génétique pour la maladie de Parkinson mais son influence sur la toxicité induite par l' α -syn reste méconnue. Dans cet article, nous avons systématiquement injecté le même virus adéno-associé de pseudotype 2/9 (AAV2/9) permettant la surexpression de l' α -syn humaine avec la mutation Ala53Thr dans la SNpc chez 3 souches de souris, 2 souches de rats et des marmosets de différents âges. Le modèle rat a tout d'abord été utilisé pour une étude longitudinale comportementale et histologique. Cette première partie nous a permis de décrire la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques associée à l'accumulation d' α -syn au niveau mésencéphalique et striatal. De façon intéressante, nous avons pu mettre en évidence des altérations de la motricité fine dès 4 semaines après l'injection du virus et une diminution de la locomotion spontanée à partir de 8 semaines. Ces résultats sont compatibles avec l'hypothèse selon laquelle les patients parkinsoniens présentent les symptômes cliniques après avoir perdu environ 60% des neurones dopaminergiques. Une analyse fine de la motricité a permis de mettre en évidence, après 16 semaines, des altérations de la marche similaires à ceux présentes chez les patients.

Une fois ce modèle caractérisé, nous l'avons utilisé dans deux autres espèces. Tout d'abord, chez la souris, nous avons utilisé des mutants phénotypiques présentant un vieillissement accéléré. L'utilisation de ces animaux ainsi que des contrôles appropriés et des souris de fond génétique C57Bl/6J ne nous a pas permis de mettre en évidence un quelconque effet de l'âge sur le développement d'une synucléinopathie. Pour finir, nous avons injecté ce même virus chez des marmosets jeunes (âge moyen : 2 ans) ou âgés (âge moyen : 6 ans). Le décès des animaux âgés sans relation avec le traitement nous a forcé à écourter le délai après la chirurgie à 11 semaines. À ce point expérimental, nous n'avons pu mettre en évidence de susceptibilité accrue des animaux âgés à développer une dégénérescence ou une synucléinopathie. La seule différence notable était une quantité accrue d' α -syn phosphorylée

sur la sérine 129 chez les animaux jeunes par rapport aux animaux âgés.

En conclusion, ce travail montre la capacité de translation du modèle utilisant l'AAV2/9 entre les espèces et la toxicité de l' α -syn mutée chez toutes les espèces utilisées. Bien que le vieillissement a été considéré comme le facteur de risque non génétique principal pour le développement de la maladie de Parkinson, nos données expérimentales ne permettent pas de montrer une quelconque susceptibilité des animaux âgés à la dégénérescence induite par l' α -syn mutée.

Mathieu Bourdenx, Sandra Dovéro, Nathalie Dutheil, Marie-Hélène Canron, Grégory Porras, Deniz Dalkara, Erwan Bezard, and Benjamin Dehay.

Manuscrit en préparation

1. Contexte de l'étude

Comme nous l'avons brièvement décrit dans le chapitre introductif, il paraît aujourd'hui illusoire d'imaginer un unique modèle animal représentant l'ensemble d'une pathologie donnée. Seule l'utilisation combinée de plusieurs modèles récapitulant des caractéristiques physiopathologiques différentes de la maladie permettra probablement une avancée dans la recherche de nouvelles thérapies pour la maladie de Parkinson. L'utilisation combinée de modèle rongeur et primate non-humain présente un intérêt tout particulier étant donné que certaines des caractéristiques des neurones dopaminergiques chez les primates n'existent pas chez les rongeurs, l'accumulation de neuromélanine au cours du temps en est un exemple (Marsden, 1961). Les modèles transgéniques murins pour l' α -syn, rapidement développés après l'implication de l' α -syn dans l'étiologie de la maladie, ont à ce jour échoué à représenter des éléments clés de la maladie tels que l'agrégation protéique au niveau mésencéphalique associée à la dégénérescence des neurones dopaminergiques et le développement de dysfonction motrice (Blesa and Przedborski, 2014).

Dans ce contexte, l'utilisation de vecteurs viraux apparaît intéressante par sa simplicité d'utilisation notamment dans une approche translationnelle (Bourdenx *et al.*, 2014c; Weinberg *et al.*, 2013). Parmi les virus existants, les virus adéno-associés (AAV) présentent un intérêt particulier du fait de leur absence de pathogénicité, leur capacité à franchir la barrière hémato-encéphalique permettant des administrations systémiques, leur capacité à infecter les cellules post-mitotiques telles que les neurones et leur transduction à long-terme permettant l'expression stable du transgène (Weinberg *et al.*, 2013). La capacité de certains pseudotypes d'AAV à traverser la barrière hémato-encéphalique laisse envisager que l'administration systémique de virus permettra d'envisager des thérapies géniques pour des maladies neurologiques non-focales (Weinberg *et al.*, 2013).

2. But de l'étude et approches expérimentales utilisées

Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer l'étendue de la transduction cérébrale et périphérique après une administration intracardiaque d'AAV de pseudotypes 9 et rh10 chez le rat nouveau né au premier jour de vie (J1) avec ou sans mutation des tyrosines de surface (2YF) de la capsid virale (Dalkara *et al.*, 2012). Pour cela, nous avons tout d'abord obtenu la démonstration de faisabilité en utilisant le virus AAV2/9-GFP puis nous avons appliqué la même méthodologie pour le pseudotype rh10 et les mutants de capsides. Le but ultime de cette étude est de déterminer la possibilité de créer de nouvelles lignées d'animaux transgéniques par une méthodologie simple et applicable à un grand nombre d'espèce animale.

Pour cela, nous avons produit des virus recombinants dans des conditions identiques et les avons concentrés pour obtenir un titre viral important (de l'ordre de 10^{12} à 10^{13} génomes viraux par ml). Ces virus ont été administrés chez le rat à J1 directement en intracardiaque. Alors que plusieurs études ont utilisé des injections intraveineuses chez les animaux nouveaux-nés (Duque *et al.*, 2009; Foust *et al.*, 2009), nous avons fait l'hypothèse que l'injection intracardiaque permettrait une répartition plus rapide et homogène des particules virales tout en étant un geste chirurgical simple et rapide. Nous avons de plus choisi d'appliquer cette méthodologie chez le rat Sprague-Dawley étant donné que c'est une espèce de choix pour les neurosciences du fait de son répertoire comportementale plus complexe que celui de la souris. La preuve de concept ayant été obtenue chez le singe (Dehay *et al.*, 2012a), nous avons ici choisi d'affiner et d'améliorer les paramètres nécessaires à une transduction maximale.

Les méthodes expérimentales de l'analyse histologique ne sont pas détaillées ici étant utilisées en routine dans le laboratoire et déjà décrites dans le projet 1.

3. Résultats préliminaires

L'administration intracardiaque d'AAV2/9-GFP démontre une transduction cellulaire importante du transgène (ici la protéine fluorescente verte - GFP) 25 jours après l'injection, avec une expression étendue dans la majorité des structures cérébrales (**Figure 14 ci-après**). Il apparaît cependant un tropisme plus important pour les structures peu profondes (cortex et cervelet notamment) que les structures profondes (striatum).

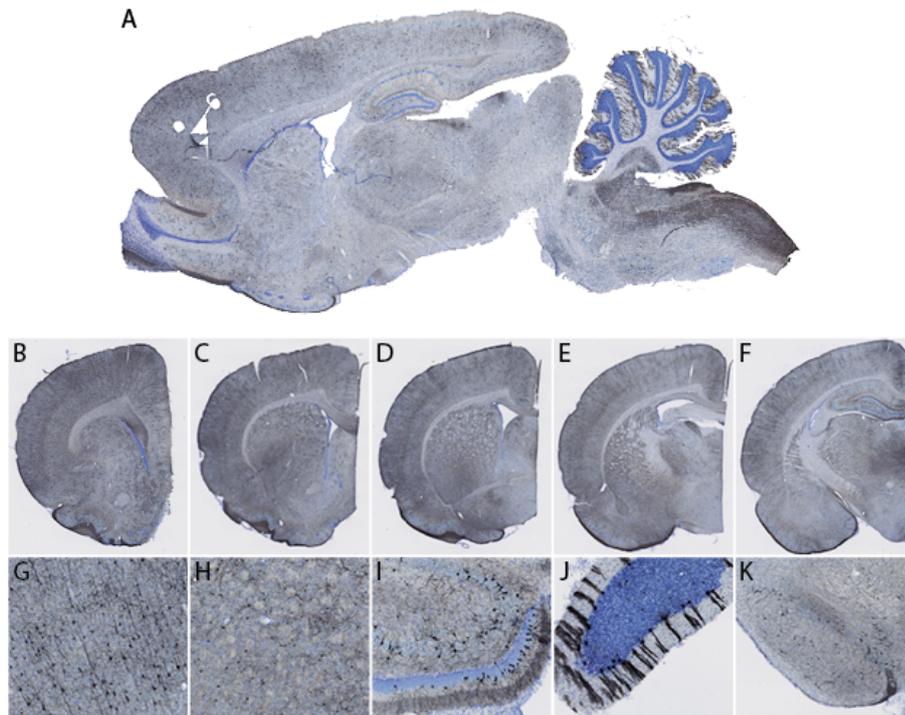


Figure 14. Distribution de l'expression de la GFP après injection intracardiaque d'AAV2/9 GFP chez le rat à J1. (A) Vue sagittale démontrant la transduction cellulaire d'un grand nombre de structures cérébrales. **(B-F)** Images représentatives du marquage rostro-caudal au niveau du striatum. **(G-K)** Images à fort grossissement du marquage GFP dans **(G)** le cortex, **(H)** le striatum, **(I)** l'hippocampe, **(J)** le cervelet et **(K)** la substance noire.

Parmi les cellules transduites, une double immunohistochimie en fluorescence avec des marqueurs neuronaux (NeuN) ou gliaux (protéine acide fibrillaire gliale – GFAP) permet de mettre évidence le tropisme neuronale du virus utilisé malgré l'utilisation d'un promoteur ubiquitaire ici le promoteur du cytomégalo virus CMV (**Figure 15**). Ces résultats sont en concordance avec la littérature montrant un effet important du moment de l'injection sur le tropisme avec une préférence neuronale pour les injections précoces et gliale pour les injections plus tardives (Foust *et al.*, 2009).

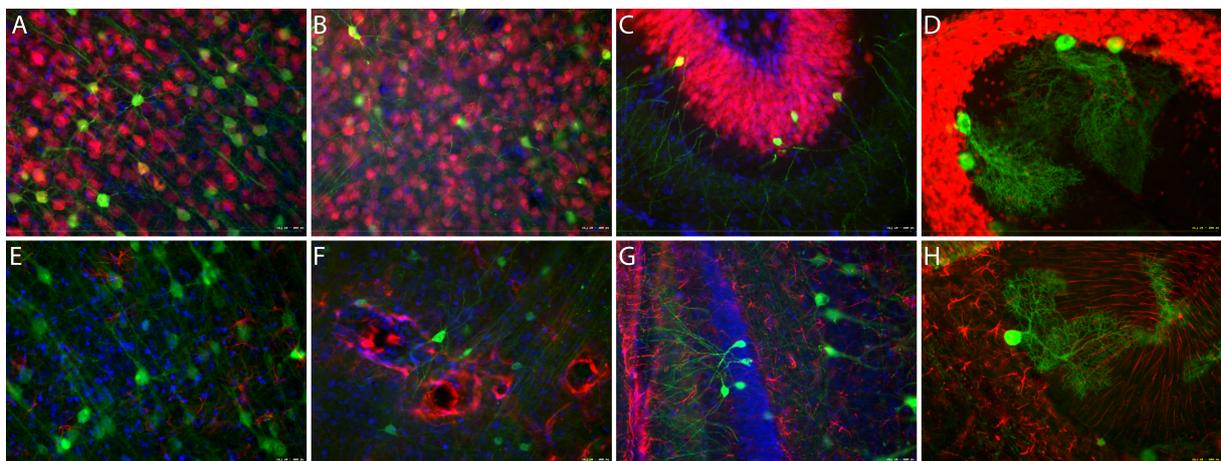


Figure 15. Tropisme préférentiellement neuronal dans différentes structures cérébrales après injection d'AAV2/9 chez le rat à J1. (A-D) Colocalisation du transgène (GFP – en vert) avec un marqueur neuronal (NeuN – en rouge). (E-H) Absence de colocalisation de la GFP avec un marqueur glial (GFAP – en rouge) au niveau cortical (A,E), striatal (B,F), hippocampique (C,G) ou cérébelleux (D,H).

La démonstration de faisabilité obtenue, nous avons cherché à améliorer la transduction. Comme nous l'avons décrit dans un article didactique (Bourdenx *et al.*, 2014c), plusieurs pistes peuvent être envisagées pour augmenter ou spécifier l'expression d'un transgène après infection virale. Parmi les solutions proposées, nous avons choisi ici de nous intéresser aux modifications de la capsid virale. Zhong et collaborateurs ont montré que la mutation des tyrosines de surface de la capsid de l'AAV2 permettait de réduire la phosphorylation, l'ubiquitinylation et la dégradation des particules virales (Zhong *et al.*, 2008). L'introduction des mutations Y445F et Y730F dans la capsid de l'AAV9 a montré chez l'animal une augmentation significative, d'un facteur 5, de la transduction (Dalkara *et al.*, 2012).

Dans la seconde partie de cette étude, nous avons systématiquement analysé la transduction, centrale et périphérique, induite par 4 virus différents exprimant la même cassette. Nous avons utilisé le virus AAV2/9, comme dans la première partie, mais aussi le virus AAV2/rh10 ayant montré une propension équivalente à passer la barrière hémato-encéphalique que le virus AAV2/9 (Zhang *et al.*, 2009). Ces deux pseudotypes ont été utilisés dans leur forme sauvage ou avec une double mutation des tyrosines de surface (constructions 2YF). Pour le AAV2/rh10, les substitutions par des phénylalanines concernent les tyrosines Y447 et Y733. Les immunomarquages contre la GFP montrent, comme nous l'avons vu dans la première partie de l'étude, une transduction préférentielle des structures telles que le cortex, l'hippocampe ou le thalamus (**Figure 16 et 17**). Malgré l'absence de quantification non biaisée de la transduction, l'AAV2/9 sauvage montre le plus grand nombre de cellules transduites dans la majorité des structures étudiées. On peut remarquer la présence de quelques cellules non-neuronales transduites (**Figure 17**). Cette différence avec la première partie de l'étude peut s'expliquer par l'utilisation d'un autre promoteur, ici le promoteur chicken β -actin, par rapport au promoteur du cytomegalovirus dans la première partie.

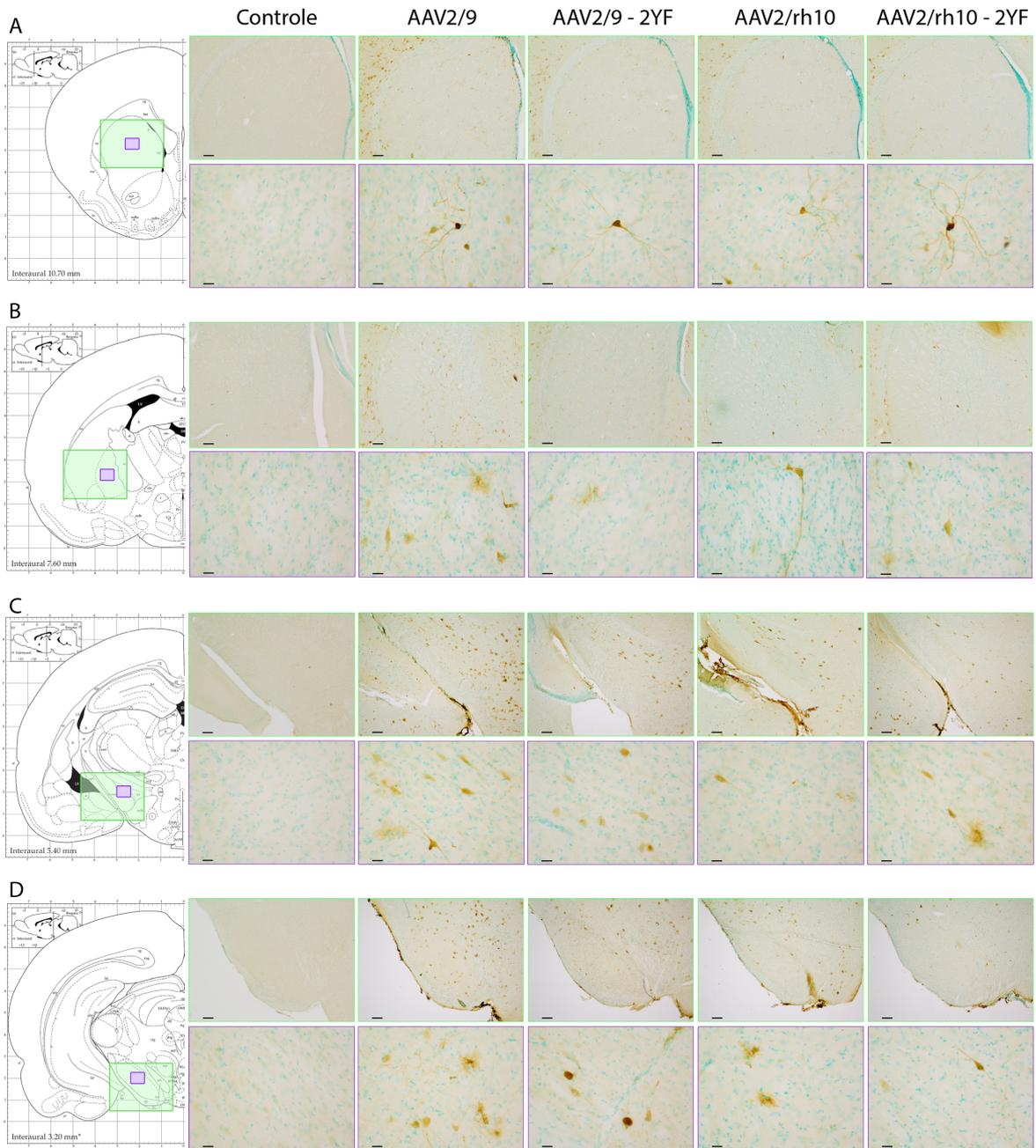


Figure 16. Transduction des structures des ganglions de la base après injection d'AAV2/9, AAV2/9-2YF, AAV2/rh10 ou AAV2/rh10-2YF en intracardiaque chez le rat à J1. Les différents pseudotypes et mutants présentent une affinité pour les structures : (A) Striatum ; (B) *Globus Pallidus* ; (C) Noyau sous-thalamique ; (D) Substance noire. Encadré vert : grossissement x10. Encadré violet : grossissement x40.

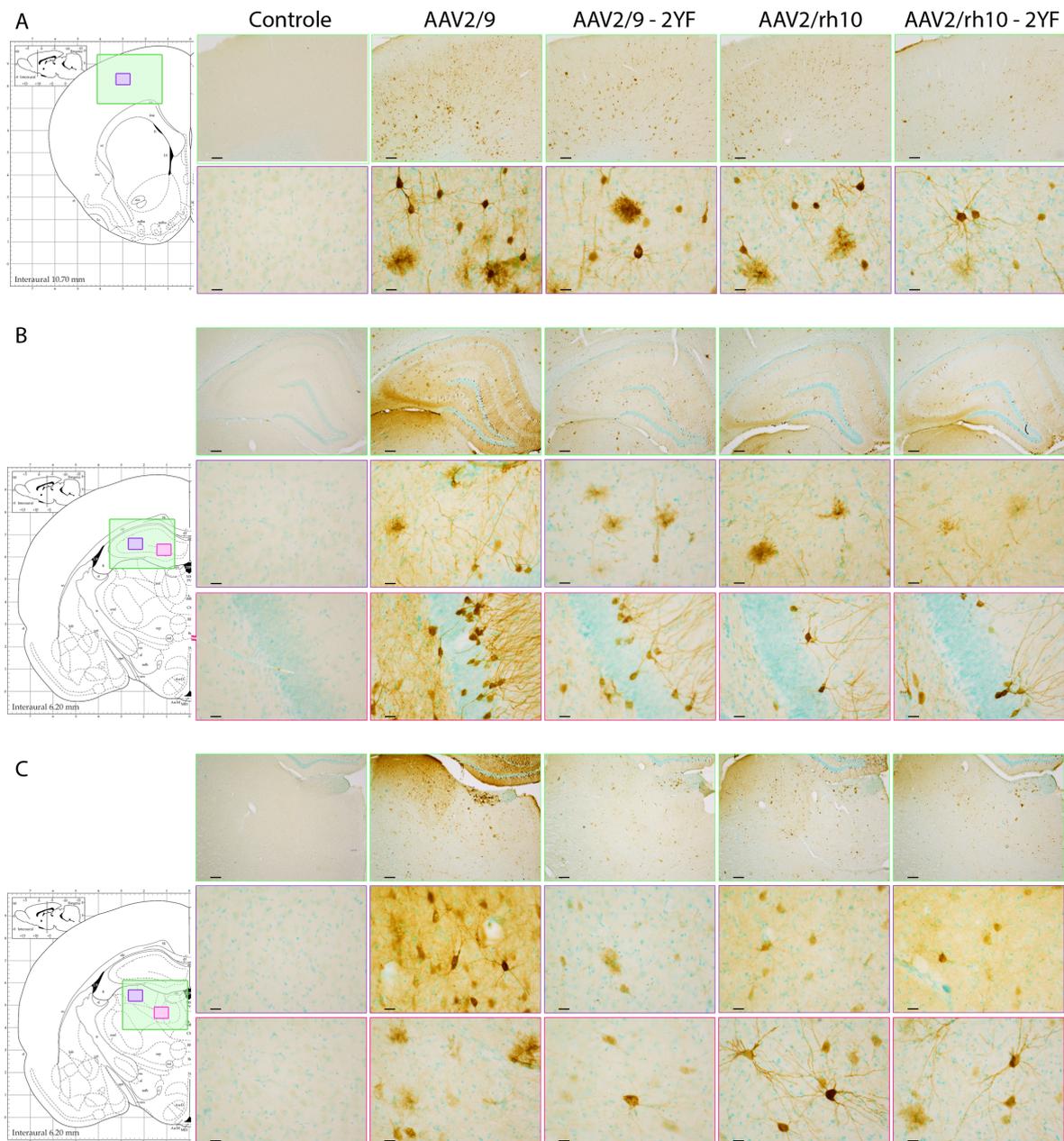


Figure 17. Transduction importante des structures cérébrales, notamment peu profonde, en dehors des ganglions de la base après injection d'AAV2/9, AAV2/9-2YF, AAV2/rh10 ou AAV2/rh10-2YF en intracardiaque chez le rat à J1. (A) Cortex. (B) Hippocampe. (C) Thalamus. Encadrés verts : grossissement x10. Encadrés violets et roses : grossissement x40.

L'analyse de la transduction périphérique montre une transduction dans l'ensemble des structures étudiées (ici cœur, foie et rein) (**Figure 18**). Comme nous pouvions l'attendre, l'organe périphérique le plus transduit est le foie pour lequel les AAV présentent une affinité particulière (Vandenberghe *et al.*, 2009). De façon similaire à ce que nous avons caractérisé précédemment au niveau central, la transduction est équivalente entre les sérotypes et les mutants de capsid (Figure 5).

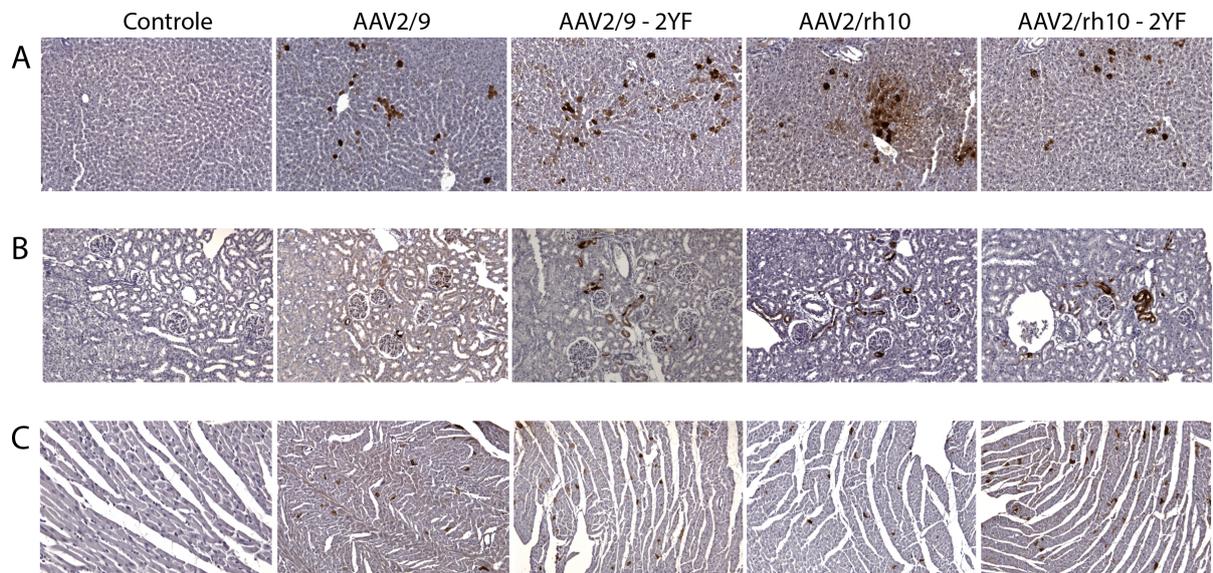


Figure 18. Transduction des organes périphériques après injection d'AAV2/9, AAV2/9-2YF, AAV2/rh10 ou AAV2/rh10-2YF en intracardiaque chez le rat à J1. (A) Le foie présente un marquage important du fait de l'affinité particulière des AAV pour cet organe. (B) Transduction des systèmes tubulaires contournés proximaux et distaux ainsi que des glomérules vasculaires. (C) Transduction équivalente des fibres musculaires cardiaques. Grossissement x10.

**PROJET 3 : DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX MODELES POUR LA MALADIE DE PARKINSON :
INJECTION INTRACEREBROVENTRICULAIRE DE VECTEURS VIRAUX IN UTERO.**

Mathieu Bourdenx^{1,2,†}, Lucie Chansel-Debordeaux^{1,2,†}, Sandra Dovero^{1,2}, Virginie Grouthier^{1,2}, Nathalie Dutheil^{1,2}, Agnès Espagna^{3,4}, Laurent Groc^{3,4}, Clément Jimenez^{1,2}, Erwan Bezar^{1,2,#} and Benjamin Dehay^{1,2,#}.

†,#: Contribution équivalente

Manuscrit en préparation

1. Contexte de l'étude

Les résultats obtenus dans l'expérience précédente ainsi que les données de la littérature suggèrent que la thérapie génique rapidement après la naissance voire même *in utero* pourrait s'avérer intéressante pour le traitement des maladies monogéniques (Mattar *et al.*, 2013; Rahim *et al.*, 2012). De plus, l'absence de modèles animaux valables étant un frein à la recherche de thérapie pour les maladies neurodégénératives, le développement de nouvelles méthodes de transgénèse applicables dans une approche translationnelle apparaît comme particulièrement intéressant.

Le constat selon lequel le tropisme des virus AAV injectés par voie systémique serait initialement neuronal à J1 et deviendrait glial à J10 laisse envisager que plus l'administration se ferait tôt plus la transduction neuronale serait étendue (Foust *et al.*, 2009). À cela s'ajoute le résultat de l'expérience précédente dans laquelle nous observons une transduction préférentielle des structures peu profondes après injection intracardiaque à J1. Nous avons donc choisis ici une approche d'administration *in utero* en intracérébroventriculaire (ICV) de virus AAV chez le rat.

Bien que l'idée d'une administration *in utero* de vecteurs viraux ne soit pas nouvelle *per se* (Walsh and Cepko, 1988), peu d'études se sont intéressées à des vecteurs autres que les rétrovirus et aucune n'a été réalisée chez le rat, espèce de choix en neurosciences (Mattar *et al.*, 2013; Rahim *et al.*, 2012). Chez la souris, l'administration de trois pseudotypes d'AAV (5, 8 et 9) à des titres de l'ordre de $3,5 \times 10^9$ génomes viraux par ml dans le ventricule gauche au 15^{ème} jour de développement *in utero* montre une transduction étendue dans un grand nombre de structures cérébrales avec un tropisme préférentiellement neuronal. Chez le primate, l'administration, en fin de gestation, d'un bolus de virus AAV2/9-GFP dans le canal veineux en continuité de la veine ombilicale induit une transduction forte dans plusieurs structures cérébrales toujours avec un tropisme préférentiellement neuronal (Mattar *et al.*,

2013). Ces résultats expérimentaux laissent envisager une possibilité d'intervention thérapeutique *in utero* pour le traitement des maladies neurologiques non focales (Weinberg *et al.*, 2013).

2. But de l'étude et approches expérimentales utilisées

Dans cette étude, nous avons cherché à mettre en place une méthode de transduction globale du cerveau par l'administration *in utero* d'un bolus de virus AAV injecté en ICV au 16^{ème} jour de développement fœtal. L'étude précédente nous a permis de conclure à l'absence d'avantage des mutants de capsid chez le rat. Nous avons donc choisit d'utiliser le virus AAV2/9 sauvage dans cette étude. Les animaux ont reçu une injection de 1µl de virus AAV2/9 (1.10^{13} génomes viraux par ml) permettant soit l'expression de la GFP soit de l' α -syn humaine avec la mutation Ala53Thr, sous la dépendance des promoteurs CAG et Syn-1 respectivement.

Pour cela, les rattes gestantes ont été anesthésiées (anesthésie gazeuse à l'isoflurane) et placées sur le dos. Une laparotomie médiane est ensuite effectuée afin d'exposer les cornes utérines et de visualiser les sacs gestationnels (**Figure 19**). Le positionnement de l'embryon dans le sac, et plus précisément du cerveau embryonnaire, est étudié par transparence à travers le sac gestationnel. Les virus sont injectés à l'aide d'une pipette en verre. Une fois l'ensemble des sacs injectés, et après réintroduction des cornes utérines en intra-abdominal, l'aponévrose et la paroi cutanée sont suturées. La cicatrisation et l'état clinique des animaux sont vérifiés quotidiennement jusqu'à la mise-bas. Nous avons ensuite procédé à l'analyse *post-mortem* à 1, 3 et 6 mois après la naissance pour caractériser l'éventuelle présence d'une synucléinopathie au niveau cérébral et l'intégrité du système dopaminergiques chez les animaux ayant reçu le virus AAV2/9 permettant l'expression de l' α -syn humaine mutée (AAV2/9-Syn) d'après les mêmes méthodes utilisées que précédemment.

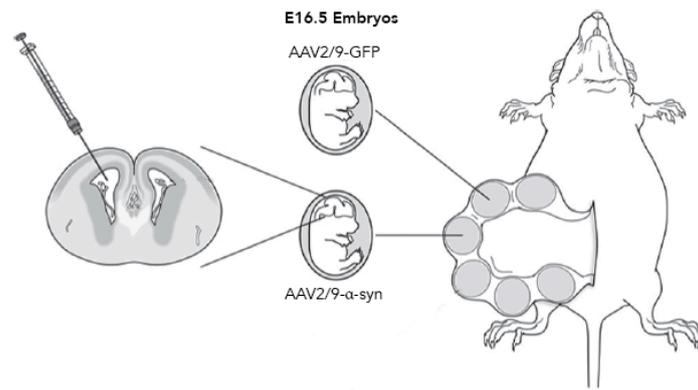


Figure 19. Approche chirurgicale pour l'administration ICV de virus AAV2/9 chez le rat à E16,5 du développement embryonnaire. Adaptée de (Haddad *et al.*, 2013)

3. Résultats préliminaires

L'administration ICV à E16,5 a permis d'aboutir à une transduction importante d'un grand nombre de structures cérébrales 1 mois après la naissance (**Figure 20**). De façon assez similaire à ce que nous avons observé avec l'injection intracardiaque à J1 chez le rat, les structures profondes (striatum, SNpc) apparaissent moins transduites que les structures superficielles (cortex, cervelet, hippocampe) (**Figure 20**). Sur un plan morphologique, bien que qu'une étude de colocalisation avec différents marqueurs cellulaires soit nécessaire, le tropisme apparaît comme préférentiellement neuronal (**Figure 20**).

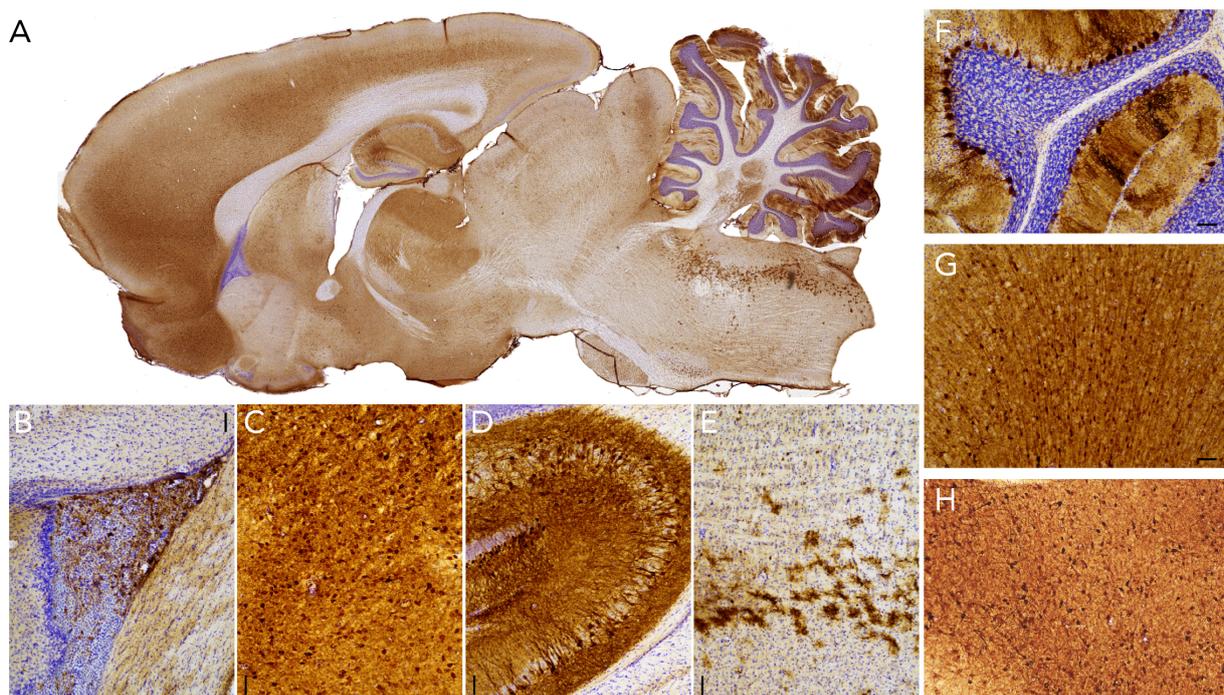


Figure 20. Expression cérébrale étendue de la GFP après injection ICV à E16,5 d'AAV2/9 chez le rat visible 1 mois après la naissance. (A) Coupe sagittale représentative de l'étendue de la transduction. **(B-H)** Images à plus fort grossissement de la transduction au niveau **(B)** des plexus choroïdes, **(C)** du thalamus, **(D)** de l'hippocampe, **(E)** du pons, **(F)** du cervelet, **(G)** du cortex frontal et **(H)** du striatum. Barres d'échelle: **(A)** 5mm, **(B-H)** 250µm.

Nous avons ensuite caractérisé l'existence d'une transduction périphérique (**Figure 21**). Des études précédentes et notamment l'expérience précédente avaient montré la capacité des virus AAV2/9 de traverser la barrière hémato-encéphalique permettant une transduction centrale après injection périphérique. À notre connaissance, aucune étude n'a à ce jour montré un transport une transduction périphérique après administration centrale d'un vecteur viral. Au niveau périphérique, nous avons donc retrouvé une transduction hépatique, musculaire, cardiaque et plus faiblement rénale (**Figure 21**). Nous n'avons toutefois pas retrouvé de transduction gonadique prévenant donc l'établissement d'une lignée transgénique (**Figure 21**). L'étendue et le profil de transduction apparaissent cependant très variable entre les animaux.

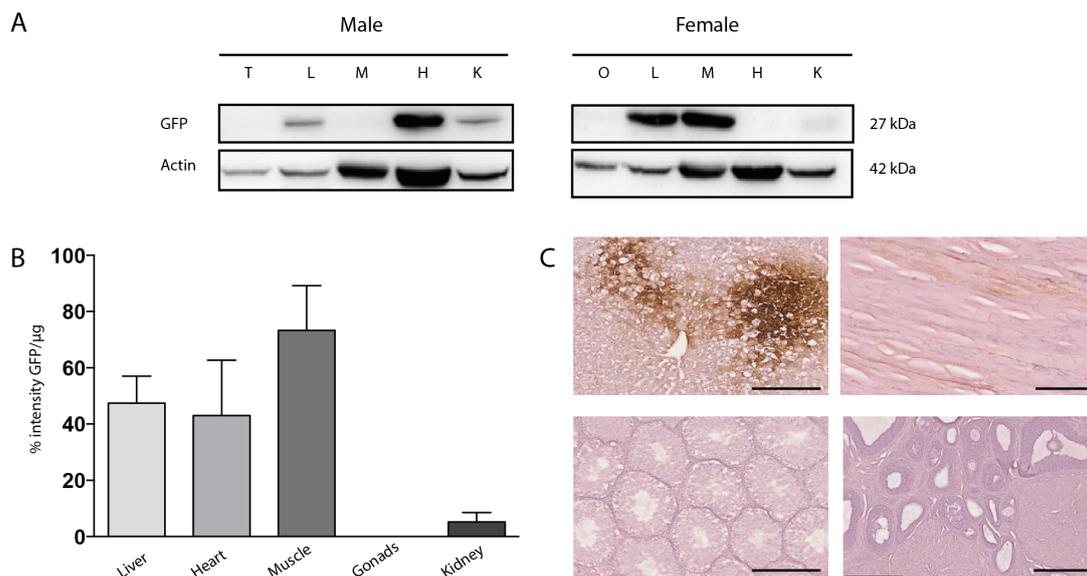


Figure 21. Distribution périphérique de la GFP après injection ICV à E16,5 d'AAV2/9-GFP chez le rat 1 mois après injection. (A) Immunoblots pour la GFP sur les organes périphériques entre les animaux mâles (à gauche) et femelles (à droite). **(B)** Quantification du signal GFP rapporté à la quantité de protéine déposée. **(C)** Images représentatives de l'immunohistochimie contre la GFP au niveau hépatique (en haut à gauche), musculaire (en haut à droite), testiculaire (en bas à gauche) et ovarien (en bas à droite). Barres d'échelle : foie et testicule : 250µm ; musculaire : 100µm ; ovarien : 500µm. Abréviations : T : testicule, L : foie ; M : muscle ; H : cœur ; K : rein ; O : ovaire.

Le suivi longitudinal des animaux à 1, 3 et 6 mois montre une persistance de l'expression de la GFP avec une augmentation progressive du signal mesuré en western-blot (**Figure 22**).

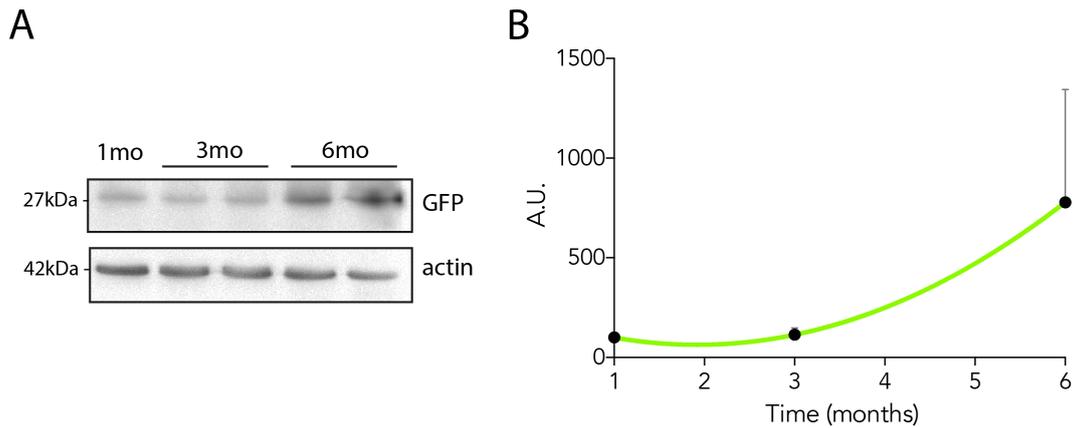


Figure 22. Accumulation corticale du signal obtenu en immunoblot contre la GFP après injection ICV à E16,5 d'AAV2/9 chez le rat. (A) Images représentatives d'immunoblot anti-GFP et anti-actin à partir d'échantillons corticaux d'animaux ayant reçu une injection d'AAV2/9-GFP *in utero*. **(B)** Quantification du signal GFP, normalisé sur l'actin, obtenu en western-blot. La courbe verte est la meilleure approximation de régression non linéaire. Les données sont représentées en moyenne +/- erreur standard. 1,3 ou 6mo : 1,3, ou 6 mois. A.U. : unité arbitraire.

Les animaux ayant reçu le virus AAV2/9-Syn ont été soumis à un suivi longitudinal de l'activité locomotrice par mesure de la motricité spontanée dans des cages d'activités (**Figure 23A**). Les animaux ayant reçu une injection du virus AAV2/9-Syn présente une diminution progressive de l'activité locomotrice non observée chez les animaux ayant reçu le virus GFP. De façon plus surprenante, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'altération de la voie nigrostriée avec une absence de modification de la quantité de protéine TH au niveau striatal en WB (**Figure 23B,C**), ni de diminution du marquage pour la TH au niveau striatal en immunohistochimie (**Figure 23D,E**).

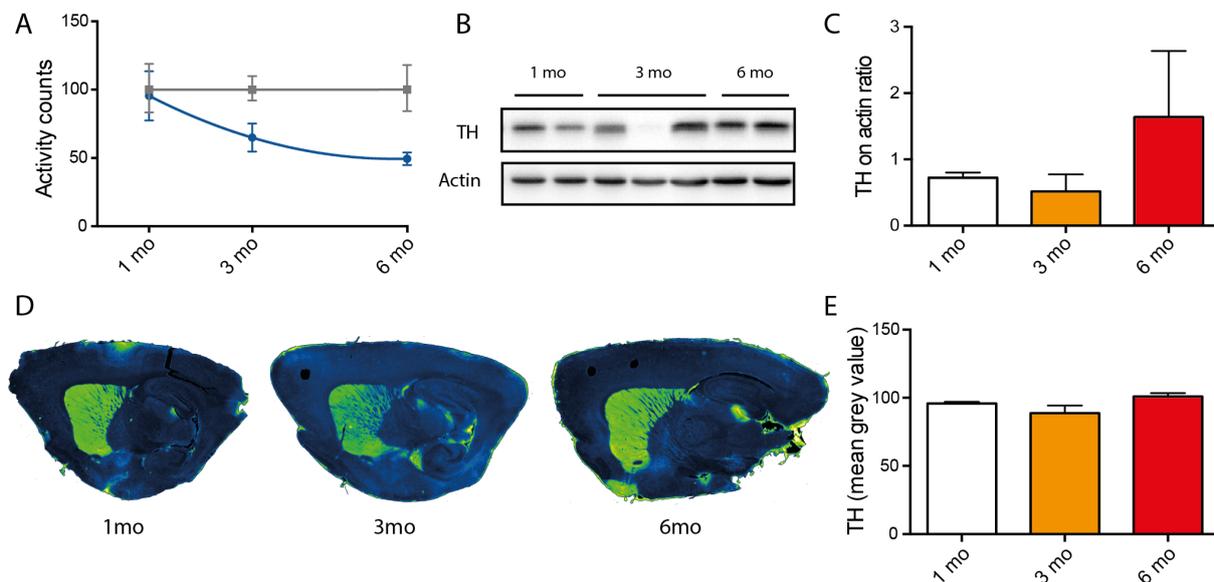


Figure 23. Diminution de l'activité locomotrice spontanée en absence de dégénérescence dopaminergique après injection ICV à E16,5 d'AAV2/9-Syn chez le rat. (A) Évolution de l'activité locomotrice chez les animaux ayant reçu le virus AAV2/9-GFP (courbe grise) ou le virus AAV2/9-Syn (courbe bleue). **(B)** Immunoblot représentatif du signal obtenu pour la TH au niveau mésencéphalique. **(C)** Quantification du signal TH au niveau mésencéphalique. **(D)** Images représentatives de coupes sagittales avec immunomarquage contre la TH. **(E)** Quantification de l'intensité de l'immunomarquage pour la TH au niveau striatal. 1,3 ou 6mo : 1,3, ou 6 mois.

Nous nous sommes ensuite focalisés sur l'existence d'une synucléinopathie associée avec l'expression au long-terme de l' α -syn Ala53Thr après administration *in utero*. Contrairement à ce que nous avons observé pour la GFP (**Figure 22**), l'immunoblot anti- α -syn humaine montre une accumulation d' α -syn après 3 mois mais une tendance à la diminution à 6mois (**Figure 24A,B**). En immunohistochimie, nous retrouvons une transduction importante dans un grand nombre de structures cérébrales avec injection du virus AAV2/9-Syn, comme nous l'avions constaté avec le virus AAV2/9-GFP (**Figure 24C**). À plus fort grossissement, nous constatons une accumulation de marquage contre l' α -syn humaine avec notamment une accumulation de marquage cortical résistant à la dégradation par protéinase K (PK) à 3 mois mais pas à 6 mois (**Figure 24D-S**). Les raisons de cette diminution d'expression à 6 mois restent à ce jour inconnues et des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer s'il s'agit d'une perte d'expression du transgène, d'une dégradation de génome viral sous sa forme épisomique ou d'une réponse cellulaire spécifique à l' α -syn.

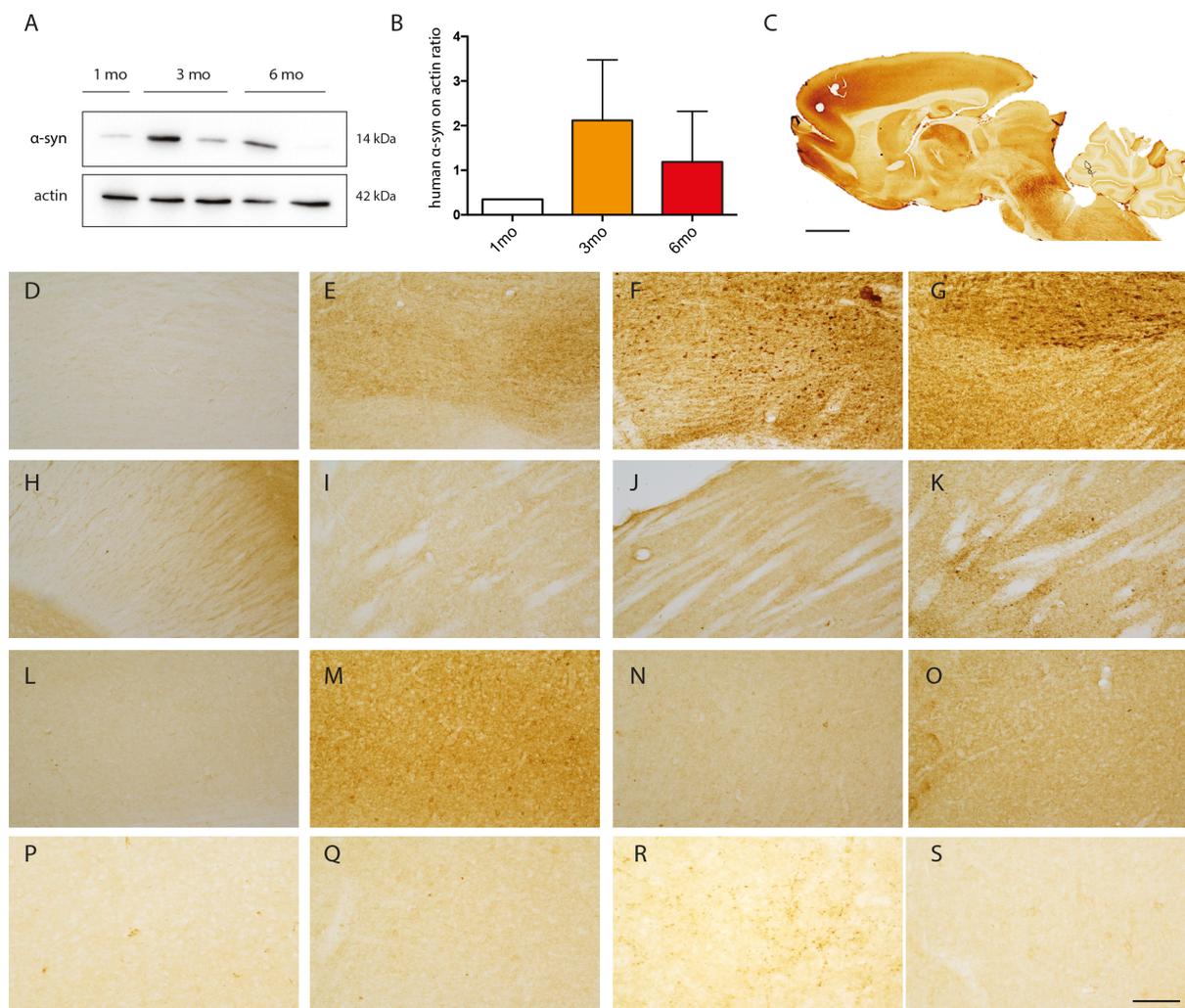


Figure 24. Évolution de l'expression de l' α -syn humaine mutée après injection ICV à E16,5 d'AAV2/9-Syn chez le rat. (A) Images représentatives d'immunoblots contre l' α -syn humaine et l'actin. (B) Quantification du signal obtenu pour l' α -syn humaine normalisé sur le signal obtenu pour l'actine. (C) Coupe sagittale représentative de l'étendue de la transduction visible 1 mois après la naissance. (D-S) Images à fort grossissement de l'immunomarquage contre l' α -syn humaine au niveau (D-G) de la SNpc, (H-K) striatal, (L-O) cortical ou (P-S) cortical après digestion à la PK (1 μ g/ml pendant 10 minutes) pour les animaux ayant reçu le virus AAV2/9-GFP à 1 mois (D,H,L,P) ou ceux ayant reçu le virus AAV2/9-Syn à 1 mois (E,I,M,Q), 3 mois (F,J,N,R) et 6 mois (G,K,O,S). Barres d'échelle : (C) 5mm, (D-S) 250 μ m. 1,3 ou 6mo : 1,3, ou 6 mois.

Un des effets délétères de l' α -syn est l'inhibition des systèmes de dégradation protéique conduisant à l'accumulation de protéines non dégradées (Chu *et al.*, 2009; Cuervo *et al.*, 2004; Dehay *et al.*, 2010). Pour étudier cela, nous avons investigué la présence d'accumulation de protéines polyubiquitinylées. La surexpression de l' α -syn humaine se traduit par une tendance à l'accumulation progressive de protéines polyubiquitinylées au niveau mésencéphalique (Figure 25A,B). Concernant l'ubiquitine monomérique, après 3 mois, les animaux présentent une augmentation significative alors que, comme pour le signal pour l' α -syn, les animaux à 6 mois ne présentent pas de différence par rapport aux animaux contrôles (ayant reçu l'AAV2/9-GFP) (Figure 25A,C).

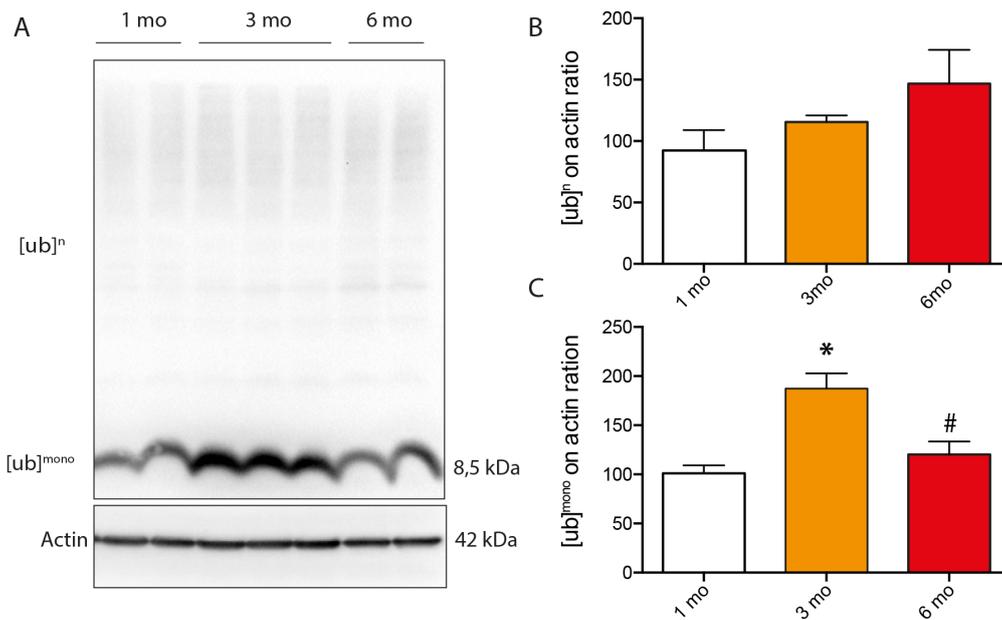


Figure 25. Évaluation de l'existence, à 1, 3 et 6 mois après la naissance, d'une accumulation de protéines ubiquitinylées après injection ICV à E16,5 d'AAV2/9-Syn chez le rat. (A) Image représentative d'un immunoblot contre l'ubiquitine. **(B)** Quantification des protéines polyubiquitinylées. **(C)** Accumulation d'ubiquitine libre à 3 mois mais pas à 6 mois. Analyse par ANOVA une voie suivie d'un test de Bonferroni pour les comparaisons multiples. * $p < 0,05$ par rapport aux animaux à 1 mois. # : $p < 0.05$ par rapport aux animaux à 3mois. 1,3 ou 6mo : 1,3, ou 6 mois.

PARTIE 2. DYSFONCTION LYSOSOMALE DANS LA MALADIE DE PARKINSON : STRATEGIES THERAPEUTIQUES

PROJET 4 : RESTAURATION DE L'ACIDITE DE LYOSOMES DEFICIENTS PAR UTILISATION DE NANOPARTICULES ACIDIFIANTES : IMPLICATION POUR LA MALADIE DE PARKINSON ET AUTRES MALADIES ASSOCIEES A UNE ALTERATION DE L'ACIDIFICATION.

Mathieu Bourdenx^{1,2}, Jonathan Daniel³, Emilie Genin³, Federico N. Soria^{1,2}, Mireille Blanchard-Desce³, Erwan Bezard^{1,2} and Benjamin Dehay^{1,2}

Autophagy (Accepté)

Dans ce second travail, nous nous sommes focalisés sur la restauration d'un pH lysosomal normal ou l'acidification d'un pH anormalement élevé dans trois contextes pathologiques : tout d'abord dans une forme héréditaire de la maladie de Parkinson avec mutation de la protéine ATP13A2 (locus *PARK9*), puis dans un modèle de dysfonctions mitochondriales associées avec la maladie de Parkinson et pour finir dans un modèle de maladie de surcharge lysosomale (myopathie liée à l'X). Une précédente étude du laboratoire a permis de montrer, dans un modèle de fibroblastes de patients parkinsoniens avec une mutation de la protéine ATP13A2 ou dans un modèle de répression de la même protéine dans une lignée de cellules de neuroblastome humain, que la perte de la fonction ou la répression de cette protéine induisait une altération de l'acidification des lysosomes, une accumulation de substrats non-dégradés et une altération de la maturation des protéases lysosomales majoritaires.

De très nombreuses études récentes visent à augmenter ou restaurer les fonctions du système autophagie-lysosome par des traitements pharmacologiques ou par thérapie génique. Nous proposons ici une approche innovante en utilisant des nanoparticules acidifiantes composées de poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA). Dans nos modèles cellulaires (fibroblastes humains d'individus contrôles et de patients porteurs de mutations dans le gène ATP13A2, lignée de cellules de neuroblastome humain avec ou sans répression de la protéine ATP13A2), nous montrons que ces nanoparticules sont importées efficacement dans la cellule et dirigées vers le lysosome. A la suite de cet adressage aux lysosomes, les nanoparticules sont capables de corriger le pH anormalement élevé des lysosomes induits par les mutations d'ATP13A2, par l'utilisation de neurotoxines (1-méthyl-4phénylpyridinium - MPP⁺) ou d'agent lysomotropique (chloroquine) mais aucunement lors de l'utilisation d'inhibiteur de la pompe à protons (Bafilomycin A1) du lysosome. Dans le but de démontrer l'application de cette approche dans le domaine des maladies de surcharge lysosomale, nous avons montré une correction du pH lysosomal dans un modèle de myopathie liée à l'X avec activation excessive de l'autophagie suite à l'utilisation de ces nanoparticules acidifiantes. Enfin, nous démontrons, chez le rongeur, que ces nanoparticules acidifiantes sont capables de protéger les neurones dopaminergiques dans un modèle toxique de la maladie de Parkinson (1-méthyl-4-

phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine - MPTP), et ce par un mécanisme impliquant une protection de l'intégrité des lysosomes.

En conclusion, ce travail démontre, pour la première fois et dans trois contextes pathologiques distincts, que la seule restauration de l'acidité des lysosomes s'avère une piste thérapeutique intéressante. Il reste à ce jour inconnu si la modulation à long terme de voies de signalisations complexes telles que la mTOR est bénéfique ou non chez l'humain. Dans ce contexte, le ciblage spécifique des lysosomes pourrait s'avérer prometteur. Il reste cependant à déterminer l'efficacité de cette stratégie dans d'autres modèles de la maladie de Parkinson.

Mathieu Bourdenx^{1,2}, Sandra Dovéro^{1,2}, Matthieu Bastide^{1,2}, Grégory Porras⁸, Qin Li⁸, Andrea Ballabio^{3,4}, Erwan Bezar^{1,2}, Miquel Vila^{5,6,7} and Benjamin Dehay^{1,2}

1. Contexte de l'étude

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'augmentation des capacités de dégradation des neurones dopaminergiques par l'augmentation de la biogénèse lysosomale comme stratégie thérapeutique dans un modèle rongeur et primate de la maladie de Parkinson. Le modèle que nous avons choisi est le modèle rat caractérisé dans le projet 1 (voir page 52).

La présence d'accumulations intracytoplasmiques de protéines comme le sont les corps de Lewy a rapidement conduit à la formulation de l'hypothèse selon laquelle il y aurait des altérations des systèmes de dégradation des protéines dans la maladie de Parkinson (Levine and Kroemer, 2008). Des résultats expérimentaux ont notamment montré l'effet délétère de l' α -syn humaine mutée ou modifiée par la dopamine sur l'autophagie médiée par les chaperonnes (Cuervo *et al.*, 2004; Martinez-Vicente *et al.*, 2008). Plus récemment, des altérations du système autophagie-lysosome ont été caractérisées dans le cerveau des patients atteints de la maladie de Parkinson et dans plusieurs modèles de la maladie (Chu *et al.*, 2009; Dehay *et al.*, 2010). Dans ce contexte, il apparaît que la restauration de la fonction des lysosomes, comme nous l'avons fait dans le projet précédent, ou l'augmentation conjointe de la biogénèse lysosomale et du flux autophagique serait intéressant dans le cas de la maladie de Parkinson.

Comme je l'ai détaillé dans le chapitre introductif, on distingue classiquement deux systèmes de dégradation des protéines : le système ubiquitine-protéasome et le système autophagie-lysosome. Du fait de l'absence d'activateur pharmacologique direct de la fonction du protéasome et l'intérêt particulier de l'autophagie pour la dégradation des agrégats protéiques, plusieurs études se sont intéressées à l'augmentation de l'autophagie dans le contexte de la maladie de Parkinson (Decressac *et al.*, 2013; Spencer *et al.*, 2009; Xilouri *et al.*, 2013). Ces études ont utilisé soit un facteur initiateur de l'autophagie (Beclin-1) (Spencer *et al.*, 2009), soit un composant essentiel de la voie de l'autophagie médiée par les chaperonnes (Xilouri *et al.*, 2013) ou un facteur de transcription régulant à la fois le flux autophagique et la biogénèse lysosomale (facteur de transcription EB – TFEB) (Decressac *et al.*, 2013).

TFEB apparaît comme un choix particulièrement intéressant d'un point de vue thérapeutique du fait de son rôle central dans l'activation de l'autophagie et de la biogénèse lysosomale. Initialement, TFEB a été identifié comme un facteur de transcription coordonnant l'expression d'un ensemble de gènes appelé réseau CLEAR (Coordinated Lysosomal Expression and Regulation) (Sardiello *et al.*, 2009). Il a ensuite été montré que lors de sa translocation dans le noyau, TFEB contrôlait aussi plusieurs étapes clés de l'autophagie telles que la formation des autophagosomes, la fusion autophagosome-lysosome et leur dégradation, par un mécanisme dépendant de l'inhibition de la voie des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) (Settembre *et al.*, 2011). Dans cette étude, nous avons choisi de tester l'efficacité de la surexpression virale de TFEB dans une approche translationnelle.

2. But de l'étude et approches expérimentales utilisées

Dans cette étude, nous avons cherché à établir l'efficacité de la surexpression virale de TFEB dans un modèle de surexpression virale de l' α -syn humaine avec la mutation Ala53Thr avec une approche translationnelle dans un modèle rongeur puis chez le primate non humain. Nous avons ici choisi d'utiliser la forme mutée Ala53Thr de l' α -syn car cette mutation provoque une dysfonction de la CMA par blocage du transporteur LAMP2a (Cuervo *et al.*, 2004). L'issue de ce projet permettra non seulement de valider l'augmentation conjointe de l'autophagie et de la biogénèse lysosomale comme piste thérapeutique pour la maladie de Parkinson mais aussi d'établir l'existence ou non d'une toxicité induite par l'activation au long-terme de l'autophagie chez le primate non-humain. En effet, les conséquences de l'augmentation au long-terme de l'autophagie restent inconnues et nécessitent une investigation chez le primate étant donné que cette fonction peut influencer sur le devenir cellulaire en activant des mécanismes de survie ou déclencher la mort cellulaire (Eskelinen, 2005).

Nous avons ici injecté une ou deux constructions virales soit individuellement soit conjointement dans la SNpc (2 sites d'injection par hémisphère – injection unilatérale chez le rat et bilatérale chez le primate). Le **Tableau 4** récapitule le détail de ces constructions.

	Nom	Sérotipe	Cassette	Titre viral
Rongeur (n=32)	A53T	AAV2/9	CMVieSynapsin-SYNA53T- WPRE	3.10 ¹² vg/ml
	TFEB	AAV2/9	CMV-mTFEB-3xFLAG-WPRE	3.10 ¹² vg/ml
Primate (n=11)	A53T	AAV2/9	Syn-1-SYNA53T-WPRE	1.10 ¹² vg/ml
	TFEB	AAV2/9	CMV-hTFEB-WPRE	1.10 ¹² vg/ml

Tableau 4. Détail des constructions virales utilisées chez le rongeur et le primate non-humain. Syn-1 : promoteur de la Synapsin. SYNA53T : α -syn humaine avec mutation Ala53Thr. WPRE : woodshock hepatitis virus posttranscriptional regulatory element. CMV : promoteur du CMV. mTFEB : séquence murine de TFEB. 3xFLAG : tag FLAG. hTFEB : séquence humaine de TFEB.

Les animaux sont sacrifiés 4 mois après la chirurgie avec une évaluation comportementale la veille du sacrifice (**Figure 26**). Les rats sont soumis au test du cylindre, permettant de mesurer l'asymétrie d'utilisation des pattes antérieures, ainsi que le test des rotations induites par l'amphétamine (Decressac *et al.*, 2013). Les singes sont quant à eux placés et filmés en cage d'observation pendant 2 heures puis leur motricité est évaluée selon une échelle adaptée par un observateur en aveugle comme précédemment publié par le laboratoire (Engeln *et al.*, 2014). Les animaux sont ensuite sacrifiés pour effectuer une évaluation de l'intégrité du système dopaminergique et l'étendue de la synucléinopathie.

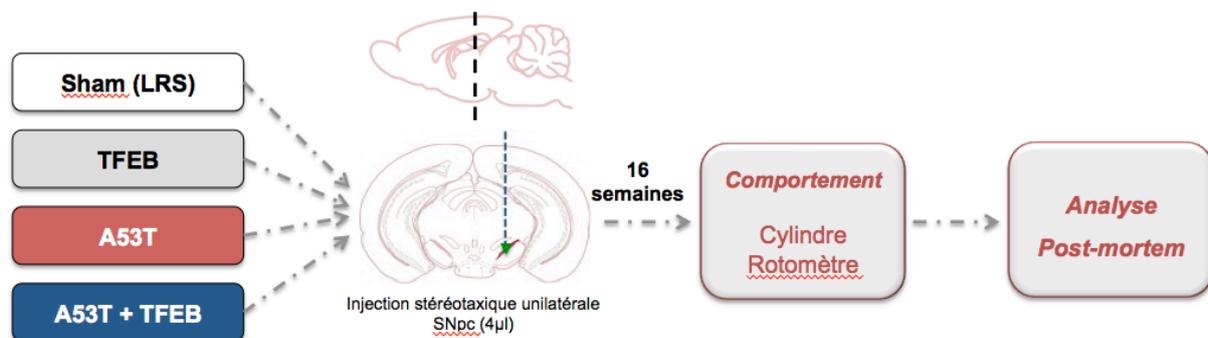


Figure 26. Design expérimental du projet chez le rat. Les animaux reçoivent par injection unilatérale intranigrale d'un des mélanges de virus. Seize semaines après chirurgie les animaux sont soumis à une évaluation comportementale avant sacrifice.

3. Résultats préliminaires

Tout d'abord, nous avons vérifié l'efficacité des constructions *in vitro* dans une lignée de neuroblastomes dopaminergiques humains (cellules BE(2)-M17). Comme attendu, la

transfection transitoire de TFEB induit une augmentation significative de la quantité d'autophagosomes illustrée par l'augmentation de la quantité de la protéine microtubule associated protein light-chain 3 (LC3)-II (**Figure 27A**). De plus, la surexpression de TFEB induit une augmentation de la quantité de lysosomes comme le montre l'augmentation du signal d'un composé fluorescent marquant spécifiquement les lysosomes (LysoTracker) mesuré par cytométrie de flux (**Figure 27B**).

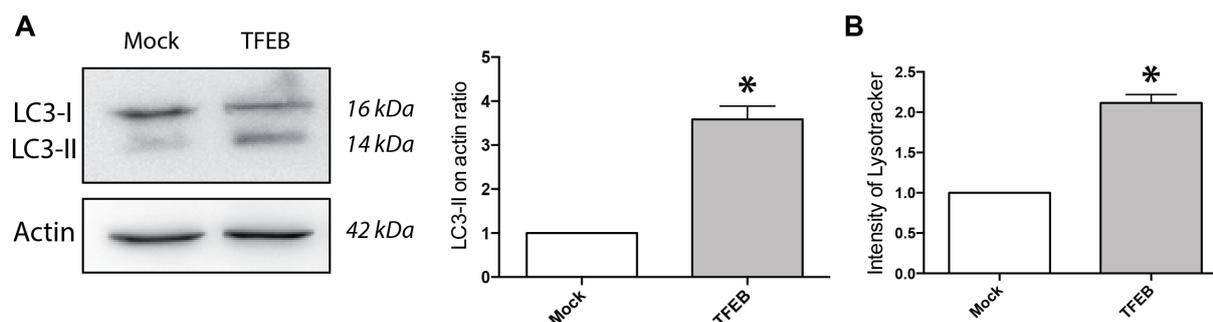


Figure 27. Efficacité de la construction *in vitro* sur des neuroblastomes dopaminergiques humains. (A) Image représentative d'un immunoblot contre la protéine LC3-II et la quantification associée. (B) Augmentation de l'intensité de fluorescence émise par le LysoTracker quantifiée par cytométrie de flux. * : $p < 0.05$ t-test non apparié. Quantifications réalisées sur 3 essais indépendants.

L'analyse comportementale à 4 mois après la chirurgie montre une altération comportementale chez les animaux injectés avec le virus A53T, non observée lors de l'injection conjointe des deux virus (A53T+TFEB) (**Figure 28**). L'injection du virus A53T dans l'hémisphère droit se traduit par une diminution de l'utilisation de la patte gauche lors des appuis sur la paroi lors des redressements dans le test du cylindre (**Figure 28A**). L'ajout de TFEB permet de restaurer une utilisation normale des pattes antérieures. L'injection du virus A53T se traduit par un hypodopaminergie ipsilatérale mise en évidence par l'injection i.p. d'apomorphine (un agoniste des récepteurs dopaminergiques à la dose de 1mg/kg) induisant des rotations ipsilatérales (**Figure 28B**). La co-injection avec le virus TFEB permet de normaliser se comportement.

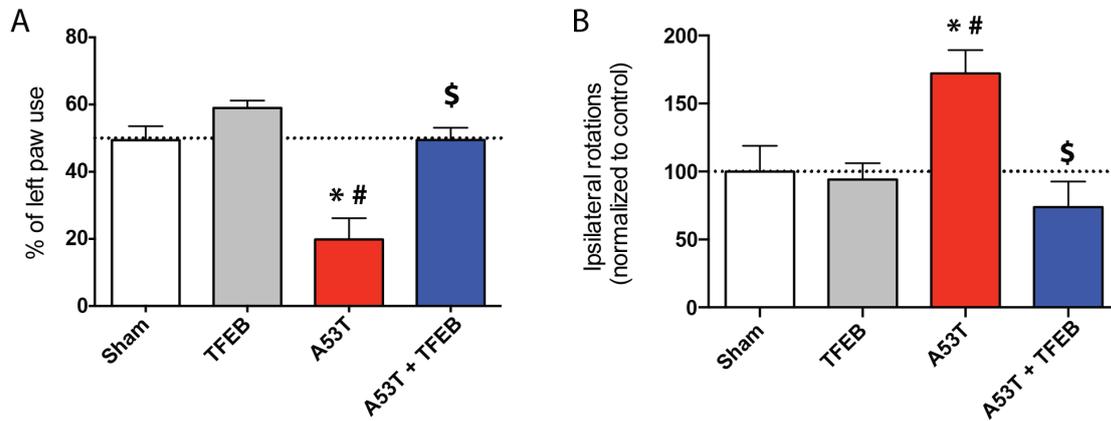


Figure 28. Altérations comportementales induites par la surexpression de l' α -syn humaine mutée, contrecarrées par la co-surexpression de TFEB. (A) Le test du cylindre montre une diminution d'utilisation de la patte gauche normalisée par l'ajout de TFEB. (B) L'injection d'apomorphine induit des rotations ipsilatérales par rapport à la lésion chez les animaux avec surexpression de l' α -syn mais pas dans les autres groupes expérimentaux. ANOVA une voie avec test de Bonferroni pour les comparaisons multiples. *: $p < 0.05$ Sham VS A53T. #: $p < 0.05$ TFEB vs A53T. \$: $p < 0.05$ A53T vs A53T+TFEB.

Les études post-mortem des cerveaux des animaux ont tout d'abord permis de confirmer l'importante transduction des neurones dopaminergiques par les deux constructions virales (Figure 29).

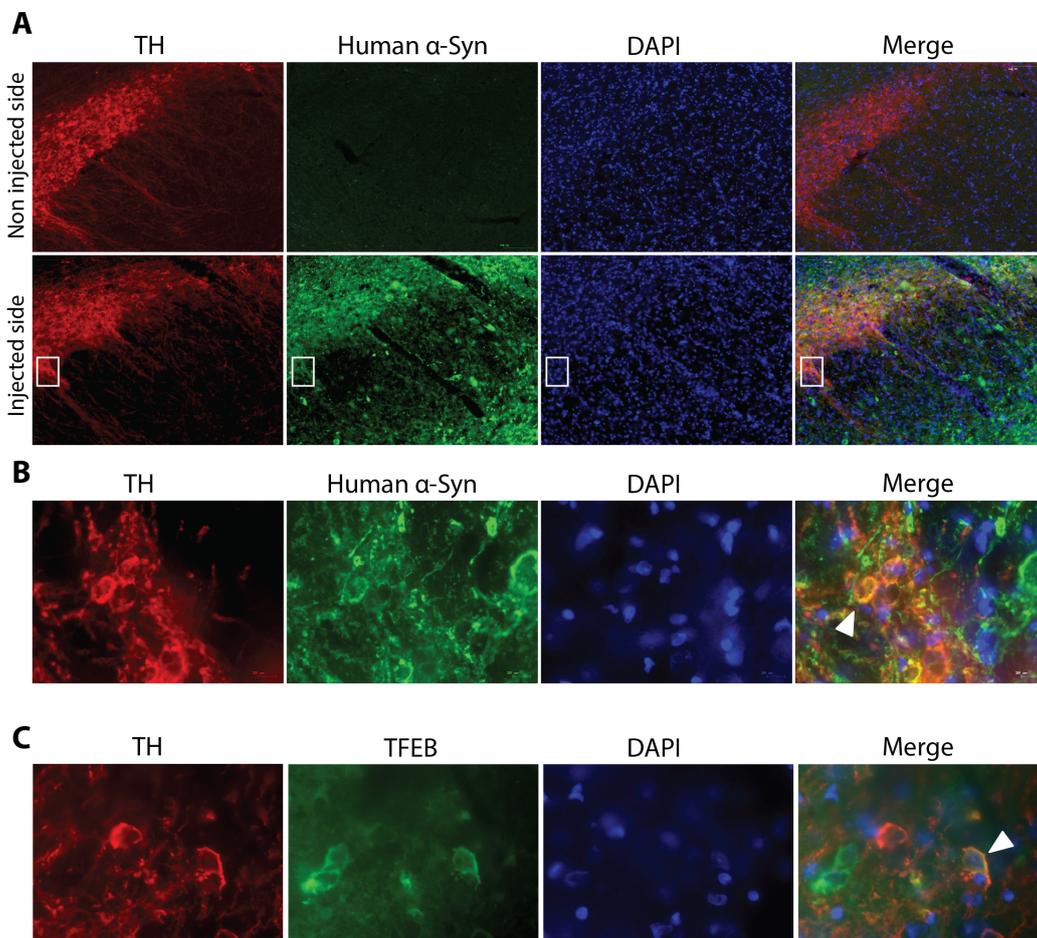


Figure 29. Surexpression virale de l' α -syn humaine et de TFEB dans les neurones dopaminergiques au niveau de la SNpc. (A,B) Présence d'un marquage pour l' α -syn humaine (vert) uniquement du côté injecté et colocalisation avec la TH (rouge). (A) Grossissement x5. (B) Grossissement x63. (C) Colocalisation de TFEB (vert – immunomarquage contre le tag FLAG) avec la TH (rouge). Grossissement x63.

Puis, nous avons étudié l'intégrité du système dopaminergique par la quantification des fibres dopaminergiques au niveau striatal et la quantification du nombre de corps cellulaires positif pour l'immunomarquage à la tyrosine hydroxylase (une enzyme de synthèse des neurones dopaminergiques – TH) au niveau de la SNpc (**Figure 30**). L'injection du virus A53T induit, après 4 mois, une diminution de l'ordre de 60% du marquage pour les fibres dopaminergiques (**Figure 30A,B**) et de l'ordre de 40% du nombre de neurones dopaminergiques dans la SNpc (**Figure 30C,D**). La surexpression conjointe de TFEB permet de protéger à la fois les fibres dopaminergiques au niveau striatal (**Figure 30A,B**) mais aussi les corps cellulaires dopaminergique au niveau mésencéphalique (**Figure 30C,D**).

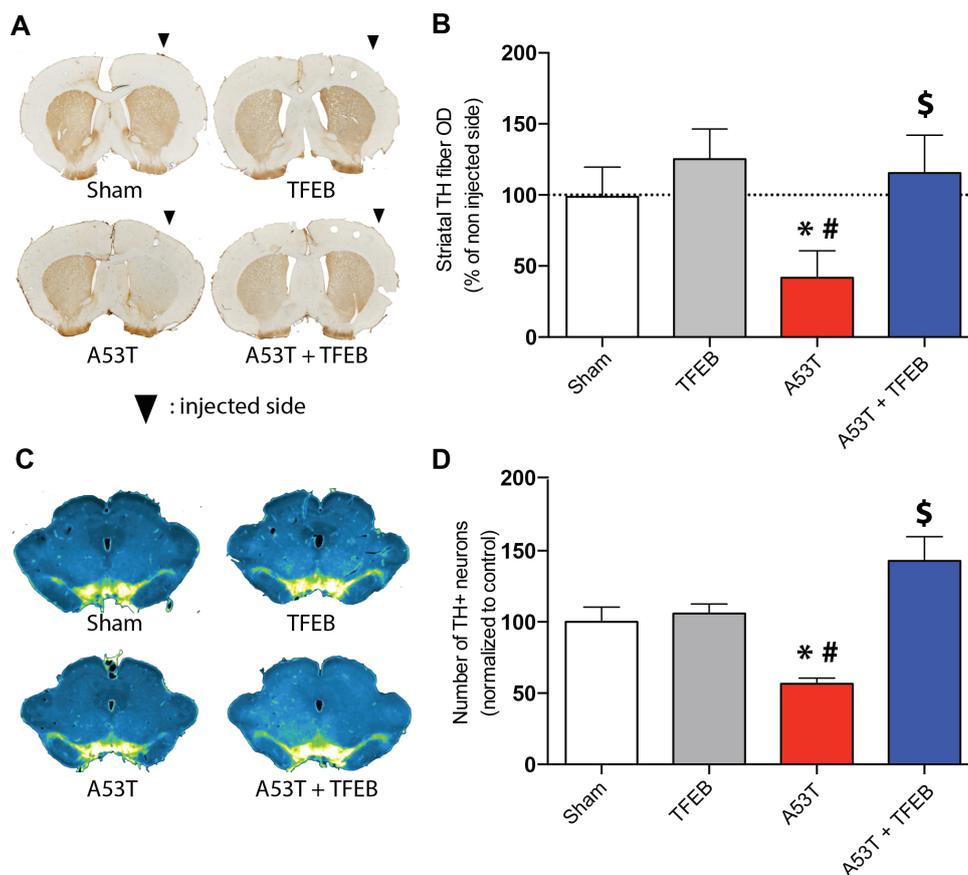


Figure 30. TFEB protège le système dopaminergique nigrostrié de la toxicité induite par la surexpression de l' α -syn humaine mutée. (A) Images représentatives du marquage pour la TH obtenu au niveau striatal. (B) La quantification, en niveau de gris, de l'intensité du marquage TH au niveau striatal montre une perte du marquage pour les animaux A53T mais restauré par l'injection de TFEB. (C) Images représentatives du marquage TH obtenu au niveau de mésencéphale. (D)

Quantification par stéréologie non biaisée du nombre de neurones immunopositifs pour la TH dans la structure d'intérêt. Le comptage illustre une perte de l'ordre de 40% du nombre de neurones immunopositifs pour la TH. Analyse par ANOVA une voie et test de Bonferroni pour les comparaisons multiples. * : $p < 0.01$ Sham VS A53T. # : $p < 0.01$ TFEB vs A53T. \$: $p < 0.01$ A53T vs A53T+TFEB.

Concernant la synucléinopathie associée avec ce modèle, nous avons choisi un protocole d'extraction similaire à ceux retrouvés dans la littérature (Waxman and Giasson, 2008) basé sur l'utilisation consécutive de tampon ayant un pouvoir détergent de plus en plus stringent (tampon salin, puis RIPA et 2%SDS/8M Urée pour finir). Ce protocole nous a permis de caractériser au niveau striatal et mésencéphalique la présence d' α -syn soluble mais aussi dans un forme agrégée RIPA insoluble/Urée soluble induite par le virus A53T (**Figure 31**). La co-injection avec le virus TFEB montre une diminution significative de la quantité d' α -syn humaine dans toutes les étapes du protocole d'extraction (**Figure 31**).

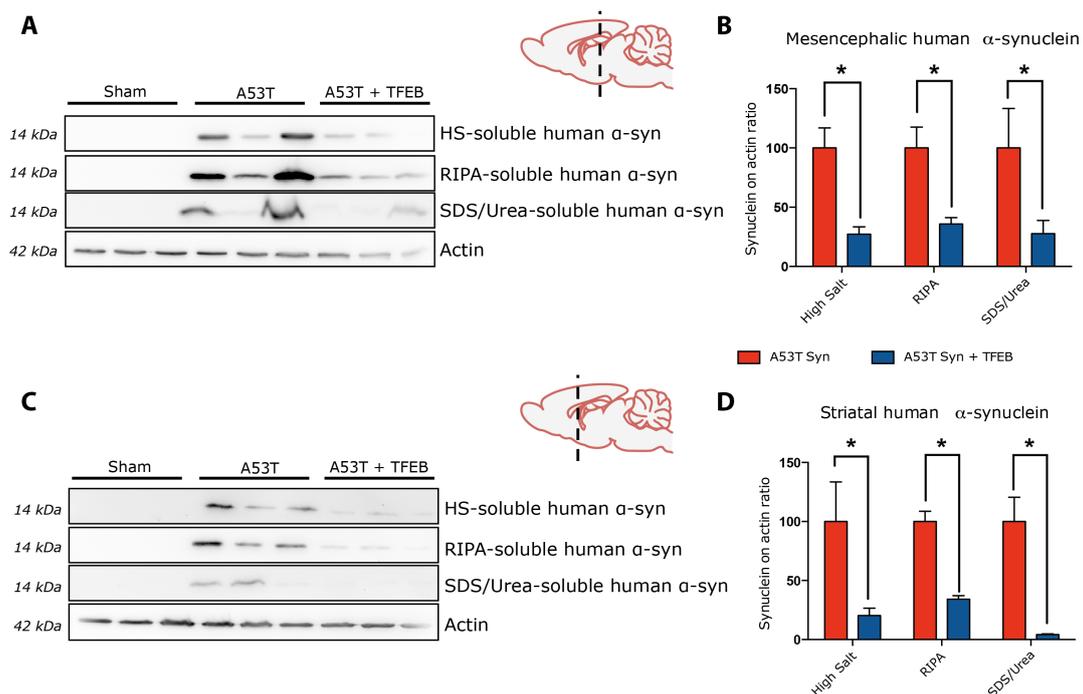


Figure 31. TFEB diminue la quantité d' α -syn humaine soluble dans un tampon salin, RIPA ou 2%SDS/8M Urée. (A) Immunoblots représentatifs pour l' α -syn humaine en fonction du tampon d'extraction utilisé au niveau striatal. (B) La quantification de l' α -syn humaine au niveau striatal montre une diminution du signal avec toutes les méthodes d'extraction. (C) Immunoblots représentatifs pour l' α -syn humaine en fonction du tampon d'extraction utilisé au niveau mésencéphalique. (D) La quantification de l' α -syn humaine au niveau mésencéphalique montre une diminution du signal avec toutes les méthodes d'extraction. $n=3$ animaux par conditions. Analyse ANOVA à deux voies suivie d'un test de Bonferroni pour les comparaisons multiples. * $p < 0.05$ A53T vs A53T+TFEB.

L'analyse en immunohistochimie nous permet d'observer la présence d' α -syn humaine au niveau mésencéphalique uniquement dans les animaux injectés A53T. En cohérence avec les résultats biochimiques précédents, l'ajout de TFEB permet une diminution significative de l'immunoréactivité pour l' α -syn humaine (**Figure 32A-D**). De façon similaire, l'injection de TFEB permet de diminuer fortement la présence d' α -syn pathologique dans sa forme phosphorylée en Ser129 (**Figure 32E**). Il est intéressant de remarquer que contrairement au signal obtenu lors de l'immunomarquage contre l' α -syn native qui se retrouve largement dans le mésencéphale et notamment dans la substance noire réticulée, le marquage pour la forme phosphorylée de l' α -syn apparaît concentré dans la SNpc (**Figure 32E**).

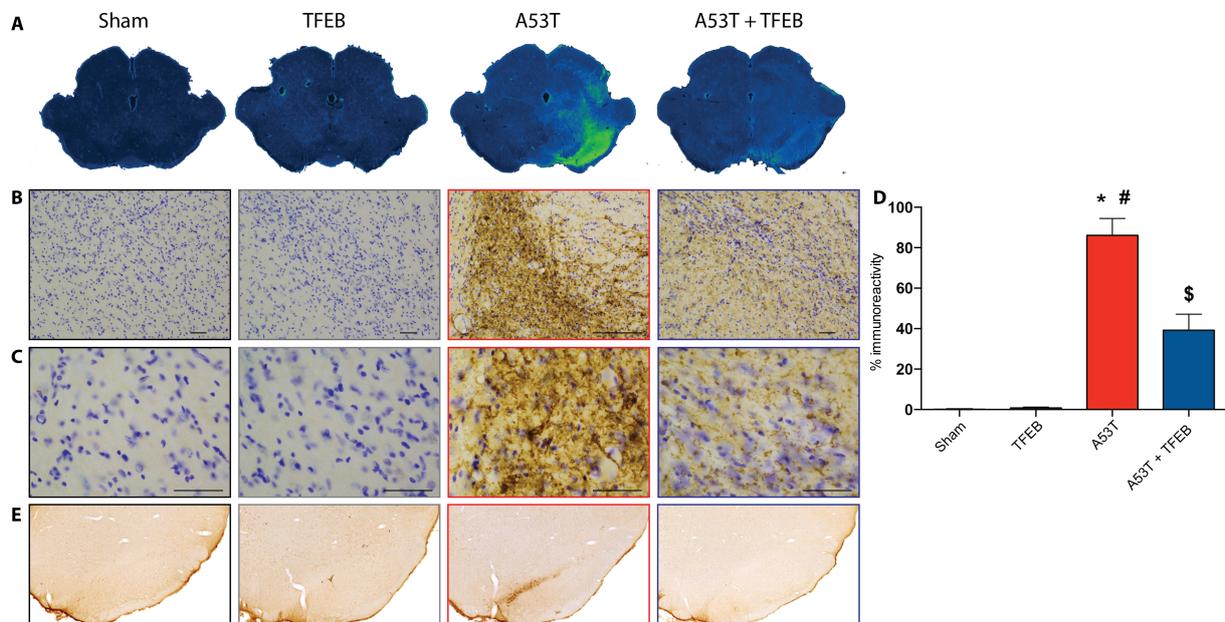


Figure 32. TFEB diminue la quantité d' α -syn au niveau mésencéphalique dans sa forme native et phosphorylée en Ser129. (A-C) Images représentatives de l'immunomarquage pour l' α -syn humaine (A) en pseudocouleur, (B) à faible grossissement x5 et (C) à fort grossissement x20. (D) Quantification volumique de l' α -syn humaine dans la SNpc. Analyse par ANOVA une voie et test de Bonferroni pour les comparaisons multiples. * : $p < 0.01$ Sham VS A53T. # : $p < 0.01$ TFEB vs A53T. \$: $p < 0.01$ A53T vs A53T+TFEB. (E) Images représentatives du marquage l' α -syn phosphorylée dans les différentes conditions expérimentales.

Chez le primate, nous avons utilisé le même modèle que dans le projet 1 mais cette fois ci chez le macaque cynomolgus (*Macaca fascicularis*) et non chez le marmoset (*Callithrix jacchus*). Le protocole est donc sensiblement différent, les animaux ont reçu un total de 20 μ l de virus par hémisphère en deux sites au niveau de la SNpc (AC -7, D - 4 et L +/- 3 ; AC - 8 ; D -5 and L +/- 4). Les animaux ont été sacrifiés quatre mois après l'injection et ont été placés en cage individuelle pour observation la veille du sacrifice.

L'analyse comportementale ne montre pas de diminution de l'activité locomotrice chez les animaux injectés seulement avec le virus A53T et n'est donc pas présenté ici. Sur un plan histologique, 4 mois après injection des vecteurs viraux, nous n'avons pas pu mettre en évidence de dégénérescence du système dopaminergique nigrostrié que ce soit au niveau des corps cellulaires (**Figure 33A,B**) ou des terminaisons dopaminergiques striatales (**Figure 33C,D**).

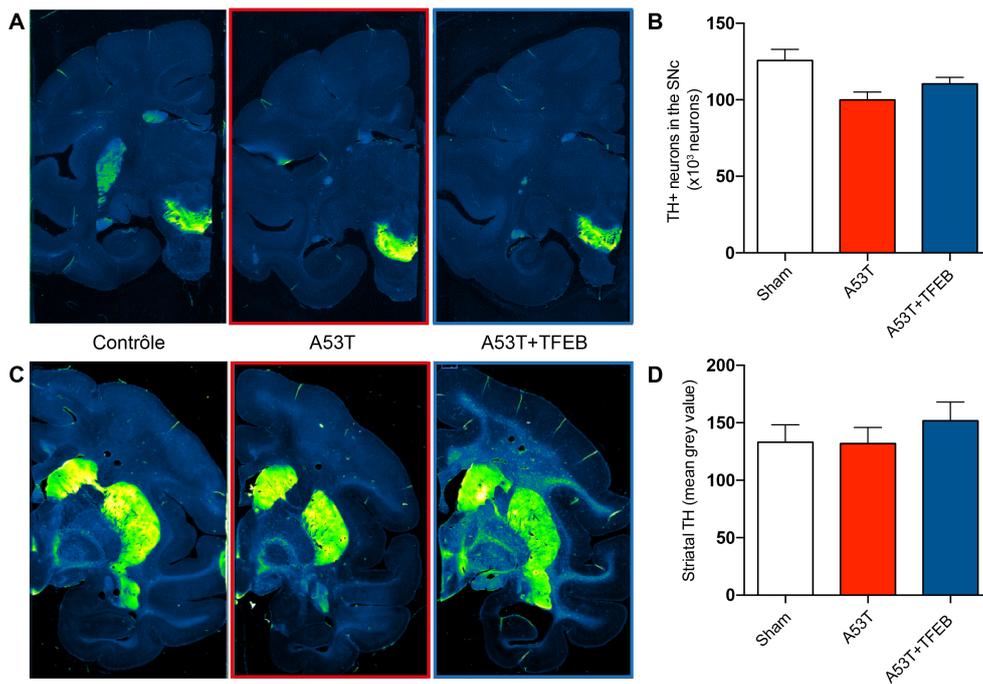


Figure 33. Absence de dégénérescence dopaminergique chez le primate non-humain, 4 mois après injection intranigrale d'AAV2/9-A53T. (A) Images représentatives du marquage pour la TH au niveau nigral pour les 3 groupes expérimentaux. (B) Quantification par stéréologie non-biaisée du nombre de cellules immunopositives pour la TH au niveau de la SN. (C) Images représentatives du marquage de TH au niveau du striatum pour les 3 groupes expérimentaux. (D) Quantification en niveaux de gris de l'intensité de marquage TH.

De façon surprenante, nous n'avons pas non plus pu mettre en évidence la surexpression de l' α -syn au niveau de la SN ou du striatum (**Figure 34**). Les raisons de cette absence d'expression de notre vecteur virale, validée chez le rat, restent pour le moment inconnues. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour définir s'il s'agit d'un problème d'expression du transgène ou d'une résistance du modèle AAV2/9-A53T chez le macaque. Nous n'avons pas pu encore confirmer la présence du transgène TFEB étant donné que jusqu'à très récemment il n'existait pas d'anticorps compatibles avec les études sur tissus fixés, nous sommes maintenant en cours de validation de ces anticorps. L'étude de marqueurs de la voie autophagique nous donnera cependant une vision indirecte de la surexpression.

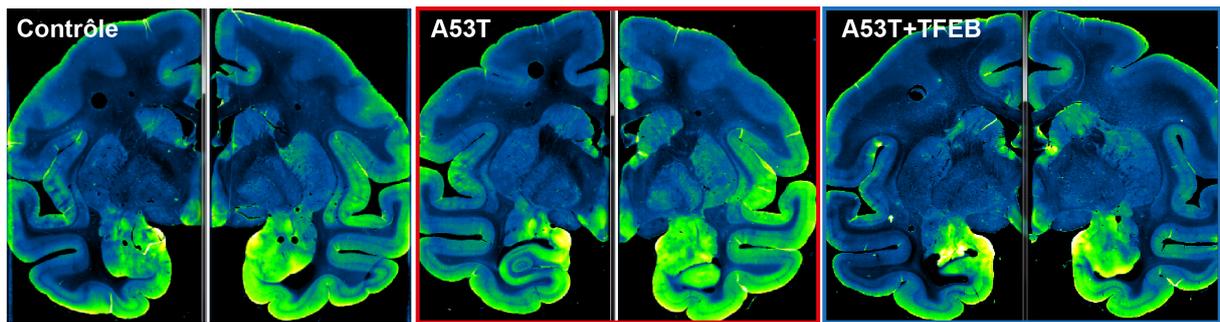


Figure 34. Absence de détection de la surexpression d' α -syn au niveau du striatum, 4 mois après injection intranigrale d'AAV2/9-A53T. Images représentatives des deux hémisphères pour un animal des 3 groupes expérimentaux.

**PARTIE 3. HYPOTHESE « PRION » POUR LES
SYNUCLEINOPATHIES : MODELISATION ET APPROCHE
THERAPEUTIQUE.**

1. Contexte de l'étude

Comme je l'ai détaillé en introduction, l' α -syn est maintenant considérée comme un acteur central dans l'étiologie de la maladie de Parkinson. Au cours des 7 dernières années, depuis la formulation de l'hypothèse « prion », de nombreuses études ont permis d'établir que l'injection, intracérébrale ou périphérique, chez l'animal, d'agrégats d' α -syn permettait d'initier une cascade d'événements délétères conduisant à la neurodégénérescence des neurones dopaminergiques associées avec le développement d'une synucléinopathie se propageant dans des structures interconnectées (Holmqvist *et al.*, 2014; Luk *et al.*, 2012b; Masuda-Suzukake *et al.*, 2013; Mougnot *et al.*, 2012; Prusiner *et al.*, 2015; Recasens *et al.*, 2014; Sacino *et al.*, 2014a; Sacino *et al.*, 2014b; Watts *et al.*, 2013). Alors que la grande majorité des études ont utilisé des agrégats d' α -syn synthétisés et agrégés *in vitro*, nous avons proposé que les espèces agrégées d' α -syn présentent dans le cerveau des patients possédaient des spécificités à ce jour non répliquées par les protéines recombinantes (Recasens *et al.*, 2014). Dans une première étude du laboratoire, la preuve du concept a été apportée chez la souris et chez le primate non-humain. Cette étude a permis d'établir notamment une toxicité accrue des inocula provenant des patients avec une dose environ 10 000 fois plus faible par rapport aux agrégats de protéines recombinantes, bien que la comparaison directe n'ait pas été faite (Recasens *et al.*, 2014). Cette étude *princeps* n'a été réalisée que chez un très faible nombre de primates (n=1 par condition), nous avons ici choisi de mener une étude à plus large échelle chez le babouin (*Papio papio* et *Papio anubis* – n=50).

2. But de l'étude et approches expérimentales utilisées

Cette étude propose un suivi longitudinal dans une grande cohorte de primates afin de tenter d'établir :

- la cinétique d'agrégation et de toxicité de plusieurs espèces biochimiques d' α -syn
- l'influence du site d'injection sur la cascade d'événements délétères menant à la neurodégénérescence
- tester l'hypothèse de l'initiation entérique de la synucléinopathie chez le primate non-humain
- l'effet du vieillissement sur le développement d'une synucléinopathie

- l'effet d'agrégats d' α -syn provenant de 2 synucléinopathies distinctes (maladie de Parkinson/Démence à corps de Lewy par rapport à l'atrophie multisystématisée)
- une banque de tissus pour des études de biomarqueurs.

Pour ce projet, nous avons eu accès à une colonie entière de babouins (n=50) d'espèce *Papio papio* et *Papio anubis*. Les animaux ont été divisés en 4 tranches d'âge : de 1 à 3 ans (n=8), jeunes adultes de 3 à 7 ans (n=18), adultes de 7 à 14 ans (n=15) et âgés de 20 à 22 ans (n=9). Le **Tableau 5** présente l'attribution des animaux en fonction du traitement, temps post-chirurgie et tranche d'âge. Au cours des chirurgies (ayant eu lieu en octobre 2013), les animaux ont reçu des injections striatales dans le putamen dorso-latéral (4 sites d'injection de 25 μ l par hémisphère – coordonnées : AC -1/-5, L 16/17, DV 0/+3), des injections au niveau du cortex préfrontal (3 sites d'injection de 33 μ l – coordonnées : AC +10, L +21, DV +1,2 /+3,6/+6) et des injections dans le mur ventral du duodénum (2 sites d'injection de 50 μ l).

Groupes	Sacrifice	Tranches d'âge				Total
		1-3	3-7	7-14	20-22	
Contrôles		1	2	2	2	7
LB (striatum)	6 mois	1	2	2	1	18
	1 an	1	2	2	1	
	2 ans	2	1	1	2	
noLB (striatum)	6 mois	1	1	1	1	12
	1 an	1	1	1	1	
	2 ans		2	2		
LB (cortex)	1 an		2	2	1	5
LB (duodénum)	2ans	1	2	2		5
GCI (striatum)	2ans		3			3

Tableau 5. Listes des animaux des différents groupes de traitement et d'âge. LB : animaux injectés avec les fractions contenant les corps de Lewy. noLB : animaux injectés avec les fractions contrôles. GCI : animaux injectés avec les fractions contenant les inclusions gliales cytoplasmiques.

L'étude précédente du laboratoire a permis de montrer une diminution du signal pour un marqueur du transporteur vésiculaire des monoamines en tomographie par émission de positron au niveau striatal 9 mois après injection (Recasens *et al.*, 2014), nous avons ici choisis de sacrifier les animaux à un stade pré-symptomatique (6 mois), symptomatique précoce (12 mois) et tardif (24 mois). Les animaux ayant reçu l'injection duodénale ou les fractions contenant les inclusions gliales cytoplasmiques sont sacrifiés après 24 mois pour avoir une comparaison des points finaux. Concernant les injections entériques, le choix d'attendre 2 ans prend aussi son rationnel dans la distance à parcourir depuis le mur ventral du duodénum avant d'atteindre le noyau dorsal moteur du nerf vague (distance >1m). Les animaux ayant reçu une injection corticale sont quant à eux sacrifiés après 12 mois pour

permettre la comparaison avec les animaux ayant reçu l'injection striatale à un stade déjà connu comme symptomatique. De plus les animaux ont été suivis sur un plan comportemental par deux méthodes différentes, non biaisées mais complémentaires aux différents temps expérimentaux pré-définis avec un panel de paramètres pour être le plus exhaustif possible (détaillés dans la section suivante) (**Tableau 6**).

	6 mois	12 mois	18 mois	24 mois
Sacrifice	✓	✓		Nov 2015
Actimétrie	✓	✓	✓	Nov 2015
Scan-sampling	✓	✓		Oct 2015

Tableau 6. Design expérimental et suivi longitudinal comportemental. Méthode de scan-sampling détaillée dans la partie 3. Le dernier temps expérimental restant, 24 mois après chirurgie, est planifié pour les mois d'octobre et novembre 2015.

3. Résultats préliminaires

Nous avons utilisé la même méthodologie de purification des agrégats que précédemment (Iwatsubo *et al.*, 1996; Recasens *et al.*, 2014). Les informations anatomo-pathologiques des cerveaux relatives aux patients parkinsoniens et atteints de l'atrophie multisystématisée (AMS) sont présentées dans le **Tableau 7** et **8 respectivement**. Les patients ont été sélectionnés sur les critères de la présence importante de corps de Lewy et d'une neurodégénérescence dopaminergique (**Figure 35A**). Le délai post-mortem était de 31,8 heures pour les patients parkinsoniens et de 17 heures pour les patients AMS.

Patient	Sexe	Age	DPM	Diagnostic	Pathologie associée	Perte neuronale	Corps et Neurites de Lewy
MP1	M	72	24,5	DCL	Maladie d'Alzheimer stade IV	++ (*)	+++ nombreux neurites
MP2	M	66	11,5	DCL	Maladie d'Alzheimer stade VI	++ (*)	+++
MP3	F	78	54,5	DCL	Lésions Alzheimer stade IV – Maladie des Grains	+++	++
MP4	M	82	42	DCL	Maladie d'Alzheimer stade VI – Angiopathie amyloïde	+++	+
MP5	M	77	26,5	DCL	Maladie d'Alzheimer stade VI	+++	+

Tableau 7. Informations relatives aux patients parkinsoniens. MP : maladie de Parkinson. ND : non déterminé. DPM : délai post-mortem. DCL : démence à corps de Lewy. (*): perte neuronale hétérogène. Les stades pour les pathologies Alzheimer sont ceux de Braak (Braak and Braak, 1991).

Patient	Sexe	Age	DPM	Diagnostic	Pathologie associée
AMS1	F	71	13	AMS	Maladies des Grains, lésions Alzheimer stade IV
AMS2	M	64	21	AMS	Lésions Alzheimer stade II

Tableau 8. Informations relatives aux patients atteints de l'atrophie multisystématisée. AMS : atrophie multisystématisée. DPM : délai post-mortem. Les stades pour les pathologies Alzheimer sont ceux de Braak (Braak and Braak, 1991).

De façon similaire à nos précédents résultats et en accord avec la littérature, la purification sur gradient de sucrose suivie d'un dot-blot anti α -syn permettent d'identifier les agrégats d' α -syn au niveau de l'interface 1.4M/2.2M (**Figure 35B**). Bien que nous ne nous y soyons pas intéressés dans cette étude, il existe des agrégats intermédiaires présents à l'interface 1.2M/1.4M, comme caractérisé précédemment (Kramer and Schulz-Schaeffer, 2007). Nous avons confirmé la présence d'agrégats d' α -syn dans nos fractions purifiées par immunohistochimie de fluorescence avec un marquage dirigé contre l' α -syn humaine colocalisé avec un marquage à la thioflavine S, marqueur des feuillettes β (**Figure 35C**). Les 5 échantillons de mésencéphale de cerveau de patient parkinsonien présentés dans le **Tableau 7** ont été utilisés en part inégale pour constituer le matériel injecté lors des chirurgies (**Figure 35D**), le choix étant basé sur la concentration d' α -syn soluble mesurée par méthode immuno-enzymatique ELISA. La concentration moyenne d' α -syn soluble dans l'inoculum était de 24.51 pg/ μ l.

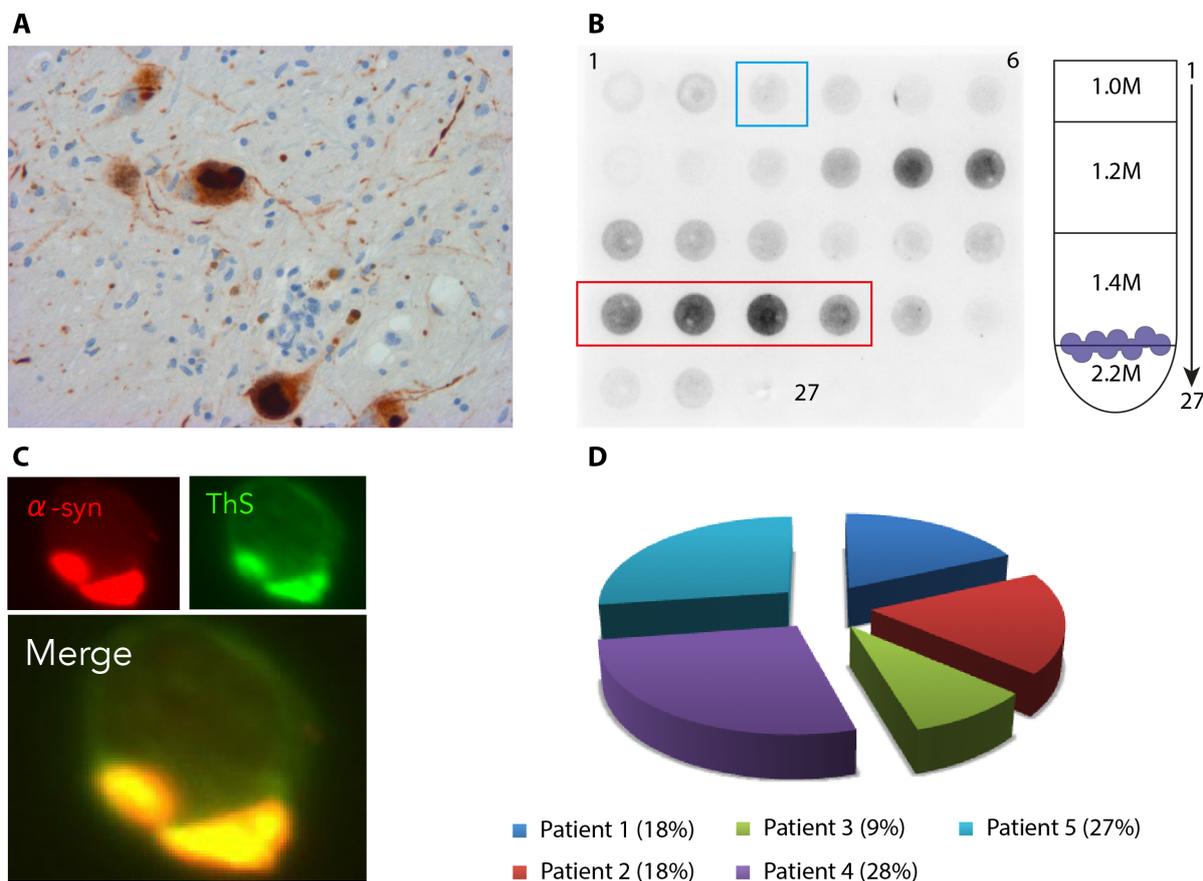


Figure 35. Caractérisation de l'inoculum LB utilisé pour les chirurgies. (A) Images représentatives du marquage mésencéphalique anti α -syn et la présence de corps de Lewy chez le patient 1. (B) Immunoblot obtenu après séparation sur gradient de sucrose pour le patient 1. La fraction 3 constitue l'inoculum noLB (encadré en bleu) et est utilisé pour la chirurgie. Les fractions 19 à 22 constituent l'inoculum LB (encadré rouge) et sont sélectionnées pour la chirurgie. (C) Image représentative d'un corps de Lewy purifié après marquage contre l' α -syn (rouge) et la thioflavine S (vert). (D) Proportion des différents échantillons dans l'inoculum utilisé pour les chirurgies.

Nous avons par ailleurs sélectionné les fractions 3 des mêmes patients parkinsoniens pour constituer l'inoculum noLB avec une concentration finale d' α -syn soluble de 24,51 pg/ μ l. Concernant les inclusions gliales cytoplasmiques, le même protocole a été utilisé à partir d'échantillons de putamen cette fois-ci. Les fractions sélectionnées ont été mélangées pour obtenir un inoculum d'une concentration finale de 44,28pg d' α -syn soluble par μ l d'inoculum, avec un rapport de concentration de 3:2 entre le patient AMS1 et le patient AMS2 (Tableau 8).

Nous avons ensuite caractérisé la toxicité des inocula *in vitro* sur des cultures mésencéphaliques embryonnaire de rat (Figure 36). Sur un plan morphologique, les neurones dopaminergiques présentent dans les deux cas une diminution de l'arborisation dendritique et du nombre d'épines dendritiques (Figure 36A-E). Après 1, 2, 5 ou 7 jours d'incubation, nous avons quantifié le nombre de neurones immunopositifs pour la TH. Les inocula noLB et LB induisent tous deux une forte toxicité après 7 jours avec un effet dose-dépendant (Figure

36F). De façon intéressante, il apparaît que l'inoculum LB induit une toxicité plus précoce que l'inoculum noLB avec une mort cellulaire atteignant son maximum dès 5 jours.

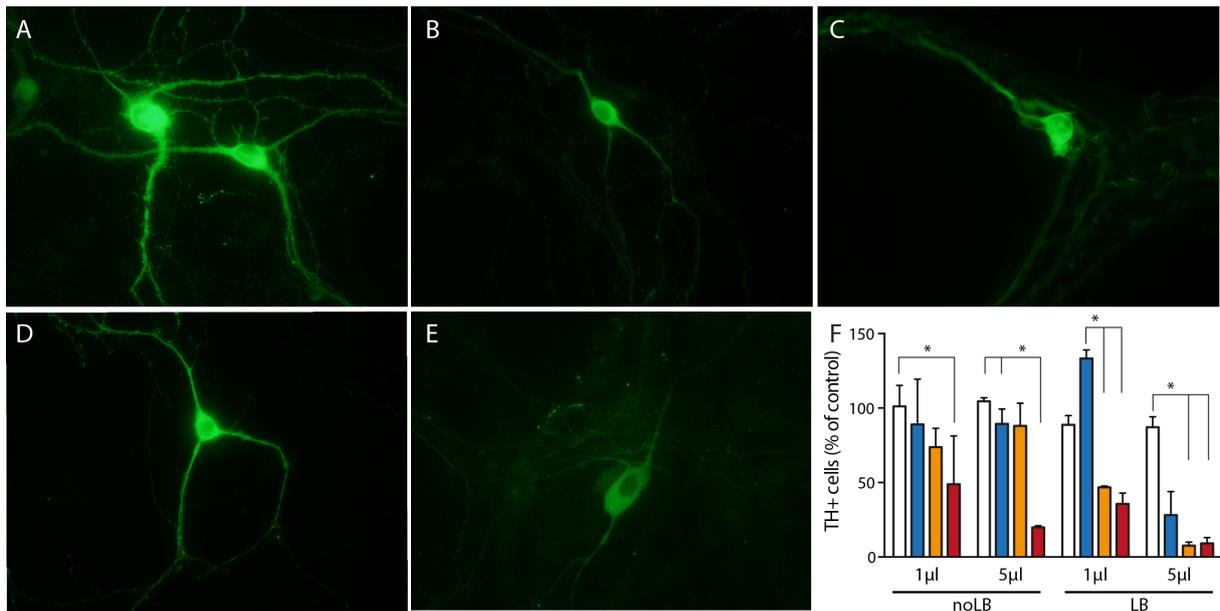


Figure 36. Toxicité *in vitro* des inocula LB et noLB. (A-E) Morphologie des neurones dopaminergiques (identifiés par immunocytochimie anti-TH – en vert) après 7 jours en (A) condition basale ou après traitement avec : (B) noLB 1µl, (C) noLB 5µl, (D) LB 1µl, (E) LB 5µl. (F) Quantification du nombre de neurones immunopositifs pour la TH avec les différents traitements et après 1 jour (en blanc), 2 jours (en bleu), 5 jours (en orange) et 7 jours (en rouge). Analyse par ANOVA à deux voies suivie d'un test de Bonferroni pour les comparaisons multiples. * : $p < 0.05$.

Les agrégats purifiés des patients atteints d'atrophie multisystématisée présentent une toxicité nettement plus rapide que les agrégats provenant de patients parkinsoniens. En effet, nous avons noté une toxicité maximale après 1 jour (Figure 37). La toxicité très rapide ne permet pas d'identifier d'altération morphologique (Figure 37A-C), ni de toxicité dose-dépendante (Figure 37D).

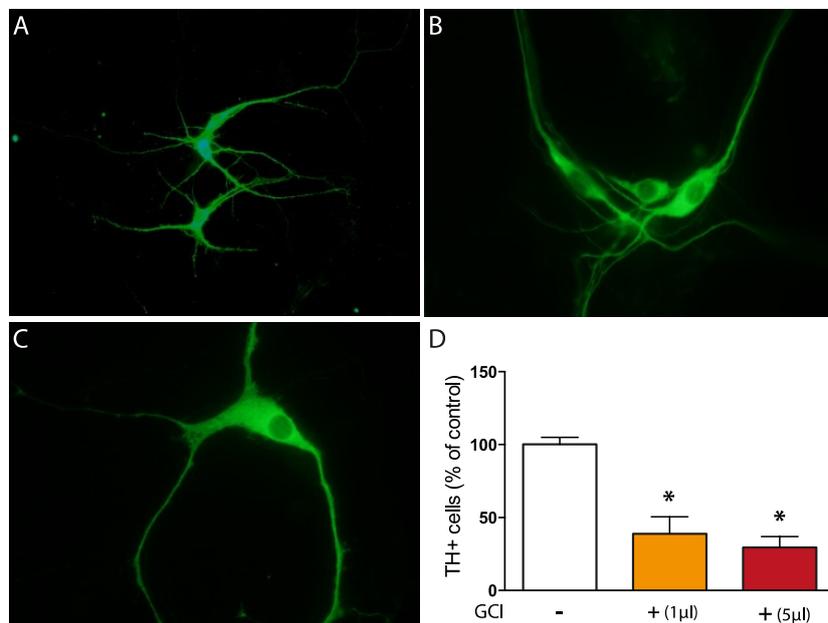


Figure 37. Toxicité de l'inoculum GCI. (A) Morphologie des neurones dopaminergiques (identifiés par immunocytochimie anti-TH – en vert) après 1 jours d'exposition en (A) condition basale ou après traitement avec (B) GCI 1 μ l ou (C) GCI 5 μ l. (D) Quantification du nombre de neurones immunopositifs pour la TH après 1 jours avec les différents traitement : non traités (en blanc), GCI 1 μ l (en orange) et GCI 5 μ l (en rouge). Analyse par ANOVA à une voie suivie d'un test de Tukey pour les comparaisons multiples. * : $p < 0.05$.

La toxicité des inocula LB et noLB a été mesurée par son impact sur le système nigro-striée chez la souris adulte 4 mois après injection intranigrale comme décrit précédemment (Recasens *et al.*, 2014). Comme attendu et reproduit, les animaux ayant reçu l'inoculum LB présentent une perte des neurones dopaminergiques de l'ordre de 40% après 4 mois alors que ce n'est pas le cas pour les animaux ayant reçu l'inoculum noLB (**Figure 38**).

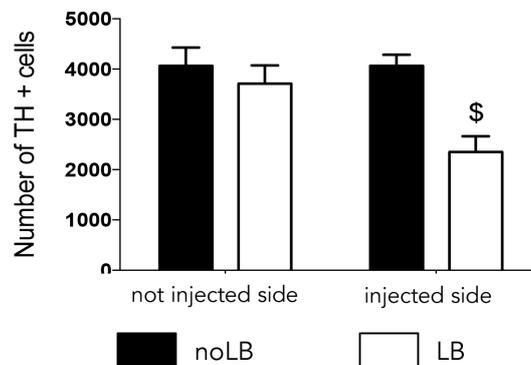


Figure 38. Toxicité sélective de l'inoculum LB pour les neurones dopaminergiques chez la souris 4 mois après injection intranigrale. Quantification non biaisée par stéréologie du nombre de neurones immunopositifs pour la TH dans la SN. Analyse par ANOVA deux voies, suivie d'un test de Bonferroni pour les comparaisons multiples. \$ $p < 0,05$ par rapport au côté non injecté des animaux ayant reçu l'inoculum LB.

Les résultats ci-après ne concernent pour le moment que les groupes ayant reçu les inocula LB et noLB. Les animaux ont été suivis sur un plan comportemental par une méthode d'analyse éthologique de « scan-sampling » comme publié précédemment (Camus *et al.*, 2013a; Camus *et al.*, 2013b). Les paramètres comportementaux de chaque animal ont été mesurés toutes les 5 minutes pendant 8 sessions de 2h pour un total de 192 observations par animal. Nous avons ensuite sélectionné 14 paramètres regroupant différentes catégories (posture, orientation corporelle, localisation dans la volière, comportements sociaux, sexuels, stéréotypiques, exploration, prise de nourriture) afin de réaliser une analyse en composante principale (ACP). Alors que l'ACP ne permet pas de distinguer les animaux selon le

traitement à 6 mois, l'ACP sur les données mesurées après 1 an permettant une ségrégation des animaux contrôles par rapport aux animaux ayant reçu l'inoculum noLB ou LB (**Figure 39**). De façon surprenante, les résultats obtenus par l'ACP ne permettent pas de distinguer les animaux noLB par rapport aux animaux LB (**Figure 39**).

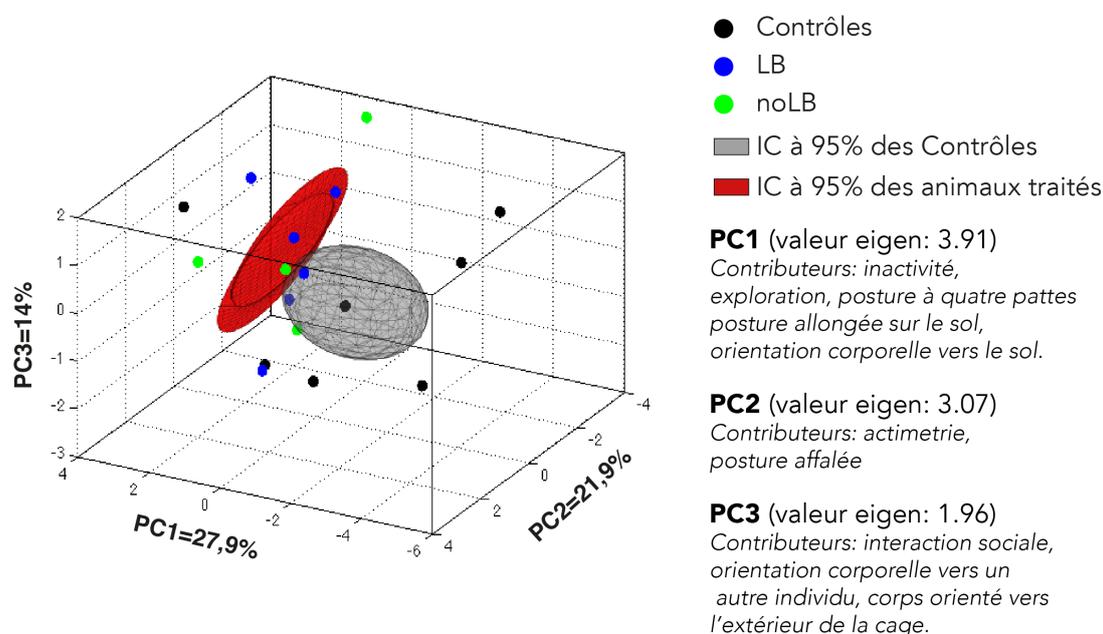


Figure 39. Ségrégation des animaux en fonction du groupe de traitement par analyse en ACP. Représentation des points individuels 1 an après chirurgie dans l'espace débruité créé par les axes PC1, PC2 et PC3. La projection des ellipsoïdes, représentant l'intervalle de confiance à 95% pour les groupes considérés, montre une faible superposition. Les données ont été centrées-réduites en ajustant la moyenne à 0 et la déviation standard à 1. IC : intervalle de confiance. PC : composant créé par l'analyse.

Les animaux ont été régulièrement soumis à une évaluation non biaisée de l'activité locomotrice. Alors que les résultats à 6 mois et 1 an n'ont pas permis de distinguer une différence significative de l'activité locomotrice, celle-ci apparaît comme significativement diminuée après 18 mois (**Figure 40**). En cohérence avec les résultats obtenus de l'ACP, cette diminution apparaît autant pour le groupe ayant reçu l'inoculum noLB que celui ayant reçu l'inoculum LB.

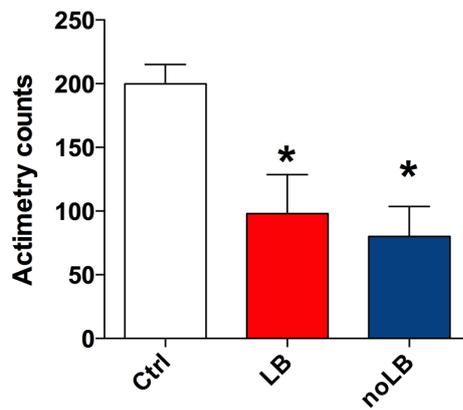


Figure 40. Diminution de l'activité locomotrice spontanée 18 mois après chirurgie. Les animaux ont été placés en cage individuelle pour la mesure de l'activité locomotrice pendant 2 heures. Analyse par ANOVA une voie suivie d'un test de Bonferroni pour les comparaisons multiples. * : $p < 0,05$ par rapport au groupe contrôle. Ctrl : groupe contrôle.

PROJET 7. HYPOTHESE « PRION » POUR LES SYNUCLEINOPATHIES : STRATEGIE THERAPEUTIQUE ANTI-AGREGATION.

Dans cette dernière étude, très préliminaire pour le moment, nous nous sommes intéressés à un composé pharmacologique, anle138b [3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(3-bromophenyl)-1H-pyrazole], qui a montré des propriétés anti-agrégatives dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de maladies à prions et de synucléinopathie (Wagner *et al.*, 2013). Nous avons donc choisi de tester cette molécule dans le modèle murin, modèle d'étude pour l'hypothèse prion de l' α -syn. Cette molécule a été administrée aux animaux dans leur aliment. Pour la première étude préliminaire, nous avons choisi de débiter le traitement aux animaux le lendemain de l'injection des inocula LB et noLB (Figure 41).

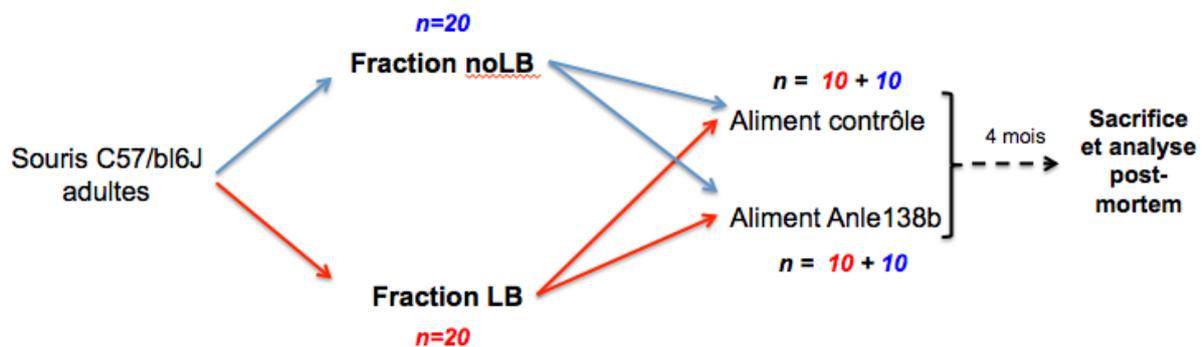


Figure 41. Design expérimental du projet. Les animaux reçoivent par injection stéréotaxique intranigrale unilatérale d'inoculum LB ou noLB. Le lendemain les animaux sont séparés en deux groupes l'un avec l'aliment contrôle l'autre avec l'aliment contenant anle138b. Les animaux ont eu un accès *ad libitum* à la nourriture.

Les animaux ont été sacrifiés 4 mois après chirurgie. La même procédure que précédemment a été utilisée pour le comptage non biaisé des neurones dopaminergiques par stéréologie (Bourdenx *et al.*, 2015a; Recasens *et al.*, 2014). Les animaux ayant reçu la nourriture contenant la molécule anle138b présentent une protection des neurones dopaminergiques de la toxicité induite par l'inoculum LB (même composition que le projet 6) (Figure 42). Nous testons actuellement l'efficacité de ce composé dans un design expérimental plus proche de celui utilisé lors des essais cliniques (« delayed-start »).

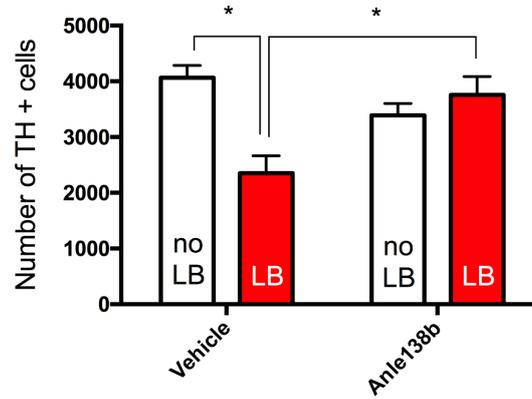


Figure 42. Protection des neurones dopaminergiques chez les animaux ayant reçu le traitement anle138b. Quantification non biaisée des neurones immunopositifs pour la TH par stéréologie. Analyse par ANOVA à deux voies suivie d'un test de Bonferroni pour les comparaisons multiples. * $p < 0.01$.

Discussion

DISCUSSION

L'ensemble de mon travail de thèse s'inscrit dans une démarche de recherche translationnelle menée au sein de l'équipe « Physiopathologie des syndromes parkinsoniens » avec pour but de transposer les données expérimentales obtenues chez le rongeur puis le primate non-humain en gardant pour objectif la thérapie chez l'humain. Pour cette discussion, je commencerai par discuter les aspects spécifiques à chaque partie des résultats puis s'en suivra une discussion générale suivie d'une conclusion sur l'ensemble de ce travail.

L'objectif de ce travail était de poursuivre une approche tripartite afin de mieux comprendre les mécanismes de la dégénérescence parkinsonienne et de proposer des approches thérapeutiques. Dans un premier temps, j'ai donc participé à une étude comparative d'un même modèle de surexpression virale de l' α -syn chez plusieurs espèces de mammifères et de questionner l'influence de l'âge en utilisant soit un mutant phénotypique de vieillissement accéléré chez la souris soit des animaux âgés chez le primate non-humain. Puis, nous avons testé deux approches de transgénèse pour générer des lignées d'animaux transgéniques. Dans la seconde partie, je me suis focalisé sur l'intérêt de la restauration de la fonctionnalité des lysosomes dans un contexte de modèles génétiques et toxiques de la maladie de Parkinson et l'intérêt de l'augmentation de la biogénèse lysosomale dans un contexte de surexpression virale de l' α -syn. Pour finir, je me suis intéressé à l'hypothèse « prion » pour les synucléinopathies dans une approche de modélisation chez le primate non-humain et thérapeutique chez la souris. J'ai choisi d'intégrer dans ce manuscrit de thèse l'ensemble de ces travaux, dont certains sont à des stades préliminaires ou encore en cours de développement afin d'illustrer les trois approches menées en parallèle au cours de mes trois années de thèse et d'en discuter les aspects spécifiques dans cette dernière partie.

MODELISATION EXPERIMENTALE DE LA MALADIE DE PARKINSON

Nous l'avons vu dans l'introduction, il n'existe pas à ce jour de modèle reproduisant les différents aspects de la maladie de Parkinson. De plus, face à une maladie clairement multifactorielle, il paraît illusoire qu'un seul modèle puisse récapituler les différents aspects de la maladie. Ainsi quels sont les critères pour définir la validité d'un modèle animal ? La recherche sur les maladies neuropsychiatriques, et notamment les travaux de Willner sur la dépression, a proposé l'existence de trois critères : la phénocopie, la valeur prédictive et la

valeur de construction (Belzung and Lemoine, 2011; Willner, 1984). Il existe aujourd'hui des modèles plus complexes incluant notamment les valeurs quant à la méthode d'induction, l'utilisation de biomarqueurs, la validité éthologique de l'espèce concernée (Belzung and Lemoine, 2011). Pour ce qui est de la maladie de Parkinson, on peut ainsi imaginer des critères similaires avec neurodégénérescence dopaminergique, synucléinopathie progressive, et des dysfonctions motrices améliorées par la levodopa.

Le modèle de surexpression virale de l' α -syn humaine mutée Ala53Thr paraît remplir la majorité des critères énoncés plus haut. Nous avons en effet observé une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques associée avec l'apparition de symptômes moteurs caractéristiques (diminution de l'activité locomotrice et instabilité à la marche). La diminution de l'activité locomotrice est améliorée par le traitement à la levodopa (Engeln *et al.*, 2013). La dynamique du modèle apparaît toutefois très rapide puisque nous atteignons 25% de dégénérescence après 1 semaine, 70% après 4 semaines avant d'atteindre le niveau final de 80% à 16 semaines. Pour comparaison, chez le primate non-humain soumis à une intoxication par le MPTP, la cinétique de dégénérescence est linéaire (Bezard *et al.*, 2001). Cette différence de cinétique est donc à prendre en compte dans les études futures notamment lors de l'étude des symptômes non-moteurs pré-symptomatiques.

La cinétique de dégénérescence apparaît relativement comparable dans les différents modèles de surexpression virale de l' α -syn (en tout cas pour les dernières générations de vecteurs viraux – voir **Tableau 2** dans l'introduction) qu'il s'agisse de surexpression de la protéine sauvage ou mutée en Ala53Thr (Decressac *et al.*, 2012; Van der Perren *et al.*, 2015a). Chez la souris, une étude a montré un niveau identique de dégénérescence et de d'agrégation à ceux observés chez le rat (Oliveras-Salva *et al.*, 2013). Au final, chez le rongeur, le titre viral apparaît comme un facteur plus important que la présence de la mutation (Oliveras-Salva *et al.*, 2013). À cela il faut ajouter l'importance de la souche de rat choisie. En effet, nous avons rapporté dans le projet 1 une importante variabilité de la toxicité entre les souches de rats ou de souris (Bourdenx *et al.*, 2015a). Le problème de la susceptibilité à la dégénérescence d'une souche par rapport à une autre a déjà été rapporté dans le modèle toxique avec le MPTP chez la souris (Hamre *et al.*, 1999; Sonsalla and Heikkila, 1988). Les raisons des différences observées dans le modèle MPTP ou dans notre modèle de surexpression viral de l' α -syn humaine mutée Ala53Thr restent toutefois méconnues. L'investigation de ces différences permettrait l'identification de facteur de susceptibilité de certaines souches ou de résistance chez d'autres à la dégénérescence des neurones dopaminergiques.

Nous l'avons vu, la présence de la mutation Ala53Thr ne change pas le décours de la dégénérescence chez le rongeur. Pourtant, dans la pathologie humaine, les patients présentant la mutation Ala53Thr présentent une forme juvénile de la maladie de Parkinson avec une apparition précoce de symptômes secondaires en comparaison de la forme sporadique (Polymeropoulos *et al.*, 1997). Quelles sont les raisons de cette différence entre la pathologie humaine et notre modèle chez le rongeur ? Une des raisons pouvant expliquer cette différence est le fait que la mutation Ala53Thr est naturelle chez certaines espèces et notamment celles étudiées dans notre projet 1 : souris, rat, marmoset (Bourdenx *et al.*, 2015a; Vermilyea and Emborg, 2015). Le **Tableau 9** récapitule les différences de séquences de l' α -syn chez les espèces concernées par ce travail. Ainsi chez ces espèces, la présence du résidu Thr en position 53 est similaire à la protéine endogène sauvage. La description d'une toxicité accrue de l' α -syn mutée Ala53Thr chez le marmoset, portant naturellement Ala53Thr, tend à contredire cette hypothèse (Eslamboli *et al.*, 2007). Il faut cependant remarquer que cette étude appartient à la deuxième génération de vecteurs viraux (pour comparaison des générations voir le **Tableau 2** dans l'introduction). Ces vecteurs viraux étant différents de ceux utilisés dans notre étude, il faudrait réaliser une nouvelle comparaison pour s'assurer de la présence de cette susceptibilité accrue du marmoset à la surexpression de l' α -syn humaine mutée Ala53Thr.

	53	87	95	99	100	103	107	114	121	122
<i>Homo sapiens</i>	A	S	V	Q	L	N	A	E	D	N
<i>Mus musculus</i>	T	N	V	Q	M	G	Y	E	S	S
<i>Rattus norvegicus</i>	T	N	V	Q	M	G	Y	E	S	S
<i>Octodon degus</i> *	T	N	V	Q	L	S	S	E	D	N
<i>Callithrix jacchus</i>	T	N	V	H	L	S	A	E	D	N
<i>Macaca mulatta</i>	A	S	I	Q	L	N	A	Q	D	N
<i>Macaca fascicularis</i>	A	S	V	Q	L	N	A	Q	D	N
<i>Papio papio</i> *	A	S	V	Q	L	N	T	Q	D	N

Tableau 9. Liste des différences dans la séquence protéique de l' α -syn entre l'humain et les différentes espèces étudiées dans ce travail. * : séquence prédite. Adapté de (Vermilyea and Emborg, 2015)

Il est difficile d'estimer le niveau de surexpression total après transduction virale. Decressac et collaborateurs ont montré que l'injection unilatérale intranigrale de virus AAV2/6 permettant l'expression de l' α -syn humaine sauvage induisait une augmentation totale d' α -syn exogène d'un facteur 5 à 8 (Decressac *et al.*, 2012). De façon intéressante, cette expression importante d' α -syn humaine était associée avec une diminution significative (de l'ordre de 40 à 60%) de l'expression de la protéine endogène du côté injecté (Decressac *et al.*, 2012). Bien que les auteurs suggèrent l'existence d'un seuil à passer pour entraîner une

dégénérescence chez le rongeur, il apparaît qu'un tel niveau de surexpression soit très supérieur à celui observé chez les patients. En effet, les patients ayant une tripllication du locus contenant le gène *SNCA* ne présentent qu'une charge protéique doublée (Farrer *et al.*, 2004). Face à un tel niveau de surexpression, nous pourrions imaginer que les processus neurodégénératifs en cours dans ce modèle soient différents de ceux existant dans une forme sporadique de la maladie.

Malgré l'intérêt de notre étude comparative des modèles mammifères après surexpression de l' α -syn mutée publiée dans le projet 1 de la première partie des résultats, il aurait été intéressant d'avoir un suivi longitudinal de l'agrégation et de la phosphorylation de l' α -syn. Pour cela, une analyse biochimique en parallèle de l'étude immunohistochimique aurait été intéressante pour caractériser le moment d'apparition des différentes espèces biochimiques de l' α -syn : oligomères, formes fibrillaires résistantes à la digestion par la protéinase K. Cette étude pourrait constituer une perspective intéressante à l'étude présentée ici. Dans la littérature, Van der Perren et collaborateurs mesurent, de façon surprenante, un niveau de dégénérescence de l'ordre de 75%, associé à une faible présence d' α -syn phosphorylée en Ser129 et une absence d'agrégats insolubles d' α -syn humaine dans leur modèle de surexpression virale de l' α -syn humaine mutée Ala53Thr (Van der Perren *et al.*, 2015a). Ce résultat suggère une toxicité indépendante de l'agrégation de l' α -syn. Dans ce schéma, l' α -syn soluble monomérique induirait la dégénérescence des neurones dopaminergiques. Cette hypothèse paraît toutefois probable vis-à-vis des connaissances actuelles sur la toxicité inhérente à la mutation Ala53Thr notamment mitochondriale, l'inhibition de l'autophagie médiée par les chaperonnes ou la propension accrue à former des liaisons lipidiques due à l'augmentation de ses propriétés hydrophobes (Auluck *et al.*, 2010; Cuervo *et al.*, 2004; Guardia-Laguarta *et al.*, 2014).

Le choix que nous avons fait d'utiliser l'AAV2/9 présente un grand intérêt car il permet une expression forte et une transduction préférentiellement neuronale dans le parenchyme cérébral. Il faut néanmoins garder à l'esprit que ce modèle ne permet pas d'étudier la propagation de la syncléinopathie dans les structures interconnectées. En effet, les AAVs de sérotype 9 ont la particularité de pouvoir être transportés notamment de façon rétrograde dans le cerveau (Low *et al.*, 2013). Ainsi, pour étudier la progression de la synucléinopathie, les modèles relatifs à l'hypothèse « prion » apparaissent plus adéquats.

Dans le projet 5, nous n'avons pas pu montrer d'expression de l' α -syn après injection intranigrale d'AAV2/9-A53T chez le macaque ni de dégénérescence dopaminergique significative généralement associé à ce modèle de surexpression virale telle que nous l'avons

décrite dans le projet 1. Parmi les hypothèses expliquant cette absence d'expression, nous pourrions envisager une non fonctionnalité de ce type de construction virale chez le macaque. Toutefois, malgré des différences méthodologiques quant au moment d'injection, des données du laboratoire et de la littérature montrent une expression de la GFP après injection du même vecteur viral chez la même espèce (*Macaca fascicularis*) (Dehay *et al.*, 2012a; Samaranch *et al.*, 2012). Une autre hypothèse envisageable est la présence d'anticorps circulants contre l'AAV9. En effet, une étude a notamment montré un taux de 50% d'individus adultes avec des anticorps anti-AAV9 circulants (Samaranch *et al.*, 2012). L'absence de kits commerciaux pour la détection des anticorps circulant anti-AAV9 prévient la détection systématique de cette immunité. Pour finir, une dernière hypothèse pouvant être émise est l'absence d'expression du promoteur Synapsin-1 chez le primate non-humain. En effet, dans les études précédentes du laboratoire, le promoteur CAG avait été utilisé (Samaranch *et al.*, 2012). En perspective de ce travail, il serait intéressant de caractériser la présence du génome viral sous forme épisomique notamment en hybridation *in situ* avec des sondes dirigées contre le promoteur Syn-1 ou le WPRE et de confirmer la transcription du transgène par PCR quantitative en temps réel de l'ARNm de l' α -syn mutée Ala53Thr.

Dans le projet 2, 25 jours après administration intracardiaque d'AAV2/9-GFP chez le rat, nous avons observé une transduction gonadique notamment chez les femelles avec un marquage immunopositif pour la GFP au niveau des follicules ovariens. L'observation de ce marquage nous a permis d'envisager l'établissement d'une lignée transgénique après reproduction. Néanmoins, l'ensemble de la génération F1 obtenue ne présentait pas le transgène après analyse par PCR. Ainsi, ce protocole ne permet pas de créer des lignées transgéniques mais permet de générer facilement, malgré un coût en solution virale important, des groupes d'animaux importants avec une expression forte d'un transgène quelconque au niveau central et périphérique. L'ensemble des stratégies existantes permettant d'améliorer ou de spécifier l'expression du transgène sont regroupées dans la revue suivante (Bourdenx *et al.*, 2014c).

Les deux stratégies de transgénèse développées dans les projets 2 et 3 ont été aussi développées pour des applications thérapeutiques. En effet, un certain nombre de maladies neurologiques monogéniques telles que la maladie de Gaucher de type II ou l'amyotrophie spinale présentent les premiers symptômes au cours de la période périnatale (Foust *et al.*, 2010; Mattar *et al.*, 2013). Dans ces contextes pathologiques, la supplémentation enzymatique dès la naissance ou en prénatal par l'utilisation de vecteurs viraux pourrait s'avérer intéressant. L'intérêt de l'administration à P1 d'un bolus de vecteur viral à haute concentration a déjà été montré par une précédente publication de l'équipe (Dehay *et al.*,

2012a) mais au vu des résultats intéressants montrés par l'administration *in utero* en intracérébroventriculaire de vecteur viral, nous avons décidé de tester cette hypothèse chez le primate non-humain. Pour cela, il y a un an, des fœtus de singes (*Macaca fascicularis*) ont reçu une solution de vecteur viral en intracérébroventriculaire au 100^{ème} jour de gestation. Les premiers résultats à venir permettront de déterminer l'intérêt de ces stratégies pour le traitement des maladies neurologiques monogéniques non focales à développement précoce.

INTERET DES MODELES SPONTANES DE MALADIE NEURODEGENERATIVE

Le développement de modèles pour la maladie de Parkinson a commencé il y a un peu plus de 60 ans avec notamment les modèles de déplétion dopaminergique aigüe par la réserpine ou les modèles basés sur l'utilisation des antagonistes dopaminergiques (Hornykiewicz, 1975). Ces modèles ont été développés par une approche basée sur la clinique pour reproduire l'hypodopaminergie, et l'akinésie associée, chez l'animal. Les modèles toxiques classiques sont ensuite popularisés avec l'utilisation de la 6-hydroxydopamine et la découverte du MPTP (Bezard and Przedborski, 2011; Heikkila *et al.*, 1984; Langston *et al.*, 1984; Ungerstedt and Arbuthnott, 1970). De nos jours, les modèles les plus utilisés sont probablement ceux basés sur la surexpression virale d'un gène d'intérêt vis-à-vis de la maladie ou l'utilisation d'animaux transgéniques. Nous l'avons vu, ces modèles peuvent être critiqués sur la quantité de transgènes exprimés. À cet égard, les modèles relatifs à l'hypothèse « prion » et notamment ceux développés à partir de corps de Lewy purifiés sont intéressants du fait de la quantité extrêmement faible d'inoculum injecté (de l'ordre de la centaine de picogrammes) (Recasens *et al.*, 2014). Ainsi il apparaît qu'une combinaison de modèle soit nécessaire pour représenter les différents aspects de la pathologie.

À ce jour, nous ne connaissons pas de modèle spontané de la maladie de Parkinson chez l'animal. Dans une étude en préparation non intégrée à ce manuscrit de thèse à laquelle j'ai participé, nous avons voulu caractériser la potentielle existence d'une synucléinopathie spontanée au cours du vieillissement chez l'octodon (*Octodon degus*). Plusieurs études avaient précédemment montré chez ce rongeur endémique du Chili la présence d'agrégats du peptide A β et de la protéine tau hyperphosphorylée chez des animaux âgés associés avec des altérations de la transmission synaptique (Ardiles *et al.*, 2012; Inestrosa *et al.*, 2005; van Groen *et al.*, 2011). Dans notre étude, nous avons étudié l'existence d'une synucléinopathie chez des animaux âgés de 1 à 6 ans. Dans ces groupes d'animaux nous n'avons pas pu mettre en évidence d'accumulation dépendante de l'âge d' α -syn native ou phosphorylée, de

dégénérescence dopaminergique, ou d'accumulation de protéines non dégradées. Nous n'avons également pas pu observer une pathologie liée à la maladie d'Alzheimer, contrairement à d'autres (Ardiles *et al.*, 2012; Inestrosa *et al.*, 2005; van Groen *et al.*, 2011). Malgré ce résultat négatif, il reste néanmoins intéressant de caractériser la présence d'une synucléinopathie dans de nouvelles espèces animales. À cet égard, le lémurien (*Microcebus murinus*) apparaît comme un modèle intéressant de vieillissement avec une accumulation de signal pour l' α -syn dans ses formes natives, phosphorylées et nitrosylées ainsi que la présence d'une accumulation du peptide A β (Canron *et al.*, 2012). Il reste toutefois à définir si au sein des individus âgés certains présentent notamment une dégénérescence dopaminergique. De façon identique, un poster présenté cette année au congrès annuel de la société des neurosciences américaine montre chez le chimpanzé, âgé entre 37 et 65 ans, une accumulation de protéine tau, notamment hyperphosphorylée, et de peptide A β en fonction de l'âge (Yerkes National Primate Research Center). Encore une fois, l'absence de caractérisation comportementale (cognitive ou motrice) ne permet pas de conclure quant à l'existence d'un modèle spontané de maladie neurodégénérative mais souligne l'intérêt de mener de telles études. Ainsi, l'identification d'une espèce animale présentant une synucléinopathie spontanée serait une nouvelle perspective dans la compréhension de l'étiologie des synucléinopathies et un modèle utile pour tester différentes approches thérapeutiques.

RESTAURATION DE L'ACIDITE DES LYSOSOMES EN SITUATION PATHOLOGIQUE

Dans la seconde partie de mon travail de thèse, je me suis intéressé à des stratégies neuroprotectrices dans différents modèles de la maladie de Parkinson. Tout d'abord, je me suis concentré sur la réversion des altérations lysosomales dans des modèles toxiques et génétiques de la maladie de Parkinson. Les nanoparticules acidifiantes (aNP) utilisées dans le projet 4 présentent des propriétés intéressantes. Après leur importation par un mécanisme de type endocytique, ces aNP sont adressées aux lysosomes après 24 heures. Les aNP sont capables de restaurer la fonctionnalité des lysosomes dans plusieurs modèles de dysfonctions lysosomales allant de l'utilisation d'agent lysosomotropique (chloroquine), un modèle toxique de la maladie de Parkinson *in vitro* et *in vivo*, dans un modèle de fibroblastes de patients parkinsoniens avec une mutation de la protéine ATP13A2, un modèle *in vitro* de répression de la protéine ATP13A2 ou dans un modèle de fibroblastes de patients avec maladie de surcharge lysosomale (myopathie liée à l'X). Nous avons aussi obtenu des effets, plus modestes, sur le pH lysosomal de fibroblastes de patients avec deux mutations de la glucocérébrosidase (GBA). En perspective de ce travail de thèse, il serait intéressant de

compléter cette étude par une investigation de l'efficacité des aNP dans un modèle de toxicité lié à l'agrégation de l' α -syn.

Ces aNP ont récemment été utilisées dans le contexte de la maladie d'Alzheimer avec mutation de la protéine Préséniline-1 (Lee *et al.*, 2015). La répression de Préséniline-1 entraîne une perte de l'acidification du lysosome ayant pour conséquence une dysfonction lysosomale et une libération du calcium intra-lysosomal (Lee *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2010). Dans ce contexte, l'utilisation des aNP permet de restaurer l'acidité des lysosomes et de limiter la libération cytoplasmique du calcium lysosomal.

La question du mécanisme exact de fonctionnement des aNP reste entière. De façon similaire à ce que nous avons réalisé avec le MPP⁺, les auteurs de l'étude récemment publiée utilisant le même type d'aNP ont réalisé un prétraitement de 24 heures avec les aNP avant d'utiliser un agoniste de TRPML1 (« transient receptor potential cation channel mucolipin subfamily member 1 ») induisant une libération du calcium lysosomal uniquement dans les cellules avec une répression de Préséniline-1 (Lee *et al.*, 2015). Dans notre étude, les aNP n'ont pas d'effet sur la mort cellulaire induite par le MPP⁺ à condition que les aNP soient ajoutées dans le milieu de culture en même temps que la toxine. Dans ce paradigme expérimental, il apparaît que l'effet toxique du MPP⁺ est plus rapide que l'effet bénéfique des aNP. Toutefois, un prétraitement de 16h avec les aNP permettait de diminuer significativement la mort cellulaire induite par la toxine MPP⁺. Cette différence peut s'expliquer par au moins deux hypothèses quant au fonctionnement des aNP. Premièrement, nous l'avons vu, les aNP atteignent un maximum de colocalisation avec les lysosomes au bout de 24 heures de traitement. De ce fait, si les conséquences délétères de la toxine sont plus rapides que le transport des aNP, alors les effets délétères de la toxine ne peuvent pas être contrecarrés par les aNP car elles n'ont pas encore atteint les lysosomes pour y exercer leur effet bénéfique. Deuxièmement, nous pouvons imaginer que les aNP ne doivent pas seulement être présentes au niveau lysosomal mais aussi hydrolysées. En effet, le laboratoire de Ralph Nixon propose, comme nous l'avons fait, une fonctionnalité, du moins en partie, des aNP par hydrolyse en acides lactique et glycolique (Lee *et al.*, 2015). Comme nous l'avons suggéré, les produits de dégradation des aNP ont des capacités de soutien du potentiel transmembranaire mitochondrial expliquant probablement en partie la protection observée contre la toxicité des toxines mitochondriales (Toyoda *et al.*, 2014).

Un élément essentiel pour répondre à la question de la fonction des lysosomes est la cinétique de dégradation. Les données de la littérature sont contradictoires, certaines études montrent une stabilité à long-terme des aNP en milieu acide *in vivo* alors que d'autres

annoncent une catalyse rapide (Shive and Anderson, 1997). Pour ce qui est des expériences menées *in vivo* (prétraitement de 24h avec les aNP puis injection de MPTP pendant 2 jours consécutifs et sacrifice des animaux 5 jours après la dernière injection de MPTP), l'échelle de temps me paraît compatible avec un effet des aNP médiée par leur hydrolyse acide. Elle me paraît moins compatible avec les résultats expérimentaux obtenus *in vitro* dans lesquels un prétraitement de 16h avec les aNP induit une protection totale. En effet, une étude en particulier a montré précédemment que l'effet délétère du MPP⁺ sur les lysosomes, à savoir la perméabilisation de la membrane lysosomale – illustré par la translocation de la protéine Bax (« Bcl-2 associated X protein ») à la membrane lysosomale, apparaît 3 heures après le traitement avec le MPP⁺ (Bove *et al.*, 2014). Cet effet apparaît d'ailleurs avant même le recrutement de Bax à la membrane mitochondriale entraînant la libération du cytochrome c et l'activation de la voie mitochondriale proapoptotique (Bove *et al.*, 2014). Ce résultat conforte l'intérêt de la protection de l'intégrité du lysosome dans ce modèle de toxine parkinsonienne. Des études complémentaires sont toutefois nécessaires pour définir la cinétique de dégradation des aNP et l'importance relative de l'effet direct sur le pH lysosomal et indirect sur le potentiel transmembranaire mitochondriale.

Afin d'appliquer les aNP à d'autres modèles animaux et maladies, nous avons considéré l'idée d'une administration systémique. Parmi les nombreuses possibilités, j'ai notamment essayé l'administration intra-nasale répétée pendant 5 jours consécutifs. Malgré une identification aisée des aNP au niveau des bulbes olfactifs, nous n'avons pu observer une diffusion des aNP dans d'autres structures cérébrales plus profondes. Une autre étude dans le contexte de la maladie de Parkinson a montré l'intérêt de l'injection intraveineuse d'aNP contenant de la dopamine pour diminuer les altérations motrices induites par la lésion des neurones dopaminergiques (Pahuja *et al.*, 2015). Malgré une dispersion dans l'ensemble de l'organisme, l'observation d'effets probants au niveau comportemental suggère une libération centrale de dopamine efficace. En perspective du travail présenté dans ce manuscrit, il serait intéressant de tester le protocole d'administration intraveineuse dans notre modèle de souris MPTP.

La grande majorité des études cherchant à moduler les capacités de dégradation de la cellule, et notamment l'autophagie, ont utilisé des outils pharmacologiques ou des thérapies géniques. La privation de nourriture est classiquement utilisée pour induire l'activation de l'autophagie au niveau hépatique mais des études ont montré des résultats contradictoires quant au système nerveux central (Alirezai *et al.*, 2010; Mizushima *et al.*, 2004). Plus classiquement, les approches tendent à inhiber l'activité du complexe mTOR (« mammalian target of Rapamycin ») ou alors surexprimer un élément clé de la régulation du flux

autophagique (Decressac *et al.*, 2013; Dehay *et al.*, 2010; Spencer *et al.*, 2009; Xilouri *et al.*, 2013). Notre approche avec l'utilisation des aNP est innovante en ceci qu'elle se focalise sur la physiologie lysosomale sans moduler des voies de signalisation intracellulaire. En effet, nous n'avons par exemple pas pu observer de modulation de la voie de signalisation mTOR après ajout des aNP en condition basale. Bien que des travaux complémentaires soient nécessaires pour faciliter l'utilisation des aNP *in vivo* ou spécifier leur adressage aux neurones dopaminergiques, il me semble que l'intérêt principal de ce travail est de montrer que la seule restauration de la fonctionnalité des lysosomes est intéressante dans un contexte de dysfonction lysosomale, associée à la maladie de Parkinson, avec notamment des applications potentielles intéressantes dans le champ plus large des maladies à surcharge lysosomale.

STRATEGIES THERAPEUTIQUES POUR LES SYNUCLEINOPATHIES

Dans un contexte synucléinopathique, quelles stratégies thérapeutiques peuvent être envisagées ? Comme synthétisées par Lashuel et collaborateurs (**Figure 43**), trois approches peuvent être considérées : (i) diminution de la synthèse, (ii) diminution de l'agrégation ou (iii) augmentation des capacités d'élimination de l' α -syn agrégée (Lashuel *et al.*, 2013). A ces trois approches s'ajoutent les approches d'immunothérapie qui suscitent un intérêt important dans la maladie de Parkinson. Cette approche est à distinguer des trois autres dans la **Figure 43** car théoriquement elle allie une approche anti-agrégative et dégradative par la séquestration des espèces oligomères d' α -syn.

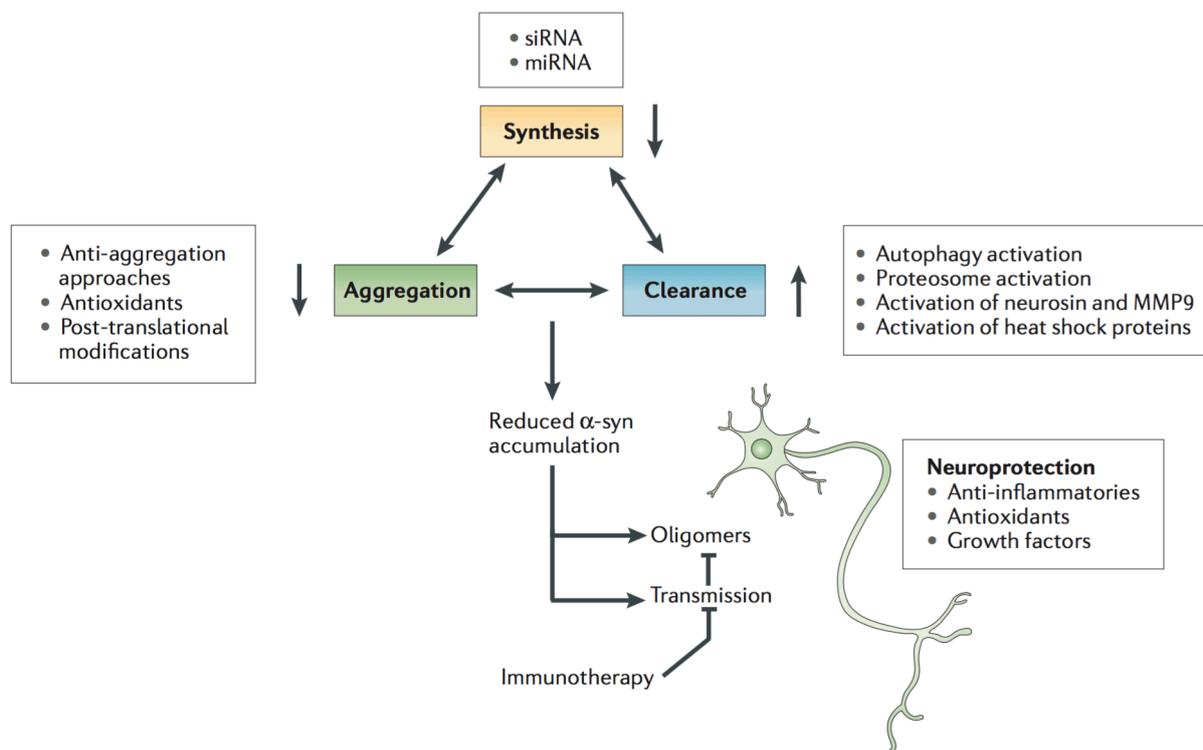


Figure 43. Stratégies thérapeutiques pour combattre l'agrégation, la propagation de l' α -syn et la toxicité associée. Les approches peuvent être regroupées en 3 groupes. Le premier tend à diminuer l'expression de l' α -syn par des approches de répression génique. La seconde tend à cibler spécifiquement le processus d'agrégation. La dernière cherche à augmenter les capacités de la cellule à prendre en charge les agrégats protéiques en modulant le réseau protéosomique soit en augmentant les capacités de dégradation (activation du protéasome ou de l'autophagie) soit en activant des chaperonnes moléculaires. Une dernière approche est l'immunothérapie dont l'intérêt se situe probablement dans la diminution de la propagation de la pathologie. D'après (Lashuel *et al.*, 2013).

Au cours de ce travail de thèse, je me suis donc intéressé à deux de ces approches mécanistiques proposées (**Figure 43**). Ainsi, le projet 5 s'est intéressé à la surexpression virale d'un modulateur central de l'autophagie et de la biogénèse lysosomale : TFEB. Au cours de ce travail, nous avons montré l'intérêt de la surexpression conjointe de TFEB dans un modèle de surexpression virale de l' α -syn mutée Ala53Thr chez le rongeur. Comme nous l'avons confirmé *in vitro*, la surexpression de TFEB permet une augmentation conjointe du flux autophagique et de la biogénèse lysosomale. Cette augmentation des capacités de dégradation de la cellule permet une protection des neurones dopaminergiques passant par une diminution de la charge totale d' α -syn mésencéphalique dans ses formes agrégées et phosphorylées. Nous avons aussi identifié une diminution de l'inflammation (données non présentées car non encore quantifiées sur l'ensemble des animaux) passant par une diminution de l'astrogliose striatale associée à ce modèle d'étude. Lors des phases initiales de ce projet, une étude de Decressac et collaborateurs montrent un effet similaire dans un modèle de surexpression virale de l' α -syn, cette fois-ci sauvage, chez le rat (Decressac *et al.*, 2013). Il

me semble toutefois que notre choix d'utiliser la forme mutée de l' α -syn humaine présente un intérêt particulier. En effet, la littérature rapporte que cette forme particulière de l' α -syn possède la capacité de bloquer le transporteur de l'autophagie médiée par les chaperonnes, LAMP2a (Cuervo *et al.*, 2004). De plus, il a été montré que des cellules avec une répression de LAMP2a ne montrent pas d'altération de la dégradation des protéines de longue demi-vie grâce à une augmentation de la macroautophagie (Massey *et al.*, 2006). Ainsi, l'utilisation de cette forme mutée met en exergue l'intérêt de l'activation de la macroautophagie comme mécanisme d'élimination des agrégats d' α -syn. L'identification de modulateurs spécifiques de cette voie de l'autophagie présente donc un intérêt particulier dans le contexte des synucléinopathies.

Une critique globale pouvant être adressée aux études de neuroprotection, incluant ce travail, est le choix du design expérimental. En effet, comme nous l'avons décrit (Dehay *et al.*, 2015a), la très grande majorité des études utilisent des animaux transgéniques non symptomatiques et administrent les composés de façon concomitante voire prophylactique à l'induction de la toxicité. Ainsi dans le projet 5, il aurait été particulièrement intéressant de réaliser un design en « delayed-start ». Ce design expérimental, similaire à ce qui est utilisé lors des essais cliniques, présente l'intérêt d'induire le processus dégénératif chez tous les animaux en même temps mais d'attendre l'apparition des symptômes pour administrer le composé thérapeutique (Meissner *et al.*, 2011). Notre description de la cinétique de dégénérescence dans le projet 1 nous a d'ailleurs amené à conclure que la période de 3 à 4 semaines après la chirurgie dans ce modèle rat serait la meilleure pour une étude en « delayed-start ».

En terme de stratégie thérapeutique, malgré l'obtention de preuves récentes de l'absence d'effets secondaires liés à l'injection cérébrale répétée de vecteur viraux chez l'humain (Marks *et al.*, 2008; Palfi *et al.*, 2014), l'utilisation des vecteurs viraux en clinique reste problématique tant par la complexité de la production virale que par l'approche invasive nécessaire. Ainsi, l'identification d'activateur pharmacologique de l'autophagie présente un intérêt important et croissant. Une série de publications discutant l'intérêt d'une nouvelle génération de modulateur de l'autophagie est d'ailleurs parue en début d'année (Kroemer, 2015; Levine *et al.*, 2015; Vakifahmetoglu-Norberg *et al.*, 2015). La molécule la plus connue ayant de tels effets est la rapamycine. La rapamycine en venant inhiber le complexe mTORC1 permet notamment de lever la séquestration de TFEB par mTORC1 à la membrane du lysosome et d'activer ainsi l'ensemble des voies de l'autophagie (Settembre *et al.*, 2013). Malgré l'intérêt neuroprotecteur que la rapamycine a pu montrer dans de nombreux modèles de plusieurs maladies neurodégénératives son utilisation, en clinique reste difficilement

faisable du fait des effets secondaires associés à son utilisation au long-terme : pneumonie interstitielle, taux anormalement haut des triglycérides, anémie (Bove *et al.*, 2011). Il apparaît toutefois que son précurseur, le temsirolimus (CCI-779), est utilisé sur le long-terme dans des indications de carcinomes rénaux (Lee and Chapman, 2005). Ce composé a d'ailleurs prouvé son intérêt dans le modèle de surexpression virale de l' α -syn chez le rat (Decressac *et al.*, 2013). Ainsi, si l'avenir de la rapamycine elle-même paraît compromis dans le contexte des maladies neurodégénératives à développement lent, l'utilisation de dérivés sans effets secondaires pourrait être intéressant dans le contexte des maladies neurodégénératives.

Parmi les autres molécules capables d'activer l'autophagie ayant fait l'objet de publication, le tréhalose apparaît comme particulièrement surprenant et intéressant. La capacité de synthèse de ce disaccharide, composé de deux molécules de glucose, a été perdue par les mammifères au cours de l'évolution tout en conservant les enzymes nécessaires à sa dégradation (Arguelles, 2014). Dans le règne végétal, certaines plantes ont aussi conservé cette capacité de biosynthèse. De façon intéressante, les plantes possédant cette capacité peuvent résister à la dessiccation par cristallisation du cytoplasme, maintien du repliement protéique et de l'intégrité des membranes (Penna, 2003). Une capacité conférée aux cellules humaines en cas d'apport de l'opéron tréhalose par surexpression virale (Guo *et al.*, 2000). Des études récentes ont montré l'intérêt d'un traitement au tréhalose dans plusieurs modèles de maladie neurodégénératives à la fois *in vitro* et *in vivo* (Castillo *et al.*, 2013; Dehay *et al.*, 2010; Rodriguez-Navarro *et al.*, 2010; Sarkar *et al.*, 2007). Ces études ont cependant le point commun d'avoir administré le tréhalose par l'eau de boisson des animaux. Malgré l'intérêt de cette administration non invasive, elle ne permet pas de conclure quant à la spécificité de la molécule. En effet, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées : (i) le tréhalose active l'autophagie directement, (ii) la dégradation du tréhalose constitue un apport énergétique bénéfique pour la cellule ou (iii), comme certains auteurs l'ont proposé (Sarkar *et al.*, 2014), le tréhalose agirait comme chaperonne chimique. Ce rôle s'exercerait par un maintien du repliement protéique en remplaçant les molécules d'eau dans la structure (Singer and Lindquist, 1998). Pour tenter d'apporter une réponse à ces questions, nous avons, dans une étude à venir, surexprimé par utilisation d'un vecteur viral l'opéron bactérien humanisé permettant la synthèse du tréhalose. Celui-ci est composé de deux enzymes : tréhalose-6-phosphate synthase et tréhalose-6-phosphatase (Li *et al.*, 2012). En alliant une étude de protéomique *in vitro* et une approche similaire au projet 5 de neuroprotection face à l' α -syn mutée Ala53Thr chez le rongeur, nous espérons confirmer ou infirmer l'intérêt de cette molécule dans le contexte des maladies neurodégénératives.

Nous l'avons vu, l'augmentation de l'autophagie présente un intérêt particulier dans le contexte des maladies neurodégénératives notamment par rapport à l'activation du protéasome qui possède une ouverture de taille limitée dans sa partie 19S empêchant l'élimination d'agrégats protéiques (Rubinsztein *et al.*, 2007). Cependant une question essentielle reste à ce jour sans réponse : l'augmentation de l'autophagie peut-elle être délétère sur le long-terme ? Bien que l'apoptose soit régulièrement associée avec une activation de l'autophagie, l'existence d'une mort cellulaire activée par l'autophagie reste controversée (Kroemer and Levine, 2008). A ma connaissance, il n'existe pas d'étude montrant des effets négatifs de l'activation de l'autophagie. Dans certains cancers, l'autophagie a été associée avec la prolifération des cellules cancéreuses (Levy *et al.*, 2015). Dans ces cas spécifiques l'inhibition de l'autophagie apparaît plus intéressante (Levy *et al.*, 2015) que son activation pouvant favoriser la tumorigénèse. Sur le long-terme, la restriction calorique, un inducteur connu de l'autophagie, recule le délai d'apparition des maladies liées aux vieillissement et diminue la mortalité chez le primate non-humain (Colman *et al.*, 2009; Madeo *et al.*, 2015).

Au cours de ce travail de thèse, je me suis aussi intéressé à la troisième approche proposée dans la **Figure 43**. Le composé anle138b se fixe aux espèces oligomériques d' α -syn et a été décrit comme un modulateur des oligomères et a montré une efficacité dans des modèles de souris infectées avec la protéine prion ainsi que dans un modèle de souris transgénique de la maladie de Parkinson avec surexpression de l' α -syn humaine avec la mutation Ala30Pro (Wagner *et al.*, 2013). Ce composé a de plus montré une affinité spécifique pour les oligomères d' α -syn (Wagner *et al.*, 2013). Nous avons donc choisi de tester l'efficacité de ce composé dans le modèle d'injection des corps de Lewy purifiés chez la souris. Ce composé montre une efficacité intéressante en diminuant la dégénérescence des neurones dopaminergiques. Afin de tester son efficacité dans un design expérimental en « delayed-start », j'ai généré un groupe d'animaux qui vont recevoir le traitement 2 mois après la chirurgie, une fois que le processus neurodégénératif sera initié. L'évaluation conjointe de la neurodégénérescence et de l'étendue de la synucléinopathie associée à ce modèle nous permettra de confirmer son efficacité dans un modèle différent des souris transgéniques utilisées dans la première étude (Levin *et al.*, 2014; Wagner *et al.*, 2013).

PEUT-ON REVERSER LES EFFETS DELETERES INDUITS PAR L'ALPHA-SYNUCLEINE ?

De nombreuses études incluant les nôtres montrent une stabilité au long-terme de l'expression virale (Bourdenx *et al.*, 2015a; Decressac *et al.*, 2012; Van der Perren *et al.*,

2015a). Cependant dans le projet 3, où nos résultats relatifs au développement de nouveaux modèles par utilisations de vecteurs AAV sont présentés, nous observons à 6 mois une diminution de l'expression de l' α -syn humaine alors que ce n'est pas le cas pour l'expression de la GFP. Les deux transgènes sont sous la dépendance de promoteurs différents, Syn-1 et CAG respectivement. Bien que les causes de cette perte d'expression soient inconnues, le paradigme dans lequel nous nous trouvons est intéressant. En effet, il nous permet de nous poser la question : pouvons-nous reverser les dégâts induits par l' α -syn ? Du fait de ce résultat inattendu, notre design expérimental ne nous permet pas de répondre à la question mais la diminution du marquage pour l' α -syn résistant à la digestion par la protéinase K et la diminution de l'accumulation d'ubiquitine monomérique laisse envisager que les neurones ont réussi à compenser les dégâts induits par l' α -syn après la perte d'expression du transgène. Nous n'observons toutefois pas d'amélioration de l'activité locomotrice malgré la diminution de la charge totale d' α -syn humaine ce qui suggère entre autre une dysfonction stable du système dopaminergique initiée par l' α -syn. Pour répondre à cette question il aurait été intéressé de mesurer les taux centraux des monoamines pour questionner la présence d'une altération du turnover dopaminergique.

À ma connaissance, peu d'études ont testé un protocole d'extinction de transgène. Une première étude a utilisé un modèle de souris transgénique inductible exprimant l' α -syn humaine (Lim *et al.*, 2011). Cette étude a montré que l'extinction de l'expression de l' α -syn à un stade déjà symptomatique permet une amélioration des symptômes et une élimination de la synucléinopathie. La seconde étude a utilisé une stratégie d'interférence ARN en utilisant des exosomes contenant des ARN interférents dans un modèle de souris sauvages ou transgéniques exprimant un mutant phospho-mimétique de l' α -syn humaine (Cooper *et al.*, 2014). Cette étude montre que la répression de l'expression de l' α -syn humaine chez des animaux présentant une synucléinopathie établie permet une diminution de cette synucléinopathie (Bourdenx *et al.*, 2014b; Cooper *et al.*, 2014). Si les mécanismes permettant cette récupération fonctionnelle et une élimination de la synucléinopathie restent inconnus, les résultats demeurent fascinants par les possibilités qu'ils laissent entrevoir. En effet, nous pouvons ainsi imaginer qu'une répression partielle de l'expression de l' α -syn pourrait s'avérer bénéfique pour les patients parkinsoniens.

Depuis la description initiale de la phosphorylation de l' α -syn au niveau du résidu Ser129 (Fujiwara *et al.*, 2002) dans les corps de Lewy, de très nombreuses études ont ainsi considéré cette phosphorylation comme une signature de l'état pathologique de la protéine. Une récente étude de protéomique sur des échantillons corticaux de patients parkinsoniens a effectivement montré un enrichissement dans la fraction insoluble de la forme phosphorylée de l' α -syn (Kellie *et al.*, 2014). Cependant, la proportion de cette forme phosphorylée par rapport à la forme native apparaît faible et très variable entre les individus (Kellie *et al.*, 2014). Il reste cependant possible que les conséquences induites par cette modification post-traductionnelle soient suffisamment importantes pour que même une faible quantité d' α -syn phosphorylée puisse induire une cascade d'événements délétères conduisant à la neurodégénérescence.

Sur un plan biochimique, les conséquences de la phosphorylation du résidu Ser129 sont contradictoires. En effet, selon la description initiale, la phosphorylation en Ser129 augmente significativement la formation d'espèces fibrillaires (Fujiwara *et al.*, 2002). Cependant selon une autre étude ayant utilisé plusieurs méthodes de phosphorylation *in vitro* ainsi que des mutants phospho-mimétiques (Ser129Asp), la phosphorylation inhibe la formation d'espèces fibrillaires (Paleologou *et al.*, 2008). Nous sommes ici confrontés à un problème récurrent des études se focalisant sur l'agrégation de l' α -syn : l'absence de réelle caractérisation biochimique des espèces d' α -syn obtenues entraîne des problèmes de sémantique. Les données obtenues dans des études *in vivo* ne permettent pas non plus de conclure quant à la toxicité de la phosphorylation de l' α -syn en Ser129. En effet, alors qu'une première étude démontre l'intérêt thérapeutique de la déphosphorylation de l' α -syn (Lee *et al.*, 2011), une seconde montre au contraire l'intérêt de la surexpression d'une kinase phosphorylant le résidu Ser129 (Oueslati *et al.*, 2013). Il faut cependant remarquer que les deux études ont utilisé des modèles différents de la maladie : une lignée de souris transgénique et un modèle de rat avec surexpression virale de l' α -syn humaine, respectivement. Dans notre projet 1, nous avons notamment montré la dissociation entre la quantité relative d' α -syn phosphorylée en Ser129 et le niveau de dégénérescence chez les différentes espèces étudiées. Nous avons ainsi proposé des conséquences fonctionnelles différentes entre les souris, qui présentent une bonne corrélation entre le niveau d' α -syn phosphorylée et la dégénérescence entre les souches étudiées, et le primate non-humain qui ne présente pas cette covariation. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour

comprendre les conséquences de la phosphorylation en Ser129 de l' α -syn et vérifier son intérêt en développement thérapeutique.

Dans une étude menée en interne au laboratoire, nous nous sommes intéressés aux différents anticorps contre la forme phosphorylée en Ser129 de l' α -syn actuellement commercialisés : Wako, ab51253, ab59264, MJFR1x, 81A. Nous avons réalisé des immunomarquages chez trois espèces de primates non-humains (macaque, marmoset et babouins) ainsi que des rats sauvages ayant reçu ou non une injection de vecteur viral permettant la surexpression de l' α -syn humaine. Nous avons observé une impressionnante diversité dans les marquages réalisés en fonction de l'anticorps utilisé, ce qui soulève la question sur l'interprétation à apporter et les conclusions qui en découlent. Nous sommes actuellement en train de compléter cette étude de caractérisation avec des anticorps supplémentaires. Ce résultat explique pour partie la grande variabilité des données trouvées dans la littérature quant à la phosphorylation en Ser129 de l' α -syn.

HYPOTHESE « PRION » POUR LES SYNUCLEINOPATHIES

Le champ de recherche autour de l'hypothèse « prion » pour la synucléinopathie me paraît faire face à un problème de sémantique en partie du à une caractérisation insuffisante du matériel injecté de manière générale, probablement due à la nécessité de compétences loin du domaine des neurosciences. En effet, les termes d'espèce oligomérique, fibrillaire sont utilisés sans réelle définition biochimique et structurale. A l'exception d'études récentes utilisant des espèces biochimiques particulièrement bien caractérisées (Bousset *et al.*, 2013; Peelaerts *et al.*, 2015), la majorité des études, incluant les nôtres, ont utilisé un inoculum contenant très probablement plusieurs espèces d' α -syn. Concernant les espèces caractérisées par le laboratoire de Ronald Melki, il reste néanmoins à valider l'existence des ces types d'agrégats chez les patients atteints d'une synucléinopathie (Bousset *et al.*, 2013). En effet, les conditions d'agrégation de l'espèce biochimique appelée « Ribbons » sont extrêmement pauvres en sels, probablement peu compatibles avec la physiologie (Bousset *et al.*, 2013). Le modèle développé initialement par le laboratoire de Virginia Lee est basé quant à lui sur l'utilisation de formes fibrillaires pré-agrégées est aussi soumis à cette critique (Luk *et al.*, 2012a; Luk *et al.*, 2012b). Ce modèle est basé sur une agrégation *in vitro* par incubation à température ambiante de monomères d' α -syn sous agitation pendant 5 à 7 jours. Malgré des données de microscopie électronique permettant d'identifier la présence de formes fibrillaires, une quantification précise de la taille ou de la morphologie de ces formes fibrillaires reste

toutefois manquante à ma connaissance. Notre modèle n'échappe pas à cette critique globale. En effet, la première étude a montré la présence d'espèce fibrillaire d' α -syn dans l'inoculum LB mais pas dans l'inoculum noLB (Recasens *et al.*, 2014). Une analyse biochimique plus précise serait un développement particulièrement intéressant pour ce modèle. L'analyse protéomique de fraction insoluble montre une grande diversité d'espèce d' α -syn (Kellie *et al.*, 2014), nous pouvons ainsi imaginer que le fractionnement par sonication préalable à l'injection chez l'animal « libère » un grand nombre d'espèces biochimiques différentes dont le potentiel toxique spécifique à chaque espèce biochimique reste à déterminer. En effet, de façon similaire à ce qui a été décrit pour la protéine prion, il semblerait qu'il existe des souches d' α -syn avec des propriétés différentes en terme de toxicité, de capacité agrégative ou de transmission (Bousset *et al.*, 2013; Rey *et al.*, 2013). En perspective de ce travail, il serait donc intéressant de caractériser précisément les différentes espèces présentes dans les différents inocula et de déterminer leurs propriétés toxiques ou de propagation.

Les résultats obtenus chez la souris dans les modèles relatifs à l'hypothèse « prion » sont intéressants à deux égards. Tout d'abord, nous avons pu reproduire le modèle de dégénérescence chez la souris avec des inocula purifiés à partir de patients sporadiques différents. Ainsi, cela confirme l'existence d'une propriété commune aux inocula LB de la première étude (3 patients obtenus des banques de cerveaux de New York et Barcelone) et ceux de notre étude présentée (projet 6) ici (5 patients provenant de la banque de cerveaux française). En effet, il aurait été envisageable que les premiers échantillons de l'étude de Recasens et collaborateurs aient certaines propriétés spécifiques (présence d'espèces d' α -syn particulièrement toxiques ou susceptibles à l'agrégation) permettant d'induire la cascade d'évènements délétères conduisant à la dégénérescence des neurones dopaminergiques (Recasens *et al.*, 2014). Nous avons été particulièrement étonnés de l'aspect dose-dépendant de l'étendue de la lésion 4 mois après la chirurgie. En effet, l'étude initiale avait utilisé un inoculum avec une concentration de l'ordre de 10pg/ μ l pour une lésion de l'ordre de 20% à 4 mois et nous avons ici utilisé un échantillon deux fois plus concentré (24,5pg/ μ l) pour une lésion d'environ 40% à 4 mois aussi. Ainsi les inocula utilisés semblent posséder des propriétés toxiques équivalentes. Ces résultats ont soulevé la question suivante: les inocula provenant de ces 8 patients sporadiques contiennent-ils une espèce toxique commune ou particulière ? Il est intéressant de remarquer que les inocula utilisés sont des mélanges de fractions sélectionnées sur la base de leur concentration mais issus de patients différents. Le fait que nous n'ayons pas testé la toxicité des fractions de façon individuelle nous empêche de savoir si les fractions possèdent des propriétés particulières ou si elles présentent toutes la même toxicité ? En perspective de ce travail, la caractérisation individuelle des fractions *in*

vitro (toxicité sur culture primaire, mesure de l'agrégation induite dans un test avec la thioflavine-T) ou *in vivo* (toxicité chez la souris) permettrait de répondre à cette question.

Comme dans l'étude *princeps*, il apparaît que chez la souris l'inoculum noLB soit non toxique pour les neurones dopaminergiques (Recasens *et al.*, 2014). De façon intéressante, notre étude de toxicité *in vitro* dans le projet 6 montre une toxicité équivalente, après 7 jours d'incubation, des inocula LB et noLB sur des cultures primaires de neurones dopaminergiques. La cinétique apparaît toutefois légèrement plus rapide pour l'inoculum LB que pour l'inoculum noLB (**Figure 36**). De plus, l'inoculum GCI apparaît avoir la toxicité la plus importante (**Figure 37**). Dans un travail de collaboration non présenté ici, il est apparu que l'inoculum noLB n'était pas toxique pour des cultures primaires de neurones corticaux de rat. Ces résultats suggèrent donc une susceptibilité différente des populations neuronales vis à vis des différents types d'agrégats d' α -syn. De plus, nous pouvons remarquer également cette différence avec l'étude *in vivo* chez la souris dans laquelle l'inoculum noLB est non toxique (**Figure 36 et 38**). Il sera intéressant de comparer les résultats obtenus pour les inocula noLB et LB chez le babouin. En effet, l'étude *princeps* n'avait pas utilisé de primates non-humains ayant reçu l'inoculum noLB comme contrôle mais uniquement des animaux contrôles (Recasens *et al.*, 2014). Les résultats préliminaires du projet 6 chez le babouin montre toutefois une diminution significative de l'activité locomotrice après 18 mois sans distinction du groupe de traitement (i.e. LB ou noLB). De façon similaire, l'analyse en ACP des différents paramètres comportementaux montre une ségrégation des groupes contrôles et traités sans distinction entre les animaux LB ou noLB. Il sera donc intéressant de comparer à 24 mois la dégénérescence dopaminergique chez ces animaux. Bien que ces résultats restent préliminaires, ils semblent soulever une question intéressante : quelles sont les espèces toxiques de l' α -syn ? Le champ de recherche est dominé par l'idée que les espèces toxiques d' α -syn sont les oligomères (Winner *et al.*, 2011). Ces résultats ont toutefois été obtenus chez le rongeur et notre étude suggère une susceptibilité différente chez le primate non-humain. L'aboutissement de notre projet 6 permettra probablement de répondre étant donné la présence de groupes contrôles en plus des groupes expérimentaux et de l'injection dans des sites différents.

La cinétique des modèles utilisant des agrégats de protéines recombinantes présente une variabilité importante dans les résultats malgré des protocoles d'agrégation relativement similaires (Luk *et al.*, 2012a; Masuda-Suzukake *et al.*, 2013). Alors qu'une étude démontre une absence de dégénérescence des neurones dopaminergiques (Masuda-Suzukake *et al.*, 2013), la seconde montre une dégénérescence de l'ordre de 40% après 6 mois, malgré l'utilisation d'une dose 125000 fois plus importante (Luk *et al.*, 2012a). Ces résultats

suggèrent des propriétés particulières des préparations provenant des patients et confirment le faible pouvoir d'agrégation des protéines recombinantes (Jucker and Walker, 2011). L'identification des propriétés spécifiques des agrégats dérivés des tissus humains, qu'elles soient dues à la présence d'un cofacteur ou d'une conformation particulière, reste à faire.

Les tissus que nous avons obtenus des banques de cerveaux possèdent la majorité du temps le diagnostic anatomo-pathologique mixte de maladie de Parkinson/Démence à corps de Lewy. Après interrogation de nos collègues anatomo-pathologistes responsables des cérébrothèques, il apparaît qu'il est impossible de distinguer, à un stade tardif, une maladie de Parkinson d'une démence à corps de Lewy (Charles Duyckaerts, communication personnelle). Malgré nos efforts pour accéder aux dossiers patients, il reste à ce jour difficile d'assurer que les patients ont tous un historique clinique de maladie de Parkinson typique. Comme le montre les tableaux récapitulatifs du projet 6, les patients présentent, en association avec une synucléinopathie, des « lésions de types Alzheimer » de stade IV à VI avec notamment des dépôts neurofibrillaires en absence ou en faible présence de plaques amyloïdes bien que nous ne sachions pas quelles sont les structures cérébrales affectées par ces pathologies. Ainsi, ces patients présentant des dépôts neurofibrillaires en absence de plaques amyloïdes sont définis comme ayant une tauopathie liée à l'âge (« primary age-related tauopathy » - PART). Le fait que PART soit une pathologie distincte, liée à l'âge, ou une phase prodrome d'une future maladie d'Alzheimer reste soumis à un important débat (Crary *et al.*, 2014; Duyckaerts *et al.*, 2015; Jellinger *et al.*, 2015). Bien que la signification pathologique ou physiologique de la présence de ces agrégats de la protéine tau dans la maladie de Parkinson reste inconnue, il serait intéressant d'étudier l'importance de la protéine tau dans notre modèle lié à l'hypothèse « prion ». En perspective de ce travail, deux expériences me paraissent intéressante à mener. Tout d'abord, il serait intéressant de quantifier la protéine tau dans nos inocula LB et no LB issus des mésencéphales et de les comparer avec des préparations faites à partir de cortex par exemple. Ensuite, de façon similaire à ce qui a été fait dans l'étude *princeps* (Recasens *et al.*, 2014), il serait intéressant d'injecter chez l'animal des inocula LB immunodéprimé pour la protéine tau. En effet, il a été montré par le passé une agrégation de tau par l' α -syn suggérant un probable mécanisme commun dans l'agrégation de ces deux protéines (Guo *et al.*, 2013).

Enfin, notre modèle d'injection de corps de Lewy purifiés à partir des cerveaux de patients parkinsoniens présente l'inconvénient, qui fait aussi sa force, d'utiliser du matériel dérivant de l'humain. Lors du processus de purification biochimique, un poids initial allant de 1 à 3g de mésencéphale permet d'obtenir entre 1,5 et 3ml de corps de Lewy concentrés et purifiés dont les concentrations en pg d' α -syn/ μ l sont variables *de facto* en fonction des patients. Ainsi la difficulté que rencontre notre modèle est l'approvisionnement en

échantillons humains. Ces échantillons, extrêmement précieux, sont donc utilisés très rapidement dans le cadre de nos expériences et notamment *in vivo*. Bien que nous n'ayons pas encore de preuves expérimentales relatives à cela, il me paraît probable que la caractérisation individuelle de la toxicité des fractions dérivées de différents patients démontre une certaine variabilité. L'existence d'un « dénominateur » commun à tous ces patients reste donc à déterminer. Face à cette difficulté, quelles solutions peuvent-être mise en place ? Le champ de recherche relatif à la protéine prion a mis en place une technique intéressante d'amplification d'agrégat appelée PMCA (« protein misfolding cyclic amplification »). Cette technique a d'ailleurs déjà été utilisée pour amplifier des agrégats de protéine d' α -syn recombinante face au constat de la lenteur et la grande variabilité du processus d'agrégation spontanée de l' α -syn (Herva *et al.*, 2014). Cette technique a l'avantage de pouvoir amplifier des formes biochimiques pures (Herva *et al.*, 2014). Ainsi, cette technique associée à la caractérisation des différentes espèces biochimiques contenues dans les inocula LB et noLB permettrait l'obtention d'une source stable et reproductible de matériel.

Conclusion

En conclusion, ce travail de thèse démontre donc le rôle central de l' α -syn dans l'étiologie de la maladie de Parkinson et propose des stratégies d'améliorations des modèles animaux existants et des stratégies thérapeutiques s'intéressant soit à la restauration de la fonction de la voie autophagie-lysosome soit à l'inhibition de l'agrégation de l' α -syn. Comme nous l'avons présenté dans l'article récemment publié dans *Lancet Neurology*, la découverte de l' α -syn, il y a 18 ans, a permis de nombreuses avancées dans la compréhension de la maladie de Parkinson et fait maintenant l'objet d'un grand nombre de dépôts de brevets qui aboutiront probablement à des essais cliniques chez l'Homme.

Ce travail de thèse, notamment par l'écriture d'articles didactiques, a été pour moi l'occasion de me rendre compte des similarités importantes dans les processus neurodégénératifs existant dans les différentes protéinopathies. À cet égard, quelles leçons pouvons-nous tirer du champ de recherche sur la maladie d'Alzheimer ? Malgré une ancienneté plus importante de ce champ de recherche par à celui relatif à l' α -syn, il n'existe pas de traitement curatif ou permettant un ralentissement du déclin cognitif associé avec cette maladie. Cet échec a récemment conduit certains auteurs à proposer de rejeter l'hypothèse amyloïde pour la maladie d'Alzheimer (Herrup, 2015). Si l'on met de côté l'aspect provocateur de s'opposer au dogme majoritaire pour la maladie d'Alzheimer, le fait de vouloir s'opposer non pas à l'intérêt de l'hypothèse amyloïde mais à son hégémonie me paraît intéressant. En effet, en ce qui concerne l' α -syn, nous faisons clairement face à une dégénérescence multifactorielle. Le manque d'approche intégrative, notamment par la difficulté importante de concevoir une expérimentation multiparamétrique, nous empêche d'identifier une cascade organisée d'événements et de déterminer le poids relatif des différents éléments délétères identifiés à ce jour : agrégation protéique, blocage des systèmes de dégradation des protéines, dysfonctions mitochondriales ou stress du réticulum endoplasmique par exemple. De plus, il me paraît illusoire qu'une unique stratégie thérapeutique soit suffisante. À l'image des trithérapies utilisées dans la lutte contre le syndrome d'immunodéficience acquise, cette stratégie thérapeutique devra probablement allier plusieurs approches: l'une dirigée directement contre les effets délétères de l' α -syn, l'autre contre l' α -syn elle-même pour enrayer la propagation entre structures anatomiquement connectées et d'autres visant à diminuer l'état inflammatoire central, etc. Il est d'ailleurs probable que les stratégies thérapeutiques employées devront être adaptée à chaque patient vis-à-vis de son stade pathologique ce qui renforce l'intérêt de l'identification de marqueurs biologiques.

Articles didactiques

Publications annexes

*Références
bibliographiques*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahmed, Z., Asi, Y.T., Sailer, A., Lees, A.J., Houlden, H., Revesz, T., Holton, J.L., 2012. The neuropathology, pathophysiology and genetics of multiple system atrophy. *Neuropathology and applied neurobiology* 38, 4-24.
- Alirezaei, M., Kemball, C.C., Flynn, C.T., Wood, M.R., Whitton, J.L., Kiosses, W.B., 2010. Short-term fasting induces profound neuronal autophagy. *Autophagy* 6, 702-710.
- Anfinsen, C.B., Redfield, R.R., Choate, W.L., Page, J., Carroll, W.R., 1954. Studies on the gross structure, cross-linkages, and terminal sequences in ribonuclease. *The Journal of biological chemistry* 207, 201-210.
- Angot, E., Steiner, J.A., Hansen, C., Li, J.Y., Brundin, P., 2010. Are synucleinopathies prion-like disorders? *The Lancet. Neurology* 9, 1128-1138.
- Appel-Cresswell, S., Vilarino-Guell, C., Encarnacion, M., Sherman, H., Yu, I., Shah, B., Weir, D., Thompson, C., Szu-Tu, C., Trinh, J., Aasly, J.O., Rajput, A., Rajput, A.H., Jon Stoessel, A., Farrer, M.J., 2013. Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 28, 811-813.
- Ardiles, A.O., Tapia-Rojas, C.C., Mandal, M., Alexandre, F., Kirkwood, A., Inestrosa, N.C., Palacios, A.G., 2012. Postsynaptic dysfunction is associated with spatial and object recognition memory loss in a natural model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 13835-13840.
- Arguelles, J.C., 2014. Why can't vertebrates synthesize trehalose? *Journal of molecular evolution* 79, 111-116.
- Auluck, P.K., Caraveo, G., Lindquist, S., 2010. alpha-Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annual review of cell and developmental biology* 26, 211-233.
- Bartels, T., Choi, J.G., Selkoe, D.J., 2011. alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* 477, 107-110.
- Bassil, F., Fernagut, P.O., Bezard, E., Meissner, W.G., 2014. Insulin, IGF-1 and GLP-1 signaling in neurodegenerative disorders: targets for disease modification? *Progress in neurobiology* 118, 1-18.
- Bastide, M.F., Meissner, W.G., Picconi, B., Fasano, S., Fernagut, P.O., Feyder, M., Francardo, V., Alcaer, C., Ding, Y., Brambilla, R., Fisone, G., Jon Stoessel, A., Bourdenx, M., Engeln, M., Navailles, S., De Deurwaerdere, P., Ko, W.K., Simola, N., Morelli, M., Groc, L., Rodriguez, M.C., Gurevich, E.V., Quik, M., Morari, M., Mellone, M., Gardoni, F., Tronci, E., Guehl, D., Tison, F., Crossman, A.R., Kang, U.J., Steece-Collier, K., Fox, S., Carta, M., Angela Cenci, M., Bezard, E., 2015. Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology* 132, 96-168.
- Belzung, C., Lemoine, M., 2011. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biology of mood & anxiety disorders* 1, 9.
- Ben-Zvi, A., Miller, E.A., Morimoto, R.I., 2009. Collapse of proteostasis represents an early molecular event in *Caenorhabditis elegans* aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 14914-14919.
- Bendor, J.T., Logan, T.P., Edwards, R.H., 2013. The function of alpha-synuclein. *Neuron* 79, 1044-1066.
- Bezard, E., Dovero, S., Prunier, C., Ravenscroft, P., Chalon, S., Guilloteau, D., Crossman, A.R., Bioulac, B., Brotchie, J.M., Gross, C.E., 2001. Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 6853-6861.
- Bezard, E., Przedborski, S., 2011. A tale on animal models of Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 26, 993-1002.
- Bezard, E., Yue, Z., Kirik, D., Spillantini, M.G., 2013. Animal models of Parkinson's disease: limits and relevance to neuroprotection studies. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 28, 61-70.
- Blesa, J., Przedborski, S., 2014. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Frontiers in neuroanatomy* 8, 155.
- Blocq, M.P., Marinesco, G., 1893. Tremblement parkinsonien hemiplegique. *BIO mem* 9.

- Bloem, B.R., 1992. Postural instability in Parkinson's disease. *Clinical neurology and neurosurgery* 94 Suppl, S41-45.
- Bourdenx, M., Bezdard, E., Dehay, B., 2014a. Lysosomes and alpha-synuclein form a dangerous duet leading to neuronal cell death. *Frontiers in neuroanatomy* 8, 83.
- Bourdenx, M., Dehay, B., Bezdard, E., 2014b. Down-regulating alpha-synuclein for treating synucleopathies. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 29, 1463-1465.
- Bourdenx, M., Dovero, S., Engeln, M., Bido, S., Bastide, M.F., Dutheil, N., Vollenweider, I., Baud, L., Piron, C., Grouthier, V., Boraud, T., Porras, G., Li, Q., Baekelandt, V., Scheller, D., Michel, A., Fernagut, P.O., Georges, F., Courtine, G., Bezdard, E., Dehay, B., 2015a. Lack of additive role of ageing in nigrostriatal neurodegeneration triggered by alpha-synuclein overexpression. *Acta neuropathologica communications* 3, 46.
- Bourdenx, M., Dutheil, N., Bezdard, E., Dehay, B., 2014c. Systemic gene delivery to the central nervous system using Adeno-associated virus. *Frontiers in molecular neuroscience* 7, 50.
- Bourdenx, M., Koulakiotis, N.S., Sanoudou, D., Bezdard, E., Dehay, B., Tsaibopoulos, A., 2015b. Protein aggregation and neurodegeneration in prototypical neurodegenerative diseases: Examples of amyloidopathies, tauopathies and synucleinopathies. *Progress in neurobiology*.
- Bousset, L., Pieri, L., Ruiz-Arlandis, G., Gath, J., Jensen, P.H., Habenstein, B., Madiona, K., Olieric, V., Bockmann, A., Meier, B.H., Melki, R., 2013. Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nature communications* 4, 2575.
- Bove, J., Martinez-Vicente, M., Dehay, B., Perier, C., Recasens, A., Bombrun, A., Antonsson, B., Vila, M., 2014. BAX channel activity mediates lysosomal disruption linked to Parkinson disease. *Autophagy* 10, 889-900.
- Bove, J., Martinez-Vicente, M., Vila, M., 2011. Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights. *Nature reviews. Neuroscience* 12, 437-452.
- Braak, H., Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica* 82, 239-259.
- Braak, H., de Vos, R.A., Bohl, J., Del Tredici, K., 2006. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neuroscience letters* 396, 67-72.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R.A., Jansen Steur, E.N., Braak, E., 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 24, 197-211.
- Brissaud, E., 1895. *Leçons sur les maladies nerveuses*. Masson: Paris.
- Cambridge, S.B., Gnad, F., Nguyen, C., Bermejo, J.L., Kruger, M., Mann, M., 2011. Systems-wide proteomic analysis in mammalian cells reveals conserved, functional protein turnover. *Journal of proteome research* 10, 5275-5284.
- Camus, S.M., Blois-Heulin, C., Li, Q., Hausberger, M., Bezdard, E., 2013a. Behavioural profiles in captive-bred cynomolgus macaques: towards monkey models of mental disorders? *PLoS one* 8, e62141.
- Camus, S.M., Rochais, C., Blois-Heulin, C., Li, Q., Hausberger, M., Bezdard, E., 2013b. Birth origin differentially affects depressive-like behaviours: are captive-born cynomolgus monkeys more vulnerable to depression than their wild-born counterparts? *PLoS one* 8, e67711.
- Canon, M.H., Perret, M., Vital, A., Bezdard, E., Dehay, B., 2012. Age-dependent alpha-synuclein aggregation in the *Microcebus murinus* lemur primate. *Scientific reports* 2, 910.
- Castillo, K., Nassif, M., Valenzuela, V., Rojas, F., Matus, S., Mercado, G., Court, F.A., van Zundert, B., Hetz, C., 2013. Trehalose delays the progression of amyotrophic lateral sclerosis by enhancing autophagy in motoneurons. *Autophagy* 9, 1308-1320.
- Chartier-Harlin, M.C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., Levecque, C., Larvor, L., Andrieux, J., Hulihan, M., Waucquier, N., Defebvre, L., Amouyel, P., Farrer, M., Destee, A., 2004. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364, 1167-1169.
- Chu, Y., Dodiya, H., Aebischer, P., Olanow, C.W., Kordower, J.H., 2009. Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: relationship to alpha-synuclein inclusions. *Neurobiology of disease* 35, 385-398.
- Colman, R.J., Anderson, R.M., Johnson, S.C., Kastman, E.K., Kosmatka, K.J., Beasley, T.M., Allison, D.B., Cruzen, C., Simmons, H.A., Kemnitz, J.W., Weindruch, R., 2009. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325, 201-204.

- Conway, K.A., Harper, J.D., Lansbury, P.T., 1998. Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nature medicine* 4, 1318-1320.
- Conway, K.A., Lee, S.J., Rochet, J.C., Ding, T.T., Williamson, R.E., Lansbury, P.T., Jr., 2000. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 571-576.
- Cooper, J.M., Wiklander, P.B., Nordin, J.Z., Al-Shawi, R., Wood, M.J., Vithlani, M., Schapira, A.H., Simons, J.P., El-Andaloussi, S., Alvarez-Erviti, L., 2014. Systemic exosomal siRNA delivery reduced alpha-synuclein aggregates in brains of transgenic mice. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 29, 1476-1485.
- Corti, O., Lesage, S., Brice, A., 2011. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiological reviews* 91, 1161-1218.
- Crary, J.F., Trojanowski, J.Q., Schneider, J.A., Abisambra, J.F., Abner, E.L., Alafuzoff, I., Arnold, S.E., Attems, J., Beach, T.G., Bigio, E.H., Cairns, N.J., Dickson, D.W., Gearing, M., Grinberg, L.T., Hof, P.R., Hyman, B.T., Jellinger, K., Jicha, G.A., Kovacs, G.G., Knopman, D.S., Kofler, J., Kukull, W.A., Mackenzie, I.R., Masliah, E., McKee, A., Montine, T.J., Murray, M.E., Neltner, J.H., Santa-Maria, I., Seeley, W.W., Serrano-Pozo, A., Shelanski, M.L., Stein, T., Takao, M., Thal, D.R., Toledo, J.B., Troncoso, J.C., Vonsattel, J.P., White, C.L., 3rd, Wisniewski, T., Woltjer, R.L., Yamada, M., Nelson, P.T., 2014. Primary age-related tauopathy (PART): a common pathology associated with human aging. *Acta neuropathologica* 128, 755-766.
- Cremades, N., Cohen, S.I., Deas, E., Abramov, A.Y., Chen, A.Y., Orte, A., Sandal, M., Clarke, R.W., Dunne, P., Aprile, F.A., Bertoncini, C.W., Wood, N.W., Knowles, T.P., Dobson, C.M., Klenerman, D., 2012. Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of alpha-synuclein. *Cell* 149, 1048-1059.
- Cuervo, A.M., 2011. Cell biology. Autophagy's top chef. *Science* 332, 1392-1393.
- Cuervo, A.M., Dice, J.F., 2000. Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *The Journal of biological chemistry* 275, 31505-31513.
- Cuervo, A.M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P.T., Sulzer, D., 2004. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 305, 1292-1295.
- Dalkara, D., Byrne, L.C., Lee, T., Hoffmann, N.V., Schaffer, D.V., Flannery, J.G., 2012. Enhanced gene delivery to the neonatal retina through systemic administration of tyrosine-mutated AAV9. *Gene therapy* 19, 176-181.
- Daniel, G., Musso, A., Tsika, E., Fiser, A., Glauser, L., Pletnikova, O., Schneider, B.L., Moore, D.J., 2014. alpha-Synuclein-induced dopaminergic neurodegeneration in a rat model of Parkinson's disease occurs independent of ATP13A2 (PARK9). *Neurobiology of disease* 73C, 229-243.
- Danzer, K.M., Haasen, D., Karow, A.R., Moussaud, S., Habeck, M., Giese, A., Kretschmar, H., Hengerer, B., Kostka, M., 2007. Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 9220-9232.
- Dauer, W., Przedborski, S., 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39, 889-909.
- De Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R., Appelmans, F., 1955. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *The Biochemical journal* 60, 604-617.
- Decressac, M., Mattsson, B., Lundblad, M., Weikop, P., Bjorklund, A., 2012. Progressive neurodegenerative and behavioural changes induced by AAV-mediated overexpression of alpha-synuclein in midbrain dopamine neurons. *Neurobiology of disease* 45, 939-953.
- Decressac, M., Mattsson, B., Weikop, P., Lundblad, M., Jakobsson, J., Bjorklund, A., 2013. TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from alpha-synuclein toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, E1817-1826.
- Decressac, M., Ulusoy, A., Mattsson, B., Georgievska, B., Romero-Ramos, M., Kirik, D., Bjorklund, A., 2011. GDNF fails to exert neuroprotection in a rat alpha-synuclein model of Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology* 134, 2302-2311.
- Dehay, B., Bourdenx, M., Gorry, P., Przedborski, S., Vila, M., Hunot, S., Singleton, A., Olanow, C.W., Merchant, K.M., Bezdard, E., Petsko, G.A., Meissner, W.G., 2015a. Targeting alpha-

- synuclein for treatment of Parkinson's disease: mechanistic and therapeutic considerations. *The Lancet. Neurology* 14, 855-866.
- Dehay, B., Bove, J., Rodriguez-Muela, N., Perier, C., Recasens, A., Boya, P., Vila, M., 2010. Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 12535-12544.
- Dehay, B., Dalkara, D., Dovero, S., Li, Q., Bezard, E., 2012a. Systemic scAAV9 variant mediates brain transduction in newborn rhesus macaques. *Scientific reports* 2, 253.
- Dehay, B., Martinez-Vicente, M., Caldwell, G.A., Caldwell, K.A., Yue, Z., Cookson, M.R., Klein, C., Vila, M., Bezard, E., 2013. Lysosomal impairment in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 28, 725-732.
- Dehay, B., Ramirez, A., Martinez-Vicente, M., Perier, C., Canron, M.H., Doudnikoff, E., Vital, A., Vila, M., Klein, C., Bezard, E., 2012b. Loss of P-type ATPase ATP13A2/PARK9 function induces general lysosomal deficiency and leads to Parkinson disease neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 9611-9616.
- Dehay, B., Vila, M., Bezard, E., Brundin, P., Kordower, J.H., 2015b. Alpha-synuclein propagation: New insights from animal models. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*.
- Delwaide, P.J., Sabbatino, M., Delwaide, C., 1986. Some pathophysiological aspects of the parkinsonian rigidity. *Journal of neural transmission. Supplementum* 22, 129-139.
- Dickson, D.W., Braak, H., Duda, J.E., Duyckaerts, C., Gasser, T., Halliday, G.M., Hardy, J., Leverenz, J.B., Del Tredici, K., Wszolek, Z.K., Litvan, I., 2009. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *The Lancet. Neurology* 8, 1150-1157.
- Dill, K.A., Chan, H.S., 1997. From Levinthal to pathways to funnels. *Nature structural biology* 4, 10-19.
- Dill, K.A., MacCallum, J.L., 2012. The protein-folding problem, 50 years on. *Science* 338, 1042-1046.
- Douglas, P.M., Dillin, A., 2010. Protein homeostasis and aging in neurodegeneration. *The Journal of cell biology* 190, 719-729.
- Duque, S., Joussemet, B., Riviere, C., Marais, T., Dubreil, L., Douar, A.-M., Fyfe, J., Moullier, P., Colle, M.-A., Barkats, M., 2009. Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Molecular Therapy* 17, 1187-1196.
- Duyckaerts, C., Braak, H., Brion, J.P., Buee, L., Del Tredici, K., Goedert, M., Halliday, G., Neumann, M., Spillantini, M.G., Tolnay, M., Uchihara, T., 2015. PART is part of Alzheimer disease. *Acta neuropathologica* 129, 749-756.
- Ehringer, H., Hornykiewicz, O., 1960. Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. *Klin. Wochenschr.* 38, 1236-1239.
- Eisenberg, D., Nelson, R., Sawaya, M.R., Balbirnie, M., Sambashivan, S., Ivanova, M.I., Madsen, A.O., Riekel, C., 2006. The structural biology of protein aggregation diseases: Fundamental questions and some answers. *Accounts of chemical research* 39, 568-575.
- El-Agnaf, O.M., Salem, S.A., Paleologou, K.E., Cooper, L.J., Fullwood, N.J., Gibson, M.J., Curran, M.D., Court, J.A., Mann, D.M., Ikeda, S., Cookson, M.R., Hardy, J., Allsop, D., 2003. Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17, 1945-1947.
- Ellis, R.J., van der Vies, S.M., Hemmingsen, S.M., 1989. The molecular chaperone concept. *Biochemical Society symposium* 55, 145-153.
- Emmanouilidou, E., Melachroinou, K., Roumeliotis, T., Garbis, S.D., Ntzouni, M., Margaritis, L.H., Stefanis, L., Vekrellis, K., 2010. Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 6838-6851.
- Engeln, M., Bastide, M.F., Toulme, E., Dehay, B., Bourdenx, M., Doudnikoff, E., Li, Q., Gross, C.E., Boue-Grabot, E., Pisani, A., Bezard, E., Fernagut, P.O., 2014. Selective Inactivation of Striatal FosB/DeltaFosB-Expressing Neurons Alleviates L-Dopa-Induced Dyskinesia. *Biological psychiatry*.

- Engeln, M., Fasano, S., Ahmed, S.H., Cador, M., Baekelandt, V., Bezard, E., Fernagut, P.O., 2013. Levodopa gains psychostimulant-like properties after nigral dopaminergic loss. *Annals of neurology* 74, 140-144.
- Eskelinen, E.L., 2005. Doctor Jekyll and Mister Hyde: autophagy can promote both cell survival and cell death. *Cell death and differentiation* 12 Suppl 2, 1468-1472.
- Eslamboli, A., Romero-Ramos, M., Burger, C., Bjorklund, T., Muzyczka, N., Mandel, R.J., Baker, H., Ridley, R.M., Kirik, D., 2007. Long-term consequences of human alpha-synuclein overexpression in the primate ventral midbrain. *Brain : a journal of neurology* 130, 799-815.
- Farrer, M., Kachergus, J., Forno, L., Lincoln, S., Wang, D.S., Hulihan, M., Maraganore, D., Gwinn-Hardy, K., Wszolek, Z., Dickson, D., Langston, J.W., 2004. Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Annals of neurology* 55, 174-179.
- Fernagut, P.O., Dehay, B., Maillard, A., Bezard, E., Perez, P., Pavy-Le Traon, A., Rascol, O., Foubert-Samier, A., Tison, F., Meissner, W.G., 2014. Multiple system atrophy: a prototypical synucleinopathy for disease-modifying therapeutic strategies. *Neurobiology of disease* 67, 133-139.
- Foust, K.D., Nurre, E., Montgomery, C.L., Hernandez, A., Chan, C.M., Kaspar, B.K., 2009. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nature biotechnology* 27, 59-65.
- Foust, K.D., Wang, X., McGovern, V.L., Braun, L., Bevan, A.K., Haidet, A.M., Le, T.T., Morales, P.R., Rich, M.M., Burghes, A.H., Kaspar, B.K., 2010. Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nature biotechnology* 28, 271-274.
- Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M.S., Shen, J., Takio, K., Iwatsubo, T., 2002. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nature cell biology* 4, 160-164.
- Gammon, K., 2014. Neurodegenerative disease: brain windfall. *Nature* 515, 299-300.
- George, J.M., Jin, H., Woods, W.S., Clayton, D.F., 1995. Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron* 15, 361-372.
- Giasson, B.I., Duda, J.E., Murray, I.V., Chen, Q., Souza, J.M., Hurtig, H.I., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2000. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* 290, 985-989.
- Giasson, B.I., Murray, I.V., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2001. A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *The Journal of biological chemistry* 276, 2380-2386.
- Gitler, A.D., Chesi, A., Geddie, M.L., Strathearn, K.E., Hamamichi, S., Hill, K.J., Caldwell, K.A., Caldwell, G.A., Cooper, A.A., Rochet, J.C., Lindquist, S., 2009. Alpha-synuclein is part of a diverse and highly conserved interaction network that includes PARK9 and manganese toxicity. *Nature genetics* 41, 308-315.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Del Tredici, K., Braak, H., 2013. 100 years of Lewy pathology. *Nature reviews. Neurology* 9, 13-24.
- Gomez-Tortosa, E., Newell, K., Irizarry, M.C., Albert, M., Growdon, J.H., Hyman, B.T., 1999. Clinical and quantitative pathologic correlates of dementia with Lewy bodies. *Neurology* 53, 1284-1291.
- Gould, N., Mor, D.E., Lightfoot, R., Malkus, K., Giasson, B., Ischiropoulos, H., 2014. Evidence of native alpha-synuclein conformers in the human brain. *The Journal of biological chemistry* 289, 7929-7934.
- Gousset, K., Schiff, E., Langevin, C., Marijanovic, Z., Caputo, A., Browman, D.T., Chenouard, N., de Chaumont, F., Martino, A., Enninga, J., Olivo-Marin, J.C., Mannel, D., Zurzolo, C., 2009. Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nature cell biology* 11, 328-336.
- Graham, D.G., 1978. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Molecular pharmacology* 14, 633-643.
- Graham, J.G., Oppenheimer, D.R., 1969. Orthostatic hypotension and nicotine sensitivity in a case of multiple system atrophy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 32, 28-34.
- Guardia-Laguarta, C., Area-Gomez, E., Rub, C., Liu, Y., Magrane, J., Becker, D., Voos, W., Schon, E.A., Przedborski, S., 2014. alpha-Synuclein is localized to mitochondria-associated ER membranes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34, 249-259.

- Guo, J.L., Covell, D.J., Daniels, J.P., Iba, M., Stieber, A., Zhang, B., Riddle, D.M., Kwong, L.K., Xu, Y., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2013. Distinct alpha-synuclein strains differentially promote tau inclusions in neurons. *Cell* 154, 103-117.
- Guo, N., Puhlev, I., Brown, D.R., Mansbridge, J., Levine, F., 2000. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nature biotechnology* 18, 168-171.
- Haddad, M.R., Donsante, A., Zervas, P., Kaler, S.G., 2013. Fetal Brain-directed AAV Gene Therapy Results in Rapid, Robust, and Persistent Transduction of Mouse Choroid Plexus Epithelia. *Molecular therapy. Nucleic acids* 2, e101.
- Halliday, G.M., Holton, J.L., Revesz, T., Dickson, D.W., 2011. Neuropathology underlying clinical variability in patients with synucleinopathies. *Acta neuropathologica* 122, 187-204.
- Halliday, G.M., Li, Y.W., Blumbergs, P.C., Joh, T.H., Cotton, R.G., Howe, P.R., Blessing, W.W., Geffen, L.B., 1990. Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease. *Annals of neurology* 27, 373-385.
- Hamilton, R.L., 2000. Lewy bodies in Alzheimer's disease: a neuropathological review of 145 cases using alpha-synuclein immunohistochemistry. *Brain pathology* 10, 378-384.
- Hamre, K., Tharp, R., Poon, K., Xiong, X., Smeyne, R.J., 1999. Differential strain susceptibility following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration acts in an autosomal dominant fashion: quantitative analysis in seven strains of *Mus musculus*. *Brain research* 828, 91-103.
- Hanson, J.C., Lippa, C.F., 2009. Lewy body dementia. *International review of neurobiology* 84, 215-228.
- Hartl, F.U., Hayer-Hartl, M., 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-1858.
- Hassler, R., 1938. Zur Pathologie der Paralysis agitans und des postenzephalitischen Parkinsonismus. *J. Psychol. Neurol.* 48, 387-476.
- Hawkes, C.H., Del Tredici, K., Braak, H., 2009. Parkinson's disease: the dual hit theory revisited. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1170, 615-622.
- Heikkila, R.E., Hess, A., Duvoisin, R.C., 1984. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. *Science* 224, 1451-1453.
- Herrup, K., 2015. The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nature neuroscience* 18, 794-799.
- Herva, M.E., Zibae, S., Fraser, G., Barker, R.A., Goedert, M., Spillantini, M.G., 2014. Anti-amyloid compounds inhibit alpha-synuclein aggregation induced by protein misfolding cyclic amplification (PMCA). *The Journal of biological chemistry* 289, 11897-11905.
- Holmqvist, S., Chutna, O., Bousset, L., Aldrin-Kirk, P., Li, W., Bjorklund, T., Wang, Z.Y., Roybon, L., Melki, R., Li, J.Y., 2014. Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats. *Acta neuropathologica* 128, 805-820.
- Hornykiewicz, O., 1975. Parkinsonism induced by dopaminergic antagonists. *Advances in neurology* 9, 155-164.
- Inestrosa, N.C., Reyes, A.E., Chacon, M.A., Cerpa, W., Villalon, A., Montiel, J., Merabachvili, G., Aldunate, R., Bozinovic, F., Aboitiz, F., 2005. Human-like rodent amyloid-beta-peptide determines Alzheimer pathology in aged wild-type *Octodon degu*. *Neurobiology of aging* 26, 1023-1028.
- Irwin, D.J., Abrams, J.Y., Schonberger, L.B., Leschek, E.W., Mills, J.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 2013a. Evaluation of potential infectivity of Alzheimer and Parkinson disease proteins in recipients of cadaver-derived human growth hormone. *JAMA neurology* 70, 462-468.
- Irwin, D.J., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 2013b. Parkinson's disease dementia: convergence of alpha-synuclein, tau and amyloid-beta pathologies. *Nature reviews. Neuroscience* 14, 626-636.
- Iwatsubo, T., Yamaguchi, H., Fujimuro, M., Yokosawa, H., Ihara, Y., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 1996. Purification and characterization of Lewy bodies from the brains of patients with diffuse Lewy body disease. *The American journal of pathology* 148, 1517-1529.
- Jahn, T.R., Radford, S.E., 2005. The Yin and Yang of protein folding. *The FEBS journal* 272, 5962-5970.
- Jankovic, J., 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 79, 368-376.
- Jarrett, J.T., Lansbury, P.T., Jr., 1993. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73, 1055-1058.

- Jaunmuktane, Z., Mead, S., Ellis, M., Wadsworth, J.D., Nicoll, A.J., Kenny, J., Launchbury, F., Linehan, J., Richard-Loendt, A., Walker, A.S., Rudge, P., Collinge, J., Brandner, S., 2015. Evidence for human transmission of amyloid-beta pathology and cerebral amyloid angiopathy. *Nature* 525, 247-250.
- Jellinger, K.A., 1991. Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Molecular and chemical neuropathology / sponsored by the International Society for Neurochemistry and the World Federation of Neurology and research groups on neurochemistry and cerebrospinal fluid* 14, 153-197.
- Jellinger, K.A., 2009. Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *Journal of neural transmission* 116, 1111-1162.
- Jellinger, K.A., Alafuzoff, I., Attems, J., Beach, T.G., Cairns, N.J., Crary, J.F., Dickson, D.W., Hof, P.R., Hyman, B.T., Jack, C.R., Jr., Jicha, G.A., Knopman, D.S., Kovacs, G.G., Mackenzie, I.R., Masliah, E., Montine, T.J., Nelson, P.T., Schmitt, F., Schneider, J.A., Serrano-Pozo, A., Thal, D.R., Toledo, J.B., Trojanowski, J.Q., Troncoso, J.C., Vonsattel, J.P., Wisniewski, T., 2015. PART, a distinct tauopathy, different from classical sporadic Alzheimer disease. *Acta neuropathologica* 129, 757-762.
- Jucker, M., Walker, L.C., 2011. Pathogenic protein seeding in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Annals of neurology* 70, 532-540.
- Jucker, M., Walker, L.C., 2013. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* 501, 45-51.
- Kellie, J.F., Higgs, R.E., Ryder, J.W., Major, A., Beach, T.G., Adler, C.H., Merchant, K., Knierman, M.D., 2014. Quantitative measurement of intact alpha-synuclein proteoforms from post-mortem control and Parkinson's disease brain tissue by intact protein mass spectrometry. *Scientific reports* 4, 5797.
- Kendrew, J.C., Bodo, G., Dintzis, H.M., Parrish, R.G., Wyckoff, H., Phillips, D.C., 1958. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* 181, 662-666.
- Kett, L.R., Stiller, B., Bernath, M.M., Tasset, I., Blesa, J., Jackson-Lewis, V., Chan, R.B., Zhou, B., Di Paolo, G., Przedborski, S., Cuervo, A.M., Dauer, W.T., 2015. alpha-Synuclein-independent histopathological and motor deficits in mice lacking the endolysosomal Parkinsonism protein Atp13a2. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35, 5724-5742.
- Klein, C., Westenberger, A., 2012. Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2, a008888.
- Kordower, J.H., Chu, Y., Hauser, R.A., Freeman, T.B., Olanow, C.W., 2008. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nature medicine* 14, 504-506.
- Kowall, N.W., Hantraye, P., Brouillet, E., Beal, M.F., McKee, A.C., Ferrante, R.J., 2000. MPTP induces alpha-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons. *Neuroreport* 11, 211-213.
- Kramer, M.L., Schulz-Schaeffer, W.J., 2007. Presynaptic alpha-synuclein aggregates, not Lewy bodies, cause neurodegeneration in dementia with Lewy bodies. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 1405-1410.
- Kroemer, G., 2015. Autophagy: a druggable process that is deregulated in aging and human disease. *The Journal of clinical investigation* 125, 1-4.
- Kroemer, G., Levine, B., 2008. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 1004-1010.
- Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., Przuntek, H., Epplen, J.T., Schols, L., Riess, O., 1998. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nature genetics* 18, 106-108.
- Kuchibhotla, K.V., Wegmann, S., Kopeikina, K.J., Hawkes, J., Rudinskiy, N., Andermann, M.L., Spires-Jones, T.L., Bacskai, B.J., Hyman, B.T., 2014. Neurofibrillary tangle-bearing neurons are functionally integrated in cortical circuits in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 510-514.
- Langston, J.W., Forno, L.S., Rebert, C.S., Irwin, I., 1984. Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain research* 292, 390-394.

- Lashuel, H.A., Overk, C.R., Oueslati, A., Masliah, E., 2013. The many faces of alpha-synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nature reviews. Neuroscience* 14, 38-48.
- Lee, J.H., McBrayer, M.K., Wolfe, D.M., Haslett, L.J., Kumar, A., Sato, Y., Lie, P.P., Mohan, P., Coffey, E.E., Kompella, U., Mitchell, C.H., Lloyd-Evans, E., Nixon, R.A., 2015. Presenilin 1 Maintains Lysosomal Ca(2+) Homeostasis via TRPML1 by Regulating vATPase-Mediated Lysosome Acidification. *Cell reports* 12, 1430-1444.
- Lee, J.H., Yu, W.H., Kumar, A., Lee, S., Mohan, P.S., Peterhoff, C.M., Wolfe, D.M., Martinez-Vicente, M., Massey, A.C., Sovak, G., Uchiyama, Y., Westaway, D., Cuervo, A.M., Nixon, R.A., 2010. Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* 141, 1146-1158.
- Lee, K.W., Chen, W., Junn, E., Im, J.Y., Grosso, H., Sonsalla, P.K., Feng, X., Ray, N., Fernandez, J.R., Chao, Y., Masliah, E., Voronkov, M., Braithwaite, S.P., Stock, J.B., Mouradian, M.M., 2011. Enhanced phosphatase activity attenuates alpha-synucleinopathy in a mouse model. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 6963-6971.
- Lee, V.W., Chapman, J.R., 2005. Sirolimus: its role in nephrology. *Nephrology* 10, 606-614.
- Lesage, S., Anheim, M., Letournel, F., Bousset, L., Honore, A., Rozas, N., Pieri, L., Madiona, K., Durr, A., Melki, R., Verny, C., Brice, A., French Parkinson's Disease Genetics Study, G., 2013. G51D alpha-synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Annals of neurology* 73, 459-471.
- Levin, J., Schmidt, F., Boehm, C., Prix, C., Botzel, K., Ryazanov, S., Leonov, A., Griesinger, C., Giese, A., 2014. The oligomer modulator anle138b inhibits disease progression in a Parkinson mouse model even with treatment started after disease onset. *Acta neuropathologica* 127, 779-780.
- Levine, B., Kroemer, G., 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27-42.
- Levine, B., Packer, M., Codogno, P., 2015. Development of autophagy inducers in clinical medicine. *The Journal of clinical investigation* 125, 14-24.
- Levy, J., Cacheux, W., Bara, M.A., L'Hermitte, A., Lepage, P., Fraudeau, M., Trentesaux, C., Lemarchand, J., Durand, A., Crain, A.M., Marchiol, C., Renault, G., Dumont, F., Letourneur, F., Delacre, M., Schmitt, A., Terris, B., Perret, C., Chamailard, M., Couty, J.P., Romagnolo, B., 2015. Intestinal inhibition of Atg7 prevents tumour initiation through a microbiome-influenced immune response and suppresses tumour growth. *Nature cell biology* 17, 1062-1073.
- Li, H., Su, H., Kim, S.B., Chang, Y.K., Hong, S.K., Seo, Y.G., Kim, C.J., 2012. Enhanced production of trehalose in Escherichia coli by homologous expression of otsBA in the presence of the trehalase inhibitor, validamycin A, at high osmolarity. *Journal of bioscience and bioengineering* 113, 224-232.
- Li, J.Y., Englund, E., Holton, J.L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A.J., Lashley, T., Quinn, N.P., Rehncrona, S., Bjorklund, A., Widner, H., Revesz, T., Lindvall, O., Brundin, P., 2008. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nature medicine* 14, 501-503.
- Lim, S., Haque, M.M., Kim, D., Kim, D.J., Kim, Y.K., 2014. Cell-based Models To Investigate Tau Aggregation. *Computational and structural biotechnology journal* 12, 7-13.
- Lim, Y., Kehm, V.M., Lee, E.B., Soper, J.H., Li, C., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2011. alpha-Syn suppression reverses synaptic and memory defects in a mouse model of dementia with Lewy bodies. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 10076-10087.
- Lo Bianco, C., Deglon, N., Pralong, W., Aebischer, P., 2004. Lentiviral nigral delivery of GDNF does not prevent neurodegeneration in a genetic rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease* 17, 283-289.
- Low, K., Aebischer, P., Schneider, B.L., 2013. Direct and retrograde transduction of nigral neurons with AAV6, 8, and 9 and intraneuronal persistence of viral particles. *Human gene therapy* 24, 613-629.
- Luk, K.C., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2012a. Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* 338, 949-953.
- Luk, K.C., Kehm, V.M., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2012b. Intracerebral inoculation of pathological alpha-synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative alpha-synucleinopathy in mice. *The Journal of experimental medicine* 209, 975-986.

- Luzio, J.P., Pryor, P.R., Bright, N.A., 2007. Lysosomes: fusion and function. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 622-632.
- Madeo, F., Zimmermann, A., Maiuri, M.C., Kroemer, G., 2015. Essential role for autophagy in life span extension. *The Journal of clinical investigation* 125, 85-93.
- Maji, S.K., Perrin, M.H., Sawaya, M.R., Jessberger, S., Vadodaria, K., Rissman, R.A., Singru, P.S., Nilsson, K.P., Simon, R., Schubert, D., Eisenberg, D., Rivier, J., Sawchenko, P., Vale, W., Riek, R., 2009. Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. *Science* 325, 328-332.
- Marks, W.J., Jr., Bartus, R.T., Siffert, J., Davis, C.S., Lozano, A., Boulis, N., Vitek, J., Stacy, M., Turner, D., Verhagen, L., Bakay, R., Watts, R., Guthrie, B., Jankovic, J., Simpson, R., Tagliati, M., Alterman, R., Stern, M., Baltuch, G., Starr, P.A., Larson, P.S., Ostrem, J.L., Nutt, J., Kiebertz, K., Kordower, J.H., Olanow, C.W., 2010. Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *The Lancet. Neurology* 9, 1164-1172.
- Marks, W.J., Jr., Ostrem, J.L., Verhagen, L., Starr, P.A., Larson, P.S., Bakay, R.A., Taylor, R., Cahn-Weiner, D.A., Stoessl, A.J., Olanow, C.W., Bartus, R.T., 2008. Safety and tolerability of intraputamenal delivery of CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *The Lancet. Neurology* 7, 400-408.
- Marsden, C.D., 1961. Pigmentation in the nucleus substantiae nigrae of mammals. *Journal of anatomy* 95, 256-261.
- Marshall, R.S., Li, F., Gemperline, D.C., Book, A.J., Vierstra, R.D., 2015. Autophagic Degradation of the 26S Proteasome Is Mediated by the Dual ATG8/Ubiquitin Receptor RPN10 in Arabidopsis. *Molecular cell* 58, 1053-1066.
- Marshall, R.S., Vierstra, R.D., 2015. Eat or be eaten: the autophagic plight of inactive 26S proteasomes. *Autophagy*, 0.
- Martinez-Vicente, M., Tallozy, Z., Kaushik, S., Massey, A.C., Mazzulli, J., Mosharov, E.V., Hodara, R., Fredenburg, R., Wu, D.C., Follenzi, A., Dauer, W., Przedborski, S., Ischiropoulos, H., Lansbury, P.T., Sulzer, D., Cuervo, A.M., 2008. Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *The Journal of clinical investigation* 118, 777-788.
- Martinez-Vicente, M., Vila, M., 2013. Alpha-synuclein and protein degradation pathways in Parkinson's disease: a pathological feed-back loop. *Experimental neurology* 247, 308-313.
- Massey, A.C., Kaushik, S., Sovak, G., Kiffin, R., Cuervo, A.M., 2006. Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 5805-5810.
- Masuda-Suzukake, M., Nonaka, T., Hosokawa, M., Oikawa, T., Arai, T., Akiyama, H., Mann, D.M., Hasegawa, M., 2013. Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. *Brain : a journal of neurology* 136, 1128-1138.
- Mattar, C.N., Waddington, S.N., Biswas, A., Johana, N., Ng, X.W., Fisk, A.S., Fisk, N.M., Tan, L.G., Rahim, A.A., Buckley, S.M., Tan, M.H., Lu, J., Choolani, M., Chan, J.K., 2013. Systemic delivery of scAAV9 in fetal macaques facilitates neuronal transduction of the central and peripheral nervous systems. *Gene therapy* 20, 69-83.
- Mattson, M.P., Magnus, T., 2006. Ageing and neuronal vulnerability. *Nature reviews. Neuroscience* 7, 278-294.
- McCann, H., Cartwright, H., Halliday, G.M., 2015. Neuropathology of alpha-synuclein propagation and braak hypothesis. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*.
- McCormack, A.L., Mak, S.K., Shenasa, M., Langston, W.J., Forno, L.S., Di Monte, D.A., 2008. Pathologic modifications of alpha-synuclein in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated squirrel monkeys. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 67, 793-802.
- Meissner, W.G., Frasier, M., Gasser, T., Goetz, C.G., Lozano, A., Piccini, P., Obeso, J.A., Rascol, O., Schapira, A., Voon, V., Weiner, D.M., Tison, F., Bezard, E., 2011. Priorities in Parkinson's disease research. *Nature reviews. Drug discovery* 10, 377-393.
- Mendez, I., Vinuela, A., Astradsson, A., Mukhida, K., Hallett, P., Robertson, H., Tierney, T., Holness, R., Dagher, A., Trojanowski, J.Q., Isacson, O., 2008. Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nature medicine* 14, 507-509.

- Milo, R., 2013. What is the total number of protein molecules per cell volume? A call to rethink some published values. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 35, 1050-1055.
- Miyakawa, S., Ogino, M., Funabe, S., Uchino, A., Shimo, Y., Hattori, N., Ichinoe, M., Mikami, T., Saegusa, M., Nishiyama, K., Mori, H., Mizuno, Y., Murayama, S., Mochizuki, H., 2013. Lewy body pathology in a patient with a homozygous parkin deletion. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 28, 388-391.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., 2004. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular biology of the cell* 15, 1101-1111.
- Morimoto, R.I., Cuervo, A.M., 2014. Proteostasis and the aging proteome in health and disease. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 69 Suppl 1, S33-38.
- Mougenot, A.L., Nicot, S., Bencsik, A., Morignat, E., Verchere, J., Lakhdar, L., Legastelois, S., Baron, T., 2012. Prion-like acceleration of a synucleinopathy in a transgenic mouse model. *Neurobiology of aging* 33, 2225-2228.
- Mukherjee, A., Morales-Scheihing, D., Butler, P.C., Soto, C., 2015. Type 2 diabetes as a protein misfolding disease. *Trends in molecular medicine* 21, 439-449.
- Nuber, S., Harmuth, F., Kohl, Z., Adame, A., Trejo, M., Schonig, K., Zimmermann, F., Bauer, C., Casadei, N., Giel, C., Calaminus, C., Pichler, B.J., Jensen, P.H., Muller, C.P., Amato, D., Kornhuber, J., Teismann, P., Yamakado, H., Takahashi, R., Winkler, J., Masliah, E., Riess, O., 2013. A progressive dopaminergic phenotype associated with neurotoxic conversion of alpha-synuclein in BAC-transgenic rats. *Brain : a journal of neurology* 136, 412-432.
- Olgiati, S., Thomas, A., Quadri, M., Breedveld, G.J., Graafland, J., Eussen, H., Douben, H., de Klein, A., Onofrij, M., Bonifati, V., 2015. Early-onset parkinsonism caused by alpha-synuclein gene triplication: Clinical and genetic findings in a novel family. *Parkinsonism & related disorders* 21, 981-986.
- Oliveras-Salva, M., Van der Perren, A., Casadei, N., Stroobants, S., Nuber, S., D'Hooge, R., Van den Haute, C., Baekelandt, V., 2013. rAAV2/7 vector-mediated overexpression of alpha-synuclein in mouse substantia nigra induces protein aggregation and progressive dose-dependent neurodegeneration. *Molecular neurodegeneration* 8, 44.
- Onuchic, J.N., Wolynes, P.G., Luthey-Schulten, Z., Socci, N.D., 1995. Toward an outline of the topography of a realistic protein-folding funnel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 3626-3630.
- Ordenstein, L., 1868. Sur la paralysie agitante et la sclérose en plaques généralisée. *Paris: Delahaye*.
- Osterberg, V.R., Spinelli, K.J., Weston, L.J., Luk, K.C., Woltjer, R.L., Unni, V.K., 2015. Progressive aggregation of alpha-synuclein and selective degeneration of lewy inclusion-bearing neurons in a mouse model of parkinsonism. *Cell reports* 10, 1252-1260.
- Oueslati, A., Schneider, B.L., Aebischer, P., Lashuel, H.A., 2013. Polo-like kinase 2 regulates selective autophagic alpha-synuclein clearance and suppresses its toxicity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, E3945-3954.
- Pahuja, R., Seth, K., Shukla, A., Shukla, R.K., Bhatnagar, P., Chauhan, L.K., Saxena, P.N., Arun, J., Chaudhari, B.P., Patel, D.K., Singh, S.P., Shukla, R., Khanna, V.K., Kumar, P., Chaturvedi, R.K., Gupta, K.C., 2015. Trans-blood brain barrier delivery of dopamine-loaded nanoparticles reverses functional deficits in parkinsonian rats. *ACS nano* 9, 4850-4871.
- Paleologou, K.E., Schmid, A.W., Rospigliosi, C.C., Kim, H.Y., Lamberto, G.R., Fredenburg, R.A., Lansbury, P.T., Jr., Fernandez, C.O., Eliezer, D., Zweckstetter, M., Lashuel, H.A., 2008. Phosphorylation at Ser-129 but not the phosphomimics S129E/D inhibits the fibrillation of alpha-synuclein. *The Journal of biological chemistry* 283, 16895-16905.
- Palfi, S., Gurruchaga, J.M., Ralph, G.S., Lepetit, H., Lavisse, S., Buttery, P.C., Watts, C., Miskin, J., Kelleher, M., Deeley, S., Iwamuro, H., Lefaucheur, J.P., Thiriez, C., Felon, G., Lucas, C., Brugières, P., Gabriel, I., Abhay, K., Drouot, X., Tani, N., Kas, A., Ghaleh, B., Le Corvoisier, P., Dolphin, P., Breen, D.P., Mason, S., Guzman, N.V., Mazarakis, N.D., Radcliffe, P.A., Harrop, R., Kingsman, S.M., Rascol, O., Naylor, S., Barker, R.A., Hantraye, P., Remy, P., Cesaro, P., Mitrophanous, K.A., 2014. Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet* 383, 1138-1146.

- Papp, M.I., Kahn, J.E., Lantos, P.L., 1989. Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome). *Journal of the neurological sciences* 94, 79-100.
- Parent, M., Parent, A., 2010. Substantia nigra and Parkinson's disease: a brief history of their long and intimate relationship. *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques* 37, 313-319.
- Parkinson, J., 1817. *An essay on the shaking palsy*. Sherwood, Nelly and Jones: London.
- Pasanen, P., Myllykangas, L., Siitonen, M., Raunio, A., Kaakkola, S., Lyytinen, J., Tienari, P.J., Poyhonen, M., Paetau, A., 2014. A novel alpha-synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology. *Neurobiology of aging*.
- Peelaerts, W., Bousset, L., Van der Perren, A., Moskalyuk, A., Pulizzi, R., Giugliano, M., Van den Haute, C., Melki, R., Baekelandt, V., 2015. alpha-Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature* 522, 340-344.
- Penna, S., 2003. Building stress tolerance through over-producing trehalose in transgenic plants. *Trends in plant science* 8, 355-357.
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I., Nussbaum, R.L., 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045-2047.
- Proukakis, C., Dudzik, C.G., Brier, T., MacKay, D.S., Cooper, J.M., Millhauser, G.L., Houlden, H., Schapira, A.H., 2013. A novel alpha-synuclein missense mutation in Parkinson disease. *Neurology* 80, 1062-1064.
- Prusiner, S.B., Woerman, A.L., Mordes, D.A., Watts, J.C., Rampersaud, R., Berry, D.B., Patel, S., Oehler, A., Lowe, J.K., Kravitz, S.N., Geschwind, D.H., Glidden, D.V., Halliday, G.M., Middleton, L.T., Gentleman, S.M., Grinberg, L.T., Giles, K., 2015. Evidence for alpha-synuclein prions causing multiple system atrophy in humans with parkinsonism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Przedborski, S., Chen, Q., Vila, M., Giasson, B.I., Djaldatti, R., Vukosavic, S., Souza, J.M., Jackson-Lewis, V., Lee, V.M., Ischiropoulos, H., 2001. Oxidative post-translational modifications of alpha-synuclein in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 76, 637-640.
- Quinn, N.P., 1997. Parkinson's disease: clinical features. *Bailliere's clinical neurology* 6, 1-13.
- Rahim, A.A., Wong, A.M., Ahmadi, S., Hofer, K., Buckley, S.M., Hughes, D.A., Nathwani, A.N., Baker, A.H., McVey, J.H., Cooper, J.D., Waddington, S.N., 2012. In utero administration of Ad5 and AAV pseudotypes to the fetal brain leads to efficient, widespread and long-term gene expression. *Gene therapy* 19, 936-946.
- Ramonet, D., Podhajska, A., Stafa, K., Sonnay, S., Trancikova, A., Tsika, E., Pletnikova, O., Troncoso, J.C., Glauser, L., Moore, D.J., 2012. PARK9-associated ATP13A2 localizes to intracellular acidic vesicles and regulates cation homeostasis and neuronal integrity. *Human molecular genetics* 21, 1725-1743.
- Recasens, A., Dehay, B., 2014. Alpha-synuclein spreading in Parkinson's disease. *Frontiers in neuroanatomy* 8, 159.
- Recasens, A., Dehay, B., Bove, J., Carballo-Carbajal, I., Dovero, S., Perez-Villalba, A., Fernagut, P.O., Blesa, J., Parent, A., Perier, C., Farinas, I., Obeso, J.A., Bezard, E., Vila, M., 2014. Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger alpha-synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Annals of neurology* 75, 351-362.
- Reinstein, E., Ciechanover, A., 2006. Narrative review: protein degradation and human diseases: the ubiquitin connection. *Annals of internal medicine* 145, 676-684.
- Rey, N.L., Petit, G.H., Bousset, L., Melki, R., Brundin, P., 2013. Transfer of human alpha-synuclein from the olfactory bulb to interconnected brain regions in mice. *Acta neuropathologica* 126, 555-573.
- Reyes, J.F., Rey, N.L., Bousset, L., Melki, R., Brundin, P., Angot, E., 2014. Alpha-synuclein transfers from neurons to oligodendrocytes. *Glia* 62, 387-398.
- Ritossa, F.M., 1964. Experimental Activation of Specific Loci in Polytene Chromosomes of *Drosophila*. *Experimental cell research* 35, 601-607.

- Rochet, J.C., Hay, B.A., Guo, M., 2012. Molecular insights into Parkinson's disease. *Progress in molecular biology and translational science* 107, 125-188.
- Rodriguez-Navarro, J.A., Rodriguez, L., Casarejos, M.J., Solano, R.M., Gomez, A., Perucho, J., Cuervo, A.M., Garcia de Yébenes, J., Mena, M.A., 2010. Trehalose ameliorates dopaminergic and tau pathology in parkin deleted/tau overexpressing mice through autophagy activation. *Neurobiology of disease* 39, 423-438.
- Rubinsztein, D.C., Gestwicki, J.E., Murphy, L.O., Klionsky, D.J., 2007. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nature reviews. Drug discovery* 6, 304-312.
- Sacino, A.N., Brooks, M., McKinney, A.B., Thomas, M.A., Shaw, G., Golde, T.E., Giasson, B.I., 2014a. Brain injection of alpha-synuclein induces multiple proteinopathies, gliosis, and a neuronal injury marker. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34, 12368-12378.
- Sacino, A.N., Brooks, M., Thomas, M.A., McKinney, A.B., Lee, S., Regenhardt, R.W., McGarvey, N.H., Ayers, J.I., Notterpek, L., Borchelt, D.R., Golde, T.E., Giasson, B.I., 2014b. Intramuscular injection of alpha-synuclein induces CNS alpha-synuclein pathology and a rapid-onset motor phenotype in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 10732-10737.
- Sacino, A.N., Brooks, M., Thomas, M.A., McKinney, A.B., McGarvey, N.H., Rutherford, N.J., Ceballos-Diaz, C., Robertson, J., Golde, T.E., Giasson, B.I., 2014c. Amyloidogenic alpha-synuclein seeds do not invariably induce rapid, widespread pathology in mice. *Acta neuropathologica* 127, 645-665.
- Samaranch, L., Salegio, E.A., San Sebastian, W., Kells, A.P., Foust, K.D., Bringas, J.R., Lamarre, C., Forsayeth, J., Kaspar, B.K., Bankiewicz, K.S., 2012. Adeno-associated virus serotype 9 transduction in the central nervous system of nonhuman primates. *Human gene therapy* 23, 382-389.
- Samii, A., Nutt, J.G., Ransom, B.R., 2004. Parkinson's disease. *Lancet* 363, 1783-1793.
- Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D.L., Valenza, M., Gennarino, V.A., Di Malta, C., Donaudo, F., Embrione, V., Polishchuk, R.S., Banfi, S., Parenti, G., Cattaneo, E., Ballabio, A., 2009. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* 325, 473-477.
- Sarkar, S., Chigurupati, S., Raymick, J., Mann, D., Bowyer, J.F., Schmitt, T., Beger, R.D., Hanig, J.P., Schmued, L.C., Paule, M.G., 2014. Neuroprotective effect of the chemical chaperone, trehalose in a chronic MPTP-induced Parkinson's disease mouse model. *Neurotoxicology* 44, 250-262.
- Sarkar, S., Davies, J.E., Huang, Z., Tunnacliffe, A., Rubinsztein, D.C., 2007. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *The Journal of biological chemistry* 282, 5641-5652.
- Schon, E.A., Przedborski, S., 2011. Mitochondria: the next (neuro)generation. *Neuron* 70, 1033-1053.
- Schultheis, P.J., Fleming, S.M., Clippinger, A.K., Lewis, J., Tsunemi, T., Giasson, B., Dickson, D.W., Mazzulli, J.R., Bardgett, M.E., Haik, K.L., Ekhtor, O., Chava, A.K., Howard, J., Gannon, M., Hoffman, E., Chen, Y., Prasad, V., Linn, S.C., Tamargo, R.J., Westbroek, W., Sidransky, E., Krainc, D., Shull, G.E., 2013. Atp13a2-deficient mice exhibit neuronal ceroid lipofuscinosis, limited alpha-synuclein accumulation and age-dependent sensorimotor deficits. *Human molecular genetics* 22, 2067-2082.
- Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V.A., Garcia Arencibia, M., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S.U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P., Sardiello, M., Rubinsztein, D.C., Ballabio, A., 2011. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* 332, 1429-1433.
- Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D.L., Ballabio, A., 2013. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14, 283-296.
- Shive, M.S., Anderson, J.M., 1997. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced drug delivery reviews* 28, 5-24.
- Shrivastava, A.N., Redeker, V., Fritz, N., Pieri, L., Almeida, L.G., Spolidoro, M., Liebmann, T., Bousset, L., Renner, M., Lena, C., Aperia, A., Melki, R., Triller, A., 2015. alpha-synuclein assemblies sequester neuronal alpha3-Na⁺/K⁺-ATPase and impair Na⁺ gradient. *The EMBO journal*.
- Singer, M.A., Lindquist, S., 1998. Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Molecular cell* 1, 639-648.

- Singleton, A.B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., Lincoln, S., Crawley, A., Hanson, M., Maraganore, D., Adler, C., Cookson, M.R., Muenter, M., Baptista, M., Miller, D., Blancato, J., Hardy, J., Gwinn-Hardy, K., 2003. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302, 841.
- Sipe, J.D., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Ikeda, S., Merlini, G., Saraiva, M.J., Westermark, P., 2014. Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis* 21, 221-224.
- Sipe, J.D., Cohen, A.S., 2000. Review: history of the amyloid fibril. *Journal of structural biology* 130, 88-98.
- Sonsalla, P.K., Heikkila, R.E., 1988. Neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and methamphetamine in several strains of mice. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 12, 345-354.
- Spencer, B., Potkar, R., Trejo, M., Rockenstein, E., Patrick, C., Gindi, R., Adame, A., Wyss-Coray, T., Masliah, E., 2009. Beclin 1 gene transfer activates autophagy and ameliorates the neurodegenerative pathology in alpha-synuclein models of Parkinson's and Lewy body diseases. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 13578-13588.
- Stanley-Jones, D., 1956. The anatomy of rigidity and tremor. *The Journal of nervous and mental disease* 124, 163-166.
- Tanaka, M., Kim, Y.M., Lee, G., Junn, E., Iwatsubo, T., Mouradian, M.M., 2004. Aggresomes formed by alpha-synuclein and synphilin-1 are cytoprotective. *The Journal of biological chemistry* 279, 4625-4631.
- Tanik, S.A., Schultheiss, C.E., Volpicelli-Daley, L.A., Brunden, K.R., Lee, V.M., 2013. Lewy body-like alpha-synuclein aggregates resist degradation and impair macroautophagy. *The Journal of biological chemistry* 288, 15194-15210.
- Toyoda, Y., Erkut, C., Pan-Montojo, F., Boland, S., Stewart, M.P., Muller, D.J., Wurst, W., Hyman, A.A., Kurzchalia, T.V., 2014. Products of the Parkinson's disease-related glyoxalase DJ-1, D-lactate and glycolate, support mitochondrial membrane potential and neuronal survival. *Biology open* 3, 777-784.
- Trétiakoff, C., 1919. Contribution à l'étude de l'anatomie pathologique du locus niger de Soemmering avec quelques déductions relatives à la pathogénie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson. *Paris: Jouve*.
- Tsuang, D.W., DiGiacomo, L., Bird, T.D., 2004. Familial occurrence of dementia with Lewy bodies. *The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry* 12, 179-188.
- Ulusoy, A., Rusconi, R., Perez-Revuelta, B.I., Musgrove, R.E., Helwig, M., Winzen-Reichert, B., Di Monte, D.A., 2013. Caudo-rostral brain spreading of alpha-synuclein through vagal connections. *EMBO molecular medicine* 5, 1051-1059.
- Ungerstedt, U., Arbuthnott, G.W., 1970. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain research* 24, 485-493.
- Usenovic, M., Tresse, E., Mazzulli, J.R., Taylor, J.P., Krainc, D., 2012. Deficiency of ATP13A2 leads to lysosomal dysfunction, alpha-synuclein accumulation, and neurotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 4240-4246.
- Uversky, V.N., 2007. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *Journal of neurochemistry* 103, 17-37.
- Vakifahmetoglu-Norberg, H., Xia, H.G., Yuan, J., 2015. Pharmacologic agents targeting autophagy. *The Journal of clinical investigation* 125, 5-13.
- Van der Perren, A., Toelen, J., Casteels, C., Macchi, F., Van Rompuy, A.S., Sarre, S., Casadei, N., Nuber, S., Himmelreich, U., Osorio Garcia, M.I., Michotte, Y., D'Hooge, R., Bormans, G., Van Laere, K., Gijsbers, R., Van den Haute, C., Debyser, Z., Baekelandt, V., 2015a. Longitudinal follow-up and characterization of a robust rat model for Parkinson's disease based on overexpression of alpha-synuclein with adeno-associated viral vectors. *Neurobiology of aging* 36, 1543-1558.
- Van der Perren, A., Van den Haute, C., Baekelandt, V., 2015b. Viral vector-based models of Parkinson's disease. *Current topics in behavioral neurosciences* 22, 271-301.

- van Groen, T., Kadish, I., Popovic, N., Popovic, M., Caballero-Bleda, M., Bano-Otalora, B., Vivanco, P., Rol, M.A., Madrid, J.A., 2011. Age-related brain pathology in *Octodon degu*: blood vessel, white matter and Alzheimer-like pathology. *Neurobiology of aging* 32, 1651-1661.
- van Oosten-Hawle, P., Porter, R.S., Morimoto, R.I., 2013. Regulation of organismal proteostasis by transcellular chaperone signaling. *Cell* 153, 1366-1378.
- Vandenbergh, L.H., Wilson, J.M., Gao, G., 2009. Tailoring the AAV vector capsid for gene therapy. *Gene therapy* 16, 311-319.
- Vermilyea, S.C., Emborg, M.E., 2015. alpha-Synuclein and nonhuman primate models of Parkinson's disease. *Journal of neuroscience methods* 255, 38-51.
- Verstraeten, A., Theuns, J., Van Broeckhoven, C., 2015. Progress in unraveling the genetic etiology of Parkinson disease in a genomic era. *Trends in genetics : TIG* 31, 140-149.
- Volles, M.J., Lansbury, P.T., Jr., 2002. Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism. *Biochemistry* 41, 4595-4602.
- Wagner, J., Ryazanov, S., Leonov, A., Levin, J., Shi, S., Schmidt, F., Prix, C., Pan-Montojo, F., Bertsch, U., Mitteregger-Kretschmar, G., Geissen, M., Eiden, M., Leidel, F., Hirschberger, T., Deeg, A.A., Krauth, J.J., Zinth, W., Tavan, P., Pilger, J., Zweckstetter, M., Frank, T., Bahr, M., Weishaupt, J.H., Uhr, M., Urlaub, H., Teichmann, U., Samwer, M., Botzel, K., Groschup, M., Kretschmar, H., Griesinger, C., Giese, A., 2013. Anle138b: a novel oligomer modulator for disease-modifying therapy of neurodegenerative diseases such as prion and Parkinson's disease. *Acta neuropathologica* 125, 795-813.
- Walsh, C., Cepko, C.L., 1988. Clonally related cortical cells show several migration patterns. *Science* 241, 1342-1345.
- Watts, J.C., Giles, K., Oehler, A., Middleton, L., Dexter, D.T., Gentleman, S.M., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., 2013. Transmission of multiple system atrophy prions to transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 19555-19560.
- Waxman, E.A., Giasson, B.I., 2008. Specificity and regulation of casein kinase-mediated phosphorylation of alpha-synuclein. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 67, 402-416.
- Webb, J.L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J.N., Rubinsztein, D.C., 2003. Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *The Journal of biological chemistry* 278, 25009-25013.
- Weinberg, M.S., Samulski, R.J., McCown, T.J., 2013. Adeno-associated virus (AAV) gene therapy for neurological disease. *Neuropharmacology* 69, 82-88.
- Weinreb, P.H., Zhen, W., Poon, A.W., Conway, K.A., Lansbury, P.T., Jr., 1996. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* 35, 13709-13715.
- Wenning, G.K., Stefanova, N., Jellinger, K.A., Poewe, W., Schlossmacher, M.G., 2008. Multiple system atrophy: a primary oligodendroglialopathy. *Annals of neurology* 64, 239-246.
- Willner, P., 1984. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology* 83, 1-16.
- Winner, B., Jappelli, R., Maji, S.K., Desplats, P.A., Boyer, L., Aigner, S., Hetzer, C., Loher, T., Vilar, M., Campioni, S., Tzitzilonis, C., Soragni, A., Jessberger, S., Mira, H., Consiglio, A., Pham, E., Masliah, E., Gage, F.H., Riek, R., 2011. In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 4194-4199.
- Wong, E., Cuervo, A.M., 2010. Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nature neuroscience* 13, 805-811.
- Xilouri, M., Brekk, O.R., Landeck, N., Pitychoutis, P.M., Papisilekas, T., Papadopoulou-Daifoti, Z., Kirik, D., Stefanis, L., 2013. Boosting chaperone-mediated autophagy in vivo mitigates alpha-synuclein-induced neurodegeneration. *Brain : a journal of neurology* 136, 2130-2146.
- Zarranz, J.J., Alegre, J., Gomez-Esteban, J.C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Ates, B., Llorens, V., Gomez Tortosa, E., del Ser, T., Munoz, D.G., de Yébenes, J.G., 2004. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Annals of neurology* 55, 164-173.
- Zhang, H., Xie, J., Xie, Q., Wilson, J.M., Gao, G., 2009. Adenovirus-Adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant Adeno-associated virus production. *Human gene therapy* 20, 922-929.

- Zhong, L., Li, B., Mah, C.S., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., Cooper, M., Herzog, R.W., Zolotukhin, I., Warrington, K.H., Jr., Weigel-Van Aken, K.A., Hobbs, J.A., Zolotukhin, S., Muzyczka, N., Srivastava, A., 2008. Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 7827-7832.
- Zwanzig, R., Szabo, A., Bagchi, B., 1992. Levinthal's paradox. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 20-22.