



HAL
open science

Modélisation et recherche de stratégies expérimentales dans l'atrophie multisystématisée

Paul Guerin

► **To cite this version:**

Paul Guerin. Modélisation et recherche de stratégies expérimentales dans l'atrophie multisystématisée. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0141 . tel-02898257

HAL Id: tel-02898257

<https://theses.hal.science/tel-02898257>

Submitted on 13 Jul 2020

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 Paul Guerin

**Modélisation et recherche de stratégies expérimentales dans
l'atrophie multisystématisée**

Sous la direction de M. le Docteur Wassilios Meissner

Soutenue le 18 septembre 2018

Membres du jury :

Dr ICHAS François	Directeur de recherche	Université de Poitiers	Président du jury
Dr DERKINDEREN Pascal	PU-PH	Université de Nantes	Rapporteur
Dr DEVOS David	PU-PH	Université de Lille	Rapporteur
Dr BEZARD Erwan	Directeur de recherche	Université de Bordeaux	Invité
Dr MEISSNER Wassilios	PU-PH	Université de Bordeaux	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout d'abord mon directeur de thèse le professeur Wassilios Meissner. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler avec vous malgré mon bagage de biologiste cellulaire. Merci pour votre patience, votre gentillesse et votre soutien pendant ces trois années.

J'aimerais ensuite remercier le docteur Erwan Bezarid pour son accueil dans son laboratoire, sa disponibilité à tout instant, ses précieux conseils, sa rigueur, sa grande pédagogie et pour toutes les ressources qu'il a pu mettre à ma disposition pour assurer le bon déroulement de cette thèse.

Je remercie Pierre-Olivier Fernagut, mon co-directeur de thèse jamais officialisé. Merci d'avoir toujours su répondre à mes interrogations, mêmes les plus naïves, merci pour ta gentillesse, ton humour et pour tout ce que m'as appris. Merci surtout pour tes qualités humaines et pour tous les conseils que tu m'as apporté, cette thèse n'aurait pas été la même sans toi !

Merci à Marie-Hélène de ta gentillesse constante, de tes conseils en histo en ce qui concerne les marquages difficiles, merci de t'être toujours enquis de mon état pendant les moments intenses, ça a été un plaisir de travailler avec toi.

Merci à Evelyne de ta bonne humeur en salle de manip, des éclats de rire, de ta gentillesse également, de m'avoir formé à la microscopie. Merci pour le cadeau de cet été, je suis content que le hamac te plaise !

Merci à Sandra pour avoir pris le temps de me former à l'histo et de toujours m'avoir donné un coup de main quand j'en avais besoin. Je te remercie (je crois ?) de m'avoir formé au mercator auquel j'ai été scotché pendant plusieurs mois. Merci pour ta sympathie d'une manière générale.

Merci à Alain sans qui le labo ne tournerait pas, je pense qu'il n'y a pas un seul jour où tu ne m'as pas demandé comment j'allais, merci pour les chocolats, je suis sûr qu'on peut encore en retrouver aujourd'hui dans notre bureau. Merci à Marie-Laure Thiolat, compatriote basque, d'avoir toujours une longueur d'avance en ce qui concerne les commandes ! Votre gentillesse et votre bonne humeur communicative vont me manquer.

Merci à Greg le magicien de la manipulation animale de m'avoir donné autant de tips et d'avoir toujours le temps pour me montrer comment effectuer une nouvelle manip, de m'avoir appris à m'organiser et m'avoir montré que la chirurgie stéréotaxique ce n'est

finalement pas si compliqué. Merci pour les conversations et les éclats de rire à Motac avec Emilie, Sandrine et Elsa, vous êtes géniaux.

Merci à Nathalie, je me souviendrais toujours de l'aide que tu m'as apporté quand je n'y connaissais rien à la virologie lors du concours de l'école doctorale, merci aussi de ta gentillesse constante tout le long de cette thèse et de ton soutien moral.

Merci à Ben qui s'est toujours montré patient et attentif quand je lui demandais conseil, tu n'hésites jamais à aider les gens !

Merci à Karine pour sa gentillesse, j'en profite pour dire qu'elle a été un super prof durant mon master et ma licence !

MLA, tes soupirs dans le bureau vont me manquer, merci pour les expériences sur les échantillons humains alors que tu croulais déjà sous le travail. Merci d'avoir animé le bureau, pour les pauses café et pour ton amitié tout simplement. Bon courage pour ta dernière année de thèse, on en reparlera autour d'une bière ! On fera probablement ça avec Emilie et Flo, merci à vous deux d'animer le bureau à côté du notre.

Thanks Miguel for your help in our project, for the never ending beam tests and perfusion days. I wish you all the best for the end of your thesis.

Merci Fede et Olatz, je ne sais pas par où commencer, vous avez toujours été là pour moi depuis que je suis arrivé. Votre amitié m'est très précieuse, merci Fede pour tous ces moments de rire, le temps que tu as passé à m'expliquer des milliers, voire des millions de détails sur le foot. Never forget Zinedine Zidane song. Merci d'avoir été là quels que soient les moments, votre gentillesse va énormément me manquer. Les conversations scientifiques que nous avons pu avoir ont toujours été enrichissantes, merci à vous deux de m'avoir donné autant de conseils et d'idées en immunohisto et en bioch. Que dire à part que vous êtes des gens supers ! Bon vent à Leioa je vous souhaite le meilleur avec Nora et je compte vous rendre visite souvent !

Merci à Chantal, Cyndi, Eric et Christophe que j'ai embêté tous les ans avec mes problèmes administratifs, mes commandes, mes envois et mes demandes de mission et qui m'ont toujours aidé sans rechigner.

Merci à François et Michel pour ces discussions dans le couloir, et qui étaient toujours là pour remonter le moral !

Merci aux gens de l'animalerie Guillaume, Melissa et Manon de vous être si bien occupés de nos animaux et d'avoir toujours été aussi sympas ! Merci Elizabeth pour ses conseils et Laetitia de m'avoir toujours aidé quand j'en avais besoin.

Merci à ceux qui sont parti du labo, Fares bien entendu, Bido Bidet, Alice et Mathieu Poussin. Merci pour tous ces moments de rire dans ce bureau minuscule de l'ancien bâtiment mais si chaleureux. Je n'oublierai pas de sitôt le voyage à Amsterdam et les matchs de foot que nous sommes allés voir ensemble.

Merci à Brit Mollenhauer et Niels Kruse de m'avoir si bien accueilli en Allemagne pendant ces six mois.

Merci aux membres du jury Mr ICHAS François, Mr. DERKINDEREN Pascal et Mr DEVOS David de prendre le temps d'évaluer le travail que j'ai effectué pendant ces trois années de thèse.

Je tiens à remercier le ministère de la recherche pour le financement de ces trois années de thèse, l'IDEX pour la bourse octroyée qui m'a permis d'effectuer des expériences en Allemagne et de travailler sur des échantillons humains et merci à la MSA coalition qui a financé les projets rapamycine et GRK2.

Un merci spécial à Nicolas Labarrère qui a fait naître en moi une passion pour la biologie cellulaire, je ne serais pas ici aujourd'hui sans ses enseignements, il restera pour moi le meilleur professeur que j'ai eu.

Enfin j'aimerais adresser un immense merci à ma famille et mes amis du Pays-Basque (et aussi des Landes) ainsi que ceux de Bordeaux. Merci d'avoir toujours été là pour m'encourager pendant ma thèse, merci pour votre soutien sans faille et l'intérêt que vous avez porté à mes travaux de recherche. Merci à mon coloc Kévin pour les corrections de dernières minutes ! Milesker deneri, Ama, Aita, Elena, Joana, Mijo, Olivier, Amaia eta lagunak!

RÉSUMÉ/ABSTRACT

Résumé : L'atrophie multisystématisée (AMS) est une maladie neurodégénérative orpheline altérant de nombreuses régions du système nerveux central, notamment les systèmes olivopontocérébelleux et striatonigral ainsi que divers noyaux autonomes du tronc cérébral, et dont la progression est très rapide. La principale caractéristique de l'AMS est la présence d'agrégats oligodendrogliaux nommés inclusions cytoplasmiques gliales dont le principal composant est la protéine α -synucléine (α -syn). La dégénérescence entraîne notamment une grave atteinte des fonctions autonomes, ainsi qu'à un degré variable un syndrome parkinsonien et des troubles cérébelleux. Il n'existe aujourd'hui aucun traitement modifiant la progression de la maladie ni de biomarqueur permettant de détecter ou de suivre son évolution.

Ma thèse est une approche multifactorielle qui m'a permis de travailler sur les diverses étapes de la recherche à visée thérapeutique, de la modélisation animale à la phase pré-clinique, puis à la détermination de potentiels biomarqueurs de la sévérité de la maladie. Dans la première partie de la thèse, nous avons induit une surexpression virale de l' α -syn oligodendrogliale par injection stéréotaxique striatale chez le rat et le singe. Nous avons montré chez le rat une dysfonction motrice progressive, une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire compacte (SNc) mais aussi des neurones striataux, ainsi qu'une agrégation pathologique de l' α -syn. Pour le modèle primate, nous avons déterminé la spécificité de l'expression de l' α -syn oligodendrogliale, l'étendue de l'infection virale et de la présence de l' α -syn. Dans un second temps, nous avons étudiés l'effet de trois stratégies thérapeutiques sur la neurodégénérescence et l'agrégation de l' α -syn retrouvées dans un modèle murin transgénique de l'AMS. La rapamycine, dont une des actions est d'activer la dégradation protéique, a montré un effet neuroprotecteur partiel sur la dégénérescence des neurones de la SNc, tandis que l'administration intrapéritonéale du nilotinib qui avait montré des effets neuroprotecteurs et anti agrégatifs dans divers modèles de la maladie de Parkinson n'a eu aucun effet dans ce modèle. La troisième stratégie thérapeutique a pour but d'agir sur la résistance à l'insuline cérébrale, qui est une des caractéristiques des patients AMS, chez notre modèle murin transgénique par une approche d'injection stéréotaxique virale au niveau du striatum induisant la surexpression d'un micro ARN. L'inhibition de la kinase GRK2, impliquée dans les phénomènes de résistance à l'insuline, suite à cette injection a montré des effets neuroprotecteurs dans la SNc. Le troisième projet de ma thèse a consisté à mesurer, grâce à la

technologie SIMOA, la concentration de plusieurs biomarqueurs potentiels dans le sérum et le liquide céphalo rachidien de patients AMS et à les corrélés avec les données cliniques.

Abstract: Multiple system atrophy (MSA) is a rapidly progressing orphan disease characterized by neurodegeneration in several brain regions, including olivopontocerebellar and striatonigral systems, together with several brainstem autonomic nuclei. The hallmark of MSA is the presence of oligodendroglial aggregates named glial cytoplasmic inclusions, which are mostly composed of the protein α -synuclein (α -syn). The neurodegenerative process causes a variable combination of parkinsonism, cerebellar impairment and autonomic dysfunction. No disease modifying therapies, nor peripheral biomarkers that would allow detecting or monitoring the evolution of MSA, are yet available.

My PhD work was a multifactorial approach which allowed me to work on the different levels of therapeutic research, from animal modelling to preclinical research, and finally the search for fluid biomarkers in patient samples. We first created new models of MSA based on viral-mediated overexpression of α -syn in striatal oligodendrocytes in rats and non-human primates. We showed in our rat model progressive motor dysfunction, degeneration of dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta (SNc) and striatal neurons, as well as pathological aggregation of α -syn. For the primate model, we established the specificity of oligodendroglial α -syn expression and the reach of the viral infection. In the second part, we studied the effect of three therapeutic strategies on neurodegeneration and α -syn aggregation in a transgenic murine model of MSA. Rapamycin, known to activate protein degradation through autophagy, showed a partial neuroprotective effect on dopaminergic neurons of the SNc, while intraperitoneal administration of nilotinib, which exerted neuroprotective and anti-aggregative effects in several models of Parkinson's disease, failed to show any effect in transgenic MSA mice. The last therapeutic strategy aimed to act on brain insulin resistance, which is one of the pathological features found in MSA patient brains, through viral-mediated overexpression of a micro RNA that reduces the expression of the G protein (heterotrimeric guanine nucleotide-binding protein)-coupled receptor kinase 2 (GRK2). The inhibition of the GRK2 kinase, which is involved in mediating insulin resistance, showed neuroprotective effects in the SNc in transgenic MSA mice. The third project of my PhD work consisted in the assessment of several potential fluid biomarkers in MSA patients using the SIMOA technology.

LISTE DES PUBLICATIONS ET POSTERS

Publications :

Viral-mediated oligodendroglial alpha-synuclein expression models multiple system atrophy.

Fares Bassil, PhD,^{1,2†} Paul A. Guerin, MS,^{1,2†} Nathalie Dutheil, PhD,^{1,2} Qin Li, PhD,^{3,4} Matthias Klugmann, PhD,⁵ Wassilios G. Meissner, MD, PhD ^{1,2,6,7} Erwan Bezard, PhD,^{1,2,3,4*} and Pierre-Olivier Fernagut, PhD^{1,2*}, Mov Disord 2017;32;1230-1239.

†,*: Contribution équivalente.

Rapamycin partially protects against neurodegeneration in a mouse model of multiple system atrophy. (En préparation)

Paul A. Guerin[†], Miguel Lopez Cuiña[†], Marie-Laure Arotcarena, Erwan Bezard, Wassilios G. Meissner* and Pierre Olivier Fernagut*

†,*: Contribution équivalente.

nilotinib effects in a mouse model of multiple system atrophy. (En préparation)

Paul A. Guerin[†], Miguel Lopez Cuiña[†], Marie-Laure Arotcarena, Erwan Bezard, Wassilios G. Meissner* and Pierre Olivier Fernagut*

†,*: Contribution équivalente.

Inhibition of GRK2 leads to decreased insulin resistance and dopaminergic neuron protection in a mouse model of multiple system atrophy. (En préparation)

Miguel Lopez Cuiña[†], Paul A. Guerin[†], Marie-Laure Arotcarena, Pierre Olivier Fernagut Wassilios G Meissner and Erwan Bezard

†: Contribution équivalente.

Posters :

Neurofrance 2017, Bordeaux : AAV-mediated expression of alpha-synuclein in oligodendrocytes recapitulates key features of multiple system atrophy

Paul Guerin, Fares Bassil, Nathalie Dutheil, Sandra Dovero, Wassilios G Meissner, Erwan Bezard, Pierre-Olivier Fernagut

Society for Neuroscience 2017, Washington : **Brain insulin resistance and Parkinson's Disease**

Fares Bassil, Paul Guerin, Marie-Helene Cannon, Nathalie Dutheil, Anne Vital, Erwan Bezard, Pierre-Olivier Fernagut and Wassilios G. Meissner

ABRÉVIATIONS

AMS : atrophie multisystématisée

AC : anticorps

BCA : acide bicinchoninique

BSA : protéine sérique bovine

DA : dopamine

DCL : démence à corps de Lewy

GFAP : glial fibrillary protein

ICG : inclusions cytoplasmiques gliales

LB : corps de Lewy

L-Dopa : lévodopa

LN : neurites de Lewy

MBP : protéine basique de la myéline

MP : maladie de Parkinson

mTORC1 : mammalian target of rapamycine

OPC : précurseur oligodendroglial

PAF : dysautonomie pure idiopathique

PLP : protéine protéolipidique

ROS : dérivés réactifs de l'oxygène

SNC : système nerveux central

SN/SNc/SNr : substance noire/substance noire compacte/substance noire réticulée

SNCA : gène codant l'alpha-synucleine

Tamb : température ambiante

TH : tyrosine hydroxylase

α -syn : alpha-synucléine

LCR : liquide céphalo rachidien

UCH-L1 : ubiquitine hydrolase carboxy-terminale L1

UMSARS : échelle de notation unifiée de l'atrophie multisystématisée

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

p1

RÉSUMÉ

p4

LISTE DES PUBLICATIONS ET POSTERS

p6

ABRÉVIATIONS

p8

INTRODUCTION

p12

1 L'atrophie multisystématisée..... p15

1.1 Historique..... p15

1.2 Epidémiologie et étiologie..... p18

1.3 Description clinique et diagnostic..... p20

a) Les symptômes moteurs p20

b) Les symptômes non-moteurs et les causes de décès..... p23

c) Diagnostic..... p26

1.4 Pathophysiologie..... p27

a) Neurodégénérescence p27

b) Topographie et description des lésions p31

c) Démyélinisation et altérations oligodendrogiales p32

d) Inflammation p35

e) Altération des mécanismes de dégradation protéique p35

f) Résistance à l'insuline..... p38

g) Cascade d'événements pathologiques dans l'AMS : où en sommes-nous ?..... p39

1.5 Prise en charge clinique..... p42

1.6 Modélisation de l'atrophie multisystématisée..... p45

2 L' α -Synucléine..... p46

2.1 Rôle physiologique..... p46

<u>2.1 Rôle pathologique</u>	p48
OBJÉCTIFS DE LA THÈSE	p52
RÉSULTATS	p54
<u>Partie 1 : Modélisation animale de l'AMS</u>	p55
<u>Partie 2 : Approches thérapeutiques</u>	p70
<u>Modèle animal</u>	p70
<u>Matériel et méthodes</u>	p72
1) <u>Rapamycine</u>	p76
2) <u>Nilotinib</u>	p86
3) <u>GRK2</u>	p94
<u>Partie 3 : Recherche de biomarqueurs potentiels</u>	p104
DISCUSSION	p113
<u>Partie I : Effet de la surexpression oligodendrogliale striatale d'α-syn par une approche virale dans un modèle murin et de primate non humain</u>	p114
<u>Partie II : Etude de l'effet de stratégies thérapeutiques sur le modèle de souris PLP-syn</u>	p118
<i>Comportement moteur des souris PLP-syn</i>	p118
<i>Rapamycine</i>	p119
<i>Nilotinib</i>	p123
<i>GRK2</i>	p126
<u>Partie III : Etude de biomarqueurs d'intérêt dans le LCR et le plasma des patients AMS</u>	p129
CONCLUSION	p132
RÉFÉRENCES	p134

INTRODUCTION

Le terme ‘synucleinopathies’ désigne un ensemble de maladies neurodégénératives ayant pour point commun la formation, neuronale ou gliale, d’agrégats protéiques fibrillaires dont le composant principal est l’alpha synucléine (α -syn).

La présence de l’ α -syn dans des inclusions pathologiques a été déterminée en premier lieu dans la maladie de Parkinson (MP) en 1997 (**Spillantini et al., 1997**), suite à la découverte de formes familiales de la MP impliquant le gène codant l’ α -syn (*SNCA*) dans une famille italienne et plusieurs familles grecques la même année (**Polymeropoulos et al., 1997**).

L’année suivante, la MP et la démence à corps de Lewy (DCL), présentant le même type d’agrégats, furent les premières pathologies à être qualifiées de synucleinopathies (**Spillantini et al., 1998b**), suivies de l’atrophie multisystématisée (AMS) (**Spillantini et al., 1998a**) et de la dysautonomie pure idiopathique (PAF) (**Arai et al., 2000**).

Si dans la MP, la DCL on retrouve des inclusions d’ α -syn au niveau du cytoplasme des neurones (appelées corps de Lewy, LB) et des neurites (appelées neurites de Lewy, LN), dans l’AMS c’est majoritairement dans le cytoplasme des oligodendrocytes que l’agrégation a lieu (**Figure 1, McCann et al., 2014**), d’où le nom d’inclusions cytoplasmiques gliales (ICG).

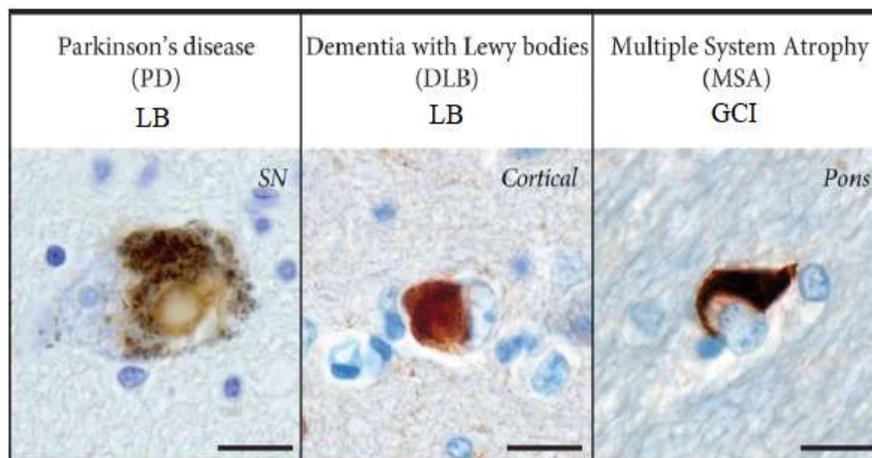


Figure 1 : Marquage immunohistochimique de l’ α -syn chez des patients MP, DCL et AMS

Les tissus sont contre-colorés avec du violet de crésyl, SN = substance noire, barre d’échelle 25 μ m

D’après Heather McCann et al. *Parkinsonism Relat Disord* 2014

La MP, la DCL et l'AMS entraînent de manière variable un déclin progressif et chronique des fonctions autonomes, motrices, comportementales et cognitives (McCann et al., 2014, Marti et al., 2003, Yang and Yu, 2017). Quant aux patients diagnostiqués PAF, présentant uniquement une déficience autonome, ils ont un risque élevé de développer avec le temps une des trois autres synucléinopathies (Kaufmann et al., 2017).

Avec de nombreux symptômes qui se recourent, il peut être difficile de poser un diagnostic précis, surtout dans les phases précoces de ces maladies (Figure 2, inspiré de (Goldstein et al., 2011)).

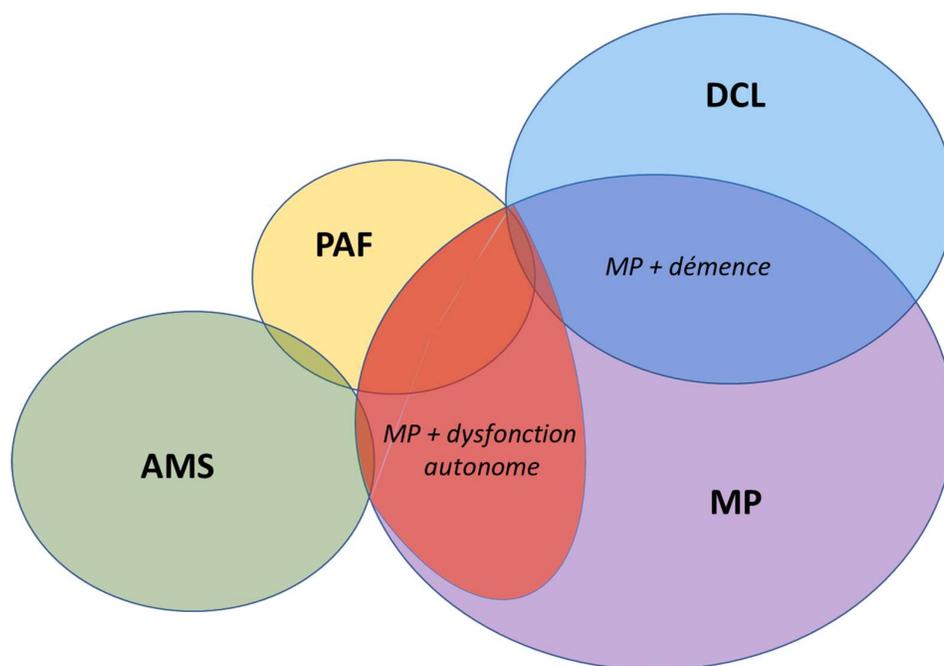


Figure 2 : Diagramme de Venn montrant les relations entre les différentes synucléinopathies

Les recouvrements représentent les patients MP avec cas de démences ou/et de dysfonctionnements autonomes, les patients PAF qui développent une des trois autres synucléinopathies, les patients AMS qui peuvent présenter des LBs.

Inspiré de Goldstein et al. *J Clin Invest* 2011

En plus des synucléinopathies, des dépôts d' α -syn sont retrouvés dans certains cas de neurodégénérescence avec accumulation de fer de type I, de variantes à corps de Lewy de la maladie d'Alzheimer, de syndrome de Down, de maladie de Pick et de sclérose latérale amyotrophique (Moussaud et al., 2014, Galvin et al., 2001).

Il n'existe aujourd'hui pour ces maladies aucun traitements capables de reverser la pathologie et la nécessité de développer de nouvelles approches thérapeutiques est cruciale. Les

phénomènes pathologiques cellulaires impliqués sont encore peu ou mal connus et compris. Mon travail de thèse s'est principalement concentré sur la modélisation animale de l'AMS, sur l'exploration de voies thérapeutiques potentielles et la recherche de biomarqueurs potentiels témoignant de la sévérité du processus neurodégénératif.

1 L'atrophie multisystématisée

1.1 Historique

L'AMS est une pathologie complexe qui peut toucher diverses structures cérébrales et qui a longtemps été considérée comme trois maladies distinctes :

L'histoire de l'atrophie multisystématisée débute à l'hôpital de la Salpêtrière à Paris en 1900. La première description clinique a été réalisée par Jules Déjerine et André Thomas dans l'article 'L'atrophie olivo-ponto-cérébelleuse' (Dejerine J, 1900):

'M. Déjerine et André Thomas, en s'appuyant sur deux observations personnelles, dont une suivie d'autopsie et d'un minutieux examen histologique, ont isolé une variété d'atrophie du cervelet qu'ils ont séparée de l'hérédo-ataxie cérébelleuse de Marie. Anatomiquement cette atrophie olivo-ponto-cérébelleuse est caractérisée, comme son nom l'indique, par l'atrophie de l'écorce cérébelleuse, des olives bulbaires et de la substance grise du pont, par la dégénérescence totale du pédoncule cérébelleux moyen et par la dégénérescence partielle du corps restiforme, par l'intégrité relative des noyaux gris centraux : c'est une atrophie primitive, dégénérative et systématique, ni scléreuse ni inflammatoire. Cliniquement, elle est moins bien caractérisée : elle se manifeste en effet par le syndrome commun à toutes les atrophies cérébelleuses : elle présente comme caractères particuliers de n'être ni héréditaire, ni familiale, ni congénitale et de survenir à un âge avancé. Son étiologie est obscure : elle rentre dans le cadre des atrophies cellulaires primitives.

Symptômes : Si les observations connues d'atrophie du cervelet diffèrent assez sensiblement par des particularités anatomiques pour qu'on puisse les différencier, elles présentent entre elles les plus grandes analogies au point de vue clinique. Elles ont toutes une symptomatologie cérébelleuse plus ou moins complexe, mais l'atrophie olivo-ponto-cérébelleuse est celle où l'on observe avec la plus grande pureté le syndrome cérébelleux causé par la perte de la faculté d'association des mouvements. Caractérisé par des troubles des mouvements dans la station

debout et dans la marche, avec intégrité relative des mouvements isolés (les membres, lorsque le corps repose dans des conditions telles que l'effort pour maintenir l'équilibre est réduit au minimum, ce syndrome ne diffère pas de celui que nous avons déjà décrit. Nous allons revoir rapidement ses caractères. Dans la position assise, les pieds reposant sur le sol, le corps présente des oscillations variables, latérale ou antéro-postérieure, si le dos n'est pas appuyé ; ces oscillations s'exagèrent si le malade remue les membres inférieurs, dont les mouvements sont lents, hésitants, accompagnés de tremblements ; cependant les mouvements élémentaires des divers segments de ces membres s'exécutent à peu près normalement. Les membres inférieurs sont agités de tremblements. Les malades se mettent debout avec difficulté : il leur faut un appui et ils cherchent, en écartant les jambes à augmenter leur base de sustentation, pour maintenir leur équilibre en se levant. Dans la station debout, le malade a la position classique du cérébelleux. Les jambes écartées, il oscille et finirait par tomber s'il n'a pas de soutien à sa portée. Il ne peut se tenir sur une jambe. L'instabilité est exagérée lorsqu'on veut faire exécuter au malade un mouvement passif, qu'on le pousse latéralement, en avant ou en arrière. Dans la marche, la titubation devient plus évidente encore : le cérébelleux écarte les jambes, il maintient son équilibre avec effort et soulève brusquement le pied qu'il repose de même, ne faisant que de petits pas. Il festonne et suit une ligne brisée : en un mot, il présente la démarche que nous avons décrite, à type plus ou moins ébrieux. Suivant la période de la maladie l'asynergie musculaire est évidente, sans être aussi prononcée que dans les lésions du cervelet où l'on trouve à la fois des phénomènes de destruction et de compression du tissu de l'organe. Les mouvements des membres supérieurs sont à peu près normaux, quoique lents, le malade étant assis ou couché. Mais il peut exister une certaine maladresse au moment de saisir l'objet ou de l'incertitude des mouvements analogue à ce que l'on voit dans le tabes. Les membres supérieurs sont agités de tremblements ; l'écriture est toujours tremblée parfois illisible. Les réflexes rotuliens ou autres sont aussi souvent normaux qu'exagérés. L'ataxie proprement dite fait défaut et la force musculaire est intacte. L'expression du visage est, dans une observation, celle de l'étonnement, dans une autre, celle de la niaiserie. La parole est toujours altérée, elle est lente, scandée, nasonnée à des degrés divers. La sensibilité est intacte dans tous ses modes : un des malades marchait sur du coton, il n'avait pas la sensation du sol. Le signe de Romberg n'existe pas ; toutefois il pourrait se produire à la fin de la maladie. Les organes des sens sont normaux : deux fois on relève les secousses nystagmiformes des globes oculaires. Le vertige n'a été signalé que dans un cas où le malade présentait en outre une lésion de l'oreille. Les vomissements n'ont pas été observés. L'état mental est celui des cérébelleux en général, intelligence conservée et tristesse. Le syndrome cérébelleux était

associé, chez deux malades, dans un cas à une atrophie du membre supérieur droit et dans l'autre à la sclérose en plaques.

Évolution : Le début, presque toujours lent et progressif, a lieu à un âge avancé, qui varie de 42 à 66 ans. Les malades ne présentent aucun antécédent héréditaire d'ordre nerveux. En général la faiblesse et l'incertitude de la marche marquent le début de l'affection : dans un cas, des étourdissements et la titubation survenue subitement furent les premiers symptômes. L'état cérébelleux s'accroît peu à peu pour acquies toute son intensité au bout d'un temps plus ou moins long. La durée totale de la maladie a été deux fois de sept ans, une fois de quatre ans, une fois de deux ans et demi. La terminaison peut avoir lieu par mort subite, par une maladie pulmonaire aiguë ou par une autre maladie accidentelle.'

En 1925 Bradbury et Eggleston décriront trois cas 'd'hypotension posturale' présentant également une anhidrose et plusieurs cas semblables ont été rapportés avant la publication en 1960 d'un papier de Shy et Drager (**Shy and Drager, 1960**). Dans cette étude ils, présentent deux patients avec des symptômes de dysfonction du système nerveux autonome : hypotension orthostatique, incontinence rectale et urinaire, anhidrose, atrophie de l'iris, paralysie oculaire externe, impuissance, vessie hypertonique et perte du tonus du sphincter rectal. Ces patients partagent également comme caractéristiques la rigidité, des tremblements, une perte des mouvements associés. L'autopsie d'un de leurs patients montrera une mort neuronale et une gliose au niveau du striatum, de la SN, de l'olive bulbaire, du pont et du cervelet. Ces caractéristiques pathologiques seront regroupées sous le nom de '**syndrome de Shy-Drager**' (**Quinn, 2015**).

Enfin en 1961 Adams et al. publient '**dégénérescences nigro-striées** et cerebello-nigro-striées' dont voici un extrait de description anatomique post-mortem d'un des trois cas présentés : '*Le locus niger est atteint gravement des deux côtés ainsi que toutes les formations pigmentaires de la calotte pédonculaire et de la racine mésencéphalique du trijumeau. Cette lésion est, à côté de celle du putamen et du pallidum, la plus importante. [...] Cette atrophie déborde, de là, sur les systèmes olfactivoseptaux, sur les pédoncules cérébelleux moyens, les noyaux du pont et les olives bulbaires. Les parties dorso-latérales du corps de Luys, les formations de l'hypothalamus postérieur, le cervelet, les noyaux dentelés et vestibulaires sont beaucoup plus légèrement altérés*'. Les atteintes sont plus ou moins importantes au niveau olivo-ponto-cérébelleux selon les cas mais tous présentent cette atteinte striato-nigrale qui se traduisait par un syndrome parkinsonien. Ils précisent qu'il ne faut pas considérer ces cas uniquement comme

des syndromes parkinsoniens séniles car cela rentre en contradiction avec l'âge des cas décrits et l'importance des atrophies extra-nigrales (Adams R, 1961).

Le terme 'atrophie multisystématisée' a été pour la première fois employé par Graham et Oppenheimer en 1969 pour regrouper ces maladies présentant des combinaisons d'atrophies neuronales d'intensités variables dans des régions cérébrales qui se recoupent, de manière à éviter la prolifération de nouveaux noms spécifiques pour chaque nouvelle combinaison (Graham and Oppenheimer, 1969).

Néanmoins, dû à la complexité des symptômes et du nombre de régions atteintes, le diagnostic définitif de l'AMS restera incertain jusqu'à la publication d'une étude par Papp, Kahn et Lantos en 1989. Le lien est fait avec la découverte d'ICG dans les cerveaux de patients souffrant d'atrophie olivo-ponto-cérébelleuse, du syndrome de Shy et Drager et de dégénérescence nigro-strié dans un grand nombre de structures touchées dans ces maladies (voir tableau ci-dessous, d'après (Papp et al., 1989)) mais pas chez les patients souffrant de diverses autres maladies neurologiques.

Primary motor cortex ^a	External capsule ^a
Paracentral gyrus of cerebral cortex ^a	Subthalamic area
Premotor cerebral cortex ^a	Pretectal areas
Corona radiata	Basilar part of the pons ^a
Dorso-lateral part of caudate nucleus	Reticular formation of midbrain and pons
Caudato-putaminal band of gray substance	Reticular formation of medulla oblongata ^a
Putamen ^a	Brachium pontis
Striato-pallidal fibres ^a	White matter of cerebellum ^a
Pallidum ^a	Intermediate substance of spinal cord
	Lateral funiculi of spinal cord

^a May be hundreds of GCIs in a visual field.

Idiopathic orthostatic hypotension
Shy-Drager syndrome
Olivopontocerebellar atrophy
Striatonigral degeneration



Tableau 1 : Premières structures du SNC déterminées comme présentant des ICG dans l'atrophie multisystématisée

D'après Papp et al. *J Neurol Sci* 1989, image d'après Quinn *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1989

Cette présence d'ICG, dont le constituant principal est l' α -syn, devient le critère permettant de diagnostiquer de manière certaine en post mortem l'AMS.

1.2 Epidémiologie et étiologie

La prévalence de l'AMS est d'environ 2-5 cas pour 100 000 personnes (Chrysostome et al., 2004, Bjornsdottir et al., 2013, Schrag et al., 1999), et son incidence est de 0,1 à 0,8 nouveaux cas par an pour 100 000 personnes (Bjornsdottir et al., 2013, Bower et al., 1997, Winter et

al., 2010). Les premiers symptômes surviennent majoritairement dans la sixième décennie de vie (Sakushima et al., 2015, Chrysostome et al., 2004, Bjornsdottir et al., 2013, Wenning et al., 2013) et l'espérance de vie médiane, après l'apparition des premiers signes, est estimée à 6-10 ans (Chrysostome et al., 2004, Bjornsdottir et al., 2013, Wenning et al., 2013). Lorsque les symptômes moteurs qui prédominent sont ceux qu'on retrouve dans la MP (syndrome parkinsonien), l'AMS est classifiée comme AMS-P, et quand ils sont liés à une prédominance de l'atteinte du système olivo-ponto-cérébelleux, l'AMS est classifiée comme AMS-C. Bien que l'on classe les patients dans ces deux catégories, 54% des patients AMS-P présenteraient des symptômes cérébelleux et 76% des patients AMS-C présenteraient fréquemment des manifestations d'un syndrome parkinsonien (chiffres qui varient selon les pays, voir la partie description clinique). Tous les patients présentent une dysfonction autonome, car c'est un des critères du diagnostic clinique de l'AMS (Wenning et al., 2013, Gilman et al., 2008). L'AMS-P est plus fréquente en Europe (Figure 3, d'après (Köllensperger et al., 2010)) et aux Etats Unis d'Amérique tandis que l'AMS-C est plus fréquente en Asie. Le pronostic vital n'est pas influencé par le type d'AMS (Roncovic et al., 2014, Watanabe et al., 2002).

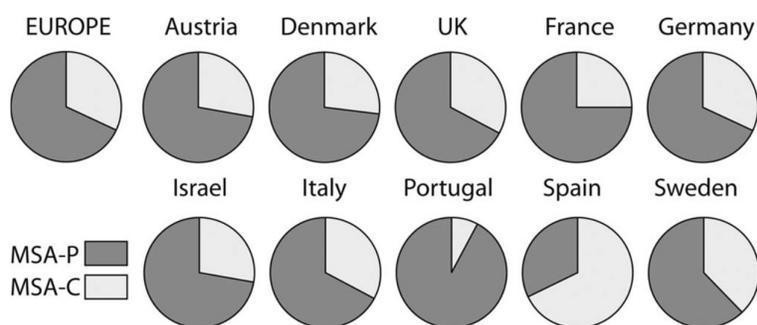


Figure 3 : Distribution des catégories cliniques de l'AMS en Europe et Israël

D'après Köllensperger et al. *Mov Disord* 2010

L'AMS est une maladie idiopathique bien que quelques cas de transmission héréditaire aient été relevés dans des familles américaines, japonaises et allemandes, aucune mutation potentiellement responsable de la maladie n'a pu être caractérisée. Un variant du gène COQ2 pourrait être associé avec un risque accru de développer la maladie dans des cohortes d'Asie de l'est, mais ces résultats n'ont pu être retrouvés dans les pays occidentaux. Les mutations du gène codant la glucocérébrosidase, retrouvée dans la maladie de Gaucher, ont été associées au variant MSA-C (Abati et al., 2018).

1.3 Description clinique et diagnostic

a) Les symptômes moteurs (parkinsoniens, cérébelleux et pyramidaux) :

Comme dit précédemment, la grande majorité des personnes atteintes de l'AMS développent un **syndrome parkinsonien** ; selon une étude de 2005 et une étude de 2010, en Europe, Israël et les Etats-Unis d'Amérique, 87-96% des cas d'AMS présentaient des symptômes moteurs parkinsoniens, incluant la bradykinésie (97-100% de ces patients), la rigidité (84-93%), l'instabilité posturale (54-96%), les tremblements au repos (33-39%) et le blocage moteur (38%) (Gilman et al., 2005, Kollensperger et al., 2010) :

La bradykinésie : la bradykinésie est définie par une lenteur des mouvements et est le symptôme moteur le plus caractéristique de la MP. On utilise souvent ce terme en combinaison avec l'akinésie et l'hypokinésie. L'akinésie est une raréfaction des mouvements spontanés (ex les expressions faciales, diminution du clignement des yeux) et des mouvements associés (ex balancement des bras lors de la marche). D'autres manifestations de l'akinésie sont les mouvements qui se figent et un temps prolongé pour initier une action. L'hypokinésie elle est caractérisée par une amplitude de mouvements diminuée en plus de la lenteur associée, ce qu'on retrouve par exemple dans la micrographie des patients lors de l'écriture (Berardelli et al., 2001).

Le syndrome parkinsonien entraîne une difficulté à planifier, initier et exécuter un mouvement volontaire et à accomplir des tâches multiples et simultanées. D'autres manifestations sont la salivation excessive causée par une déglutition altérée et une dysarthrie hypophonique (volume vocal diminué, vitesse de parole augmentée, perte des intonations donnant une impression monotone, modifications de la qualité de la voix). La bradykinésie est un des symptômes le plus aisé à reconnaître et est testée en faisant faire aux patients des mouvements rapides, répétitifs, alternés des mains et des talons tout en observant la rapidité et l'amplitude (Jankovic, 2008).

Les tremblements : Le tremblement postural est le plus courant chez les patients AMS. Le tremblement au repos serait présent chez un tiers des sujets souffrants d'AMS et peut exister en combinaison, ou non, avec le tremblement postural. Il est asymétrique, possède une fréquence de 4 à 6 hertz et est généralement localisé dans la partie distale d'une extrémité. Le tremblement cinétique est le tremblement qui apparaît lors d'un mouvement volontaire et sa forme légère serait présente chez quasiment tous les patients ayant un syndrome parkinsonien, mais sa prévalence est difficile à mesurer dû à sa définition relative (Kraus et al., 2006, Jankovic, 2008, Mailankody et al., 2017).

La rigidité : elle est définie par une augmentation du tonus musculaire au repos, une distension réduite lors de mouvements passifs, une augmentation de la résistance lors de l'étirement et une facilitation des réactions de raccourcissement musculaire. La rigidité est plus marquée dans les muscles fléchisseurs que les muscles extenseurs. Les effets pathologiques de cette rigidité seraient responsables de changements dans les propriétés mécaniques des articulations, des tendons et des muscles. Ce symptôme peut être associé à des sensations douloureuses, par exemple au niveau des épaules ce qui est un des symptômes initiaux le plus courant mais est souvent diagnostiqué comme de l'arthrite, une bursite ou comme une blessure des coiffes des rotateurs (Jankovic, 2008, Magrinelli et al., 2016).

Les déformations posturales et l'instabilité posturale : la déformation axiale la plus courante dans un syndrome parkinsonien est une posture voutée avec une flexion modérée des genoux et du tronc ainsi que des coudes pliés. Une cyphose axiale (courbure convexe de la colonne vertébrale), une flexion latérale du tronc et une inclinaison de la tête dans la même direction sont fréquentes à un stade avancé de la MP et plus précoce de l'AMS. Une courbure extrême du tronc avec une flexion marquée du rachis thoraco-lombaire est nommée camptocormie et cette condition est exacerbée au fil du temps et de la fatigue pendant la journée et durant la marche. Elle est soulagée en position assise, couchée ou par une extension volontaire du tronc grâce à un support. (Figure 4-A, B, C, D, (Jankovic, 2008, Benatru et al., 2008)). Une autre déformation est le syndrome de la tour de Pise et est caractérisé par une courbure latérale marquée du tronc particulièrement en position debout ou assise. Plus de 40% des sujets AMS développent des déformations posturales (Palma et al., 2018).

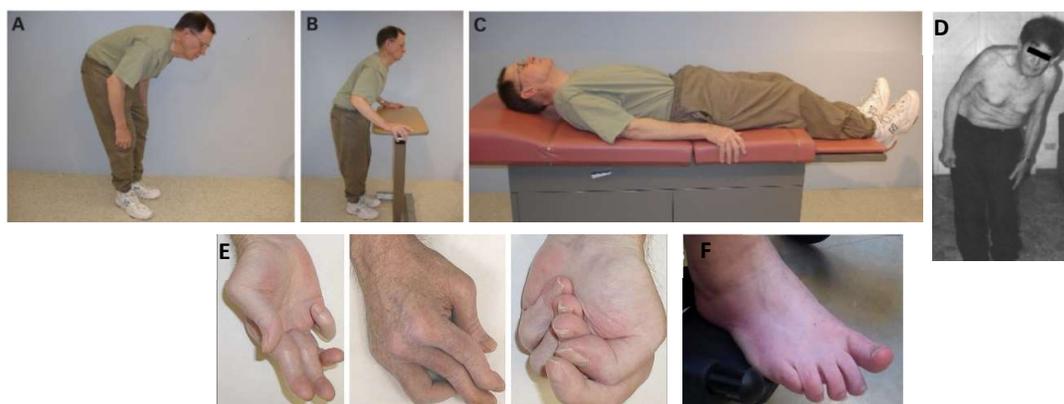


Figure 4 : Déformations posturales et striatales induites par un syndrome parkinsonien

La camptocormie se manifeste par une flexion du tronc (A), que le patient peut corriger grâce à un support (B) ou en position couchée (C). Le syndrome de la tour de Pise lui est caractérisé par une flexion latérale sévère du tronc et du cou (D). Déformations striatales des mains et des pieds (E, F).

D'après (A, B, C) Jankovic. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008, (D) Benatru et al. *Neurophysiol Clin* 2008, (E) Ashour et al. *Lancet Neurol* 2005 et (F) Palma et al. *Auton Neurosci* 2018

Des déformations striatales des membres (fléchissement sévère des doigts et orteils) peuvent aussi se développer chez certains patients (**Figure 4-E, F** d'après (**Palma et al., 2018, Ashour et al., 2005**)).

L'instabilité posturale est due à une dysfonction des réflexes posturaux. En dépit de la posture courbée vers l'avant, les patients atteints d'un syndrome parkinsonien ont une tendance à chuter en arrière extrêmement facilement par rétropropulsion si une force les entraîne vers l'avant. La première chute intervient en moyenne 42 mois après le diagnostic de la maladie dans l'AMS (contre 108 mois dans la MP). Les chutes seraient dix fois plus fréquentes dans l'AMS que dans la MP l'année suivant le diagnostic (**Jankovic, 2008, Benatru et al., 2008, Tison et al., 2002**).

Le blocage moteur : le blocage moteur ('freezing' en anglais) est un symptôme que tous les patients ayant un syndrome parkinsonien ne présentent pas. C'est une cause fréquente de chutes car il peut intervenir lors de l'initiation de la marche (hésitation de départ), lors d'un changement ou d'un choix de direction et quand le sujet se déplace dans des endroits étroits ou dans des espaces très ouverts (**Jankovic, 2008**).

Toujours selon les mêmes études concernant l'Europe, l'Israël et les Etats Unis d'Amérique, les symptômes cérébelleux sont présents chez 61-64% des patients. Un de ces symptômes se traduit par une perte de coordination des mouvements nommée ataxie pour 73-90% de ces patients au cours de la maladie, ce qui peut inclure une ataxie statique, c'est-à-dire une démarche avec des jambes plus écartées (surface de sustentation plus grande, 86-90% des patients qui présentent une ataxie) de manière à conserver l'équilibre, une ataxie cinétique (difficulté à exécuter des mouvements fluides et précis des bras et des jambes, 78-86%), une dysarthrie ataxique (contrôle des muscles de la phonation atteint, 69-79%) et un nystagmus (mouvement involontaire saccadé du globe oculaire, 35-37%) (**Gilman et al., 2005, Kollensperger et al., 2010**).

Un syndrome pyramidal est observé chez 28-50% des patients, ce qui se traduit par une hyper-réflexie tendineuse et/ou un réflexe cutané plantaire anormal (signe de Babinski) (**Roncevic et al., 2014, Kollensperger et al., 2010**).

b) Les symptômes non-moteurs et les causes de décès :

Les symptômes non moteurs peuvent être les premières manifestations de la maladie (pour 23 à 75% des patients selon différentes études) et apparaître quelques années avant les complications motrices (McKay and Cheshire, 2018, Colosimo, 2011, Jecmenica-Lukic et al., 2012, Watanabe et al., 2002).

Dysfonction du système autonome :

Dysfonction uro-génitale : La dysfonction urinaire est présente chez 96% des patients AMS et, dans une étude de 230 patients au Japon, 19% des sujets ont décrit un trouble urinaire comme étant la seule manifestation initiale, avec 82% d'entre eux présentant une dysfonction de la vessie au moment du diagnostic (les premiers symptômes moteurs apparaissant avec une moyenne de 2 ans après ces symptômes autonomes) (Jecmenica-Lukic et al., 2012). Une incontinence urinaire précoce, constante ou liée au stress, due à une vidange involontaire de la vessie partielle ou totale est typique chez les patients AMS, mais pas les patients parkinsoniens sauf pour certains dans les stades tardifs de la maladie (Colosimo, 2011). La dysfonction génitale est le symptôme non moteur initial le plus fréquent chez les individus de sexe masculin (elle advient dans quasiment 100% des cas) et se traduit par une incapacité érectile et éjaculatoire qui peut apparaître entre 5 et 10 ans avant les premiers symptômes moteurs et est souvent associé à la dysfonction de la vessie (McKay and Cheshire, 2018, Colosimo, 2011, Jecmenica-Lukic et al., 2012). Chez les individus de sexe féminin elle se traduit par une perte de la sensibilité du clitoris et des régions génitales internes et serait présente dans 47% des cas d'AMS-P selon une étude (contre seulement 4% des cas pour la MP) (Oertel et al., 2003).

Hypotension orthostatique : C'est une caractéristique clef de la dysfonction autonome de l'AMS et est définie par une chute orthostatique (en position debout) de la pression sanguine systolique supérieure à 20 mmHg et/ou diastolique supérieure à 10 mmHg. Cette dysfonction peut rester asymptomatique malgré la diminution conséquente de la pression sanguine systolique et diastolique et lorsqu'elle devient symptomatique se manifeste par des vertiges en position debout, des douleurs au niveau de la nuque et des épaules, un flou visuel, voir des syncopes (Colosimo, 2011). L'apparition symptomatique va souvent de pair avec celles des troubles uro-génitaux. Une étude a déterminé 9% de cas présentant l'hypotension orthostatique comme un symptôme clinique initial et au moment du diagnostic de l'AMS 30 à 68% des patients présenteraient cette dysfonction.

Dysfonction respiratoire : Le stridor laryngé se manifeste par un bruit anormal causé par l'air traversant la fente au niveau des cordes vocales de la glotte lors de l'inspiration. Le bruit causé est 260-330 Hz supérieur à celui d'un ronflement ordinaire. Dans l'AMS, le son est caractéristique et peut être comparable à un bruit de 'hennissement'. Le stridor intervient souvent lors des phases de sommeil ce qui le rend difficilement remarquable par le sujet et est la plupart du temps mis en évidence par la personne partageant le même lit ou la famille. Le stridor peut être confondu avec un ronflement. Il est probablement dû à une dystonie des muscles de la glotte qui s'aggrave au fur et à mesure que la maladie évolue. Il a été évalué comme étant un symptôme initial pour seulement 4% des patients par une étude mais apparaît généralement avec une moyenne de 5,8 ans après les symptômes moteurs pour environ 34% des patients AMS (**Ozawa et al., 2016**). L'apnée obstructive du sommeil va souvent de pair avec le stridor bien qu'ils ne partagent pas la même pathophysiologie et est présente pour 15 à 69% des patients selon les différentes études (**Ferini-Strambi and Marelli, 2012, Meissner et al., 2014**). Elle est due à une réduction du diamètre des voies respiratoires supérieures au niveau des cordes vocales, de l'entrée du larynx, de la base de la langue et du voile du palais. L'apnée centrale du sommeil peut aussi être observée et est due à une atteinte de certaines régions du SNC contrôlant la respiration autonome (inclus des groupes de neurones chémorécepteurs au niveau du tronc cérébral). Ces atteintes se manifestent par une apnée centrale, une respiration dite de Cheyne-Stokes pendant le sommeil (irrégulière, cyclique, composée d'un arrêt d'une quinzaine de secondes, suivi d'une reprise de mouvements respiratoires de plus en plus rapides qui vont diminuer graduellement jusqu'au prochain arrêt respiratoire) et des patterns de respiration dysrythmiques. L'apnée centrale du sommeil est souvent observée dans les stades avancés de l'AMS mais peut être un symptôme clinique initial dans de très rares cas (**Ferini-Strambi and Marelli, 2012**).

Troubles de l'appareil digestif : L'écoulement salivaire observé chez les patients présentant un syndrome parkinsonien est probablement imputable à un trouble de la déglutition plutôt qu'à une salivation excessive. Les troubles de la déglutition augmentent les risques d'accumulation de fragments de nourriture, de salive et de sécrétions dans les voies aériennes en dessous des cordes vocales (qui se ferment moins bien entraînant des fausses routes), ce qui peut créer des pneumopathies. 50% des patients AMS auraient des difficultés à se nourrir, les étouffements et la toux étant des phénomènes courants. La constipation est un symptôme très fréquent dans l'AMS, peut advenir de manière précoce et causer une impaction fécale, une encoprésie et une incontinence fécale (mais de manière plus rare) (**Mathias, 1996**). Elle résulte probablement

d'un transit faible au niveau du colon, d'une diminution de la contraction phasique du rectum et d'une faible tension abdominale (Colosimo, 2011). La constipation serait observable chez plus de 50% des patients et la diminution de la vitesse de transit intestinal apparaîtrait dans les stades précoces de la maladie (Tanaka et al., 2012, Zhang et al., 2017).

Dysfonction sudomotrice : Elle est caractérisée par une diminution (hypohidrose) ou une perte (anhidrose) de la sudation. La sudation thermorégulatrice serait altérée chez 95% des patients avec une anhidrose globale pour 35% d'entre eux et régionale pour 38% (Coon et al., 2017).

Autres dysfonctions non-motrices :

Troubles du sommeil : Une réduction et une fragmentation du temps de sommeil sont fréquemment rapportées par les patients AMS. Une difficulté à s'endormir est possiblement liée à l'anxiété. On retrouve comme dans la MP le syndrome des jambes sans repos qui est présenté par 23 à 28% des patients, la rigidité et la bradykinésie, avec l'impossibilité de se retourner, ainsi que la nycturie (plus sévère que dans la MP) qui participent à la fragmentation du sommeil. De même, une somnolence diurne (qui a été observé chez environ 25 à 50% des patients AMS) et des troubles comportementaux du sommeil (de 69 à 100% des patients) sont des symptômes communs aux deux maladies et apparaissent souvent avant les symptômes moteurs dans le cas de l'AMS (Ferini-Strambi and Marelli, 2012).

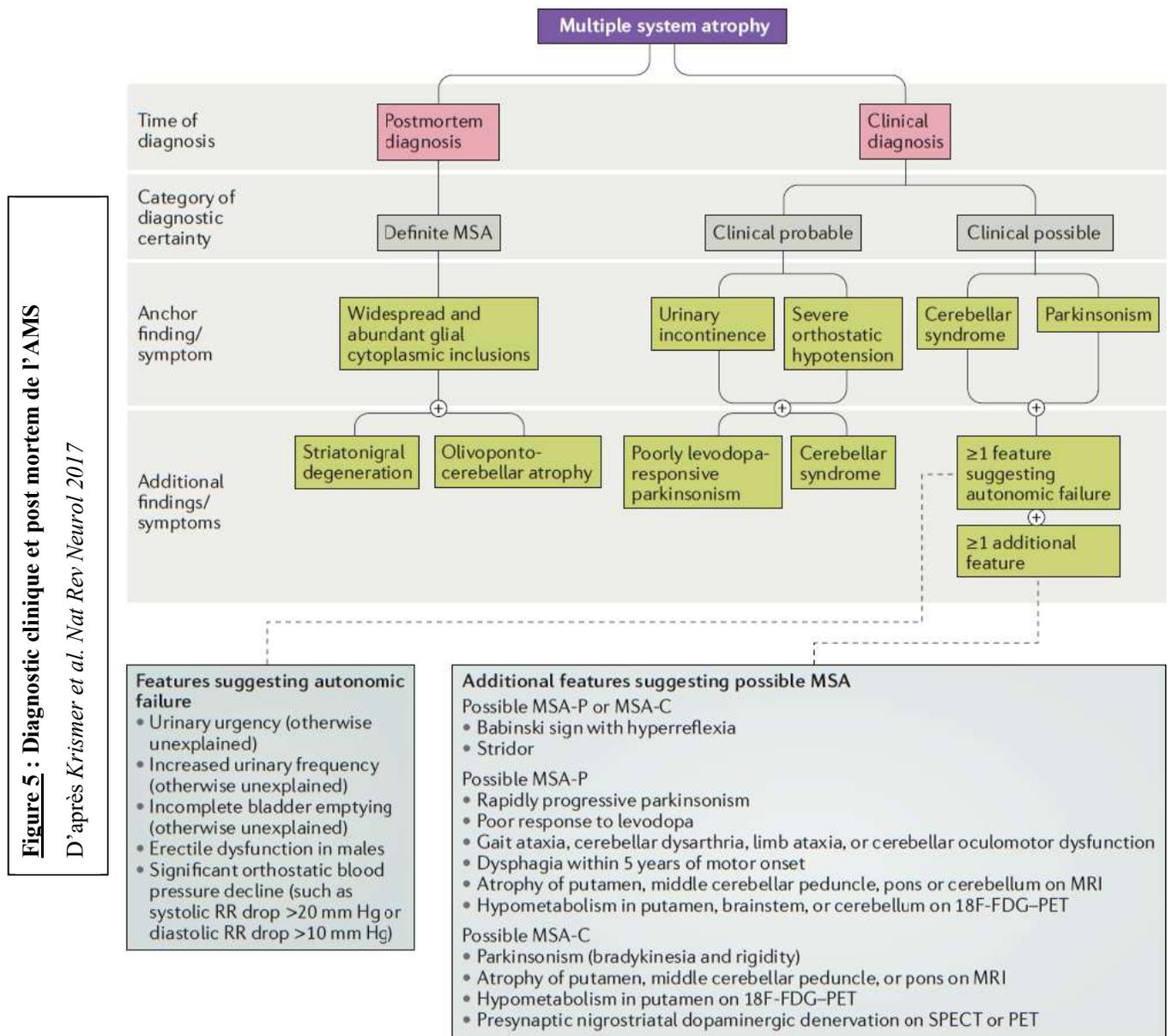
Troubles neuro-psychiatriques : 40 à 85% des patients seraient atteints de dépression légère tandis qu'un tiers serait moyennement à fortement dépressif. L'anxiété affecterait 37% des personnes atteintes de la maladie. Il semble que les patients AMS-P soient plus touchés par la dépression et les patients AMS-C, par l'anxiété bien que ces deux symptômes soient fortement présentés quel que soit le type d'AMS. L'apathie est plus fréquente que chez les patients parkinsoniens avec un taux de 65% en moyenne. Un syndrome dysexécutif affligerait jusqu'à 75% des patients, incluant un ralentissement de la vitesse de réflexion, des troubles de résolution de problèmes et de la réflexion abstraite, des difficultés de fluence verbale et diverses altérations de la flexibilité mentale, des mécanismes de l'inhibition, de l'attention et de la mémoire de travail (Stankovic et al., 2014, Auzou et al., 2015).

Causes de décès :

Une analyse de 131 patients chinois décédés a rapporté 65,6% d'infections respiratoires, 14,5% de morts subites, 9,2% de syndrome de glissement, 3,1% d'infections des voies urinaires et 2,3% de suicides (Zhang et al., 2018).

c) Diagnostic :

Le diagnostic de l'AMS est divisé en trois niveau de certitude que sont ; une AMS certaine après examen des tissus cérébraux de patients AMS et découverte d'ICG, une AMS possible et une AMS probable. Les critères de ces différents diagnostics sont présentés dans la **Figure 5** (Krismer and Wenning, 2017).



1.4 Pathophysiologie

a) Neurodégénérescence :

De nombreuses structures cérébrales présentent de la dégénérescence de la substance grise et/ou de la substance blanche (avec des intensités différentes au cas par cas) dans l'AMS. Une partie des structures présentant cette neurodégénérescence sont listées ci-dessous avec les symptômes putativement associés (d'après (Stankovic et al., 2014, Colosimo, 2011, Jecmenica-Lukic et al., 2012)). La localisation de ces structures (sauf pour les structures du cortex cérébral) est schématisée dans la **Figure 6** (adapté de (Fanciulli and Wenning, 2015, Kuzdas-Wood et al., 2014)) :

Regions presenting neurodegeneration (cell or fibre type)	Putative related symptoms
Cerebral cortex	
Primary motor cortex (pyramidal tract (da Rocha et al., 2007))	Pyramidal signs
Orbitofrontal, midfrontal, temporomesial and insular areas (grey matter (Brenneis et al., 2006))	Cognitive impairments
Frontotemporal region (white matter (Brenneis et al., 2006))	Cognitive impairment
Striato-pallido-nigral system	
Substantia nigra pars compacta (dopaminergic neurons (Adams R, 1961))	Akinesia, rigidity, dysarthria, urinary dysfunction
Striatum (putamen, caudate nucleus) and globus pallidus (medium spiny neurons, white matter (Wenning et al., 2002))	Akinesia, rigidity, dysarthria, dystonia, impaired response to levodopa, dysexecutive syndrome, urinary dysfunction
Olivopontocerebellar system	
Inferior olive (GABAergic neurons (Sakurai et al., 2002))	Ataxia
Pons: pontine nuclei, pontine micturition centre (white matter, noradrenergic neurons, pontine neurons (Brenneis et al., 2006, Kuzdas-Wood et al., 2014))	Ataxia, urinary and respiratory dysfunction
Cerebellum: hemispheres and vermis (Purkinje cells, grey matter, white matter (Brenneis et al., 2006))	Ataxia, urinary dysfunction, oculomotor disorders, dysarthria, cognitive impairments

Hypothalamus

Suprachiasmatic nucleus (arginine-vasopressin neurons (Ozawa et al., 1998))	Impaired circadian rhythm
Paraventricular nucleus (arginine-vasopressin neurons (Benarroch et al., 2006a))	Impaired circadian rhythm, sleep apnoea, respiratory arrhythmia, orthostatic hypotension

Autonomic brainstem nuclei

Pedunclopontine nuclei (cholinergic neurons (Schmeichel et al., 2008))	Dystonia in vocal cord muscle during inspiration, rapid eye movements sleep behaviour disorder, postural instability
Laterodorsal nuclei (cholinergic neurons (Schmeichel et al., 2008))	Dystonia in vocal cord muscle during inspiration
Periaqueductal grey system (catecholaminergic, glutamatergic neurons (Benarroch et al., 2010))	Excessive daytime sleepiness, arousal disorders, cardiovascular, respiration, pain modulation and urinary dysfunction
Locus coeruleus (catecholaminergic neurons (Ling et al., 2015))	Urinary dysfunction, anxiety, sleep disruption
Raphe nuclei (serotonergic neurons (Kuzdas-Wood et al., 2014))	Respiratory dysfunction
Medulla: ventrolateral medulla, rostral medullary raphe nuclei, medullary cardiovascular centre (catecholaminergic neurons, serotonergic neurons (Benarroch et al., 1998, Jecmenica-Lukic et al., 2012))	Orthostatic hypotension, impaired skin vasomotor activity, respiratory dysfunction
Dorsal motor nucleus of the vagus (cholinergic neurons (Benarroch et al., 2006b))	Urinary and gastrointestinal dysfunction
Nucleus ambiguus (cholinergic neurons (Benarroch et al., 2006b))	Stridor, cardiovagal failure

Spinal cord

intermediolateral columns of the thoracolumbar cord (preganglionic sympathetic neurons (Wenning et al., 2012))	Orthostatic hypotension
Onuf's and inferior intermediolateral sacral nuclei ((Wenning et al., 2012))	Urogenital and anal dysfunction

Tableau 2 : Régions atteintes par la neurodégénérescence dans l'AMS et symptômes associés

Symptômes d'après *Stankovic et al. Mov Disord 2014, Colosimo et al. Nat Rev Neurol 2011 et Jecmenica-Lukic et al. Lancet Neurol 2012*

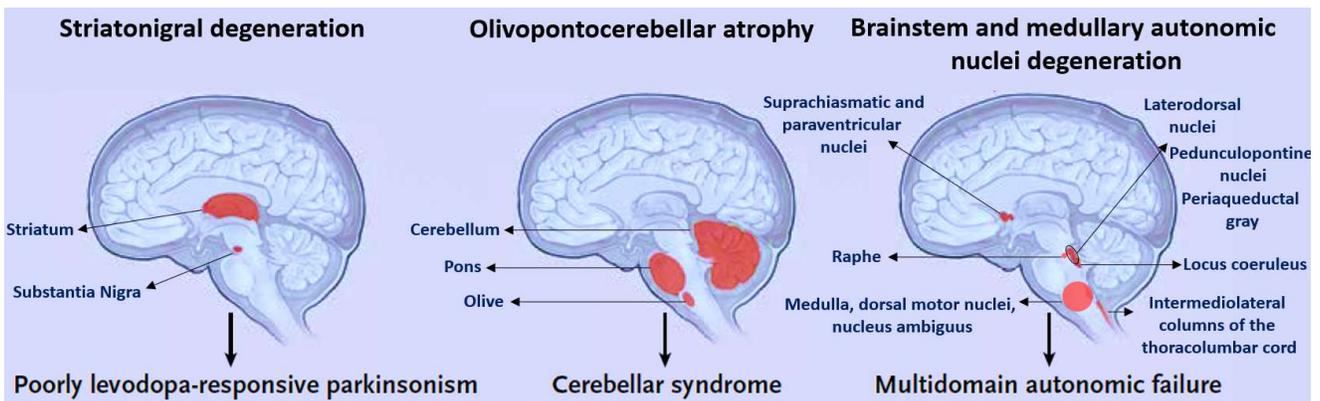


Figure 6 : Régions atteintes par la neurodégénérescence dans l'AMS

D'après *Fanciulli et al. N Engl J Med 2015*, adapté grâce à *Kuzdas-Wood et al. Prog Neurobiol 2014*

Les symptômes associés au syndrome parkinsonien sont causés par la dégénérescence de la substance noire compacte (SNc) et du striatum. Cette voie striato-nigrale est essentielle au contrôle des mouvements volontaires et fait partie d'un ensemble de structures inter communicantes nommées ganglions de la base. Ces structures incluent la SNc et réticulée (SNr), le striatum (composé du putamen et du noyau caudé), le cortex moteur, le globus pallidus (externe et interne) et le noyau sous-thalamique (**Figure 7A**, d'après (**Redgrave et al., 2010**)).

La substance noire (SN) est localisée au niveau du mésencéphale et doit son nom à la couleur sombre de ses neurones synthétisant la dopamine (DA), qui tirent leur pigmentation de la neuromélanine. La substance SNc est la partie où se trouvent la grande majorité des corps cellulaires des neurones dopaminergiques. Ces neurones projettent notamment sur le striatum (**Figure 7Ba**, d'après (**Dauer and Przedborski, 2003**)) où la DA libérée va activer les neurones possédant les récepteurs dopaminergiques D1 ou D2 qu'on nomme medium spiny neurons.

En plus de la dégénérescence des neurones dopaminergiques la SNc (**Figure 7Bb**), qui est aussi retrouvée dans la MP, dans l'AMS, les medium spiny neurons striataux sont également touchés (**Figure 7C**, d'après (**Ahmed et al., 2012**)). De par cette dégénérescence striatale, les agonistes dopaminergiques ou la L-Dopa utilisés dans la MP ont peu, voire aucun effet dans l'AMS.

L'apparition précoce de symptômes autonomes dans la majorité des cas suggère que la dégénérescence des régions associés advient très tôt dans l'AMS et il est difficile de déterminer si les régions motrices dégèrent en parallèle ou plus tardivement car les analyses post mortem de patients AMS précoce sont extrêmement rares (**McKay and Cheshire, 2018**). Il n'y a donc pas de pattern de propagation théorique des lésions et de la dégénérescence dans l'AMS, l'analyse étant rendue compliquée par le grand nombre de régions atteintes et la disparité de la neurodégénérescence. Il est néanmoins supposé, du fait de la réponse partielle à la L-Dopa dans

les stades précoces des patients AMS-P et de la sévérité des lésions au niveau de la SNc, que la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc adviendrait avant celle des neurones striataux (medium spiny neurons) (Ozawa et al., 2004).

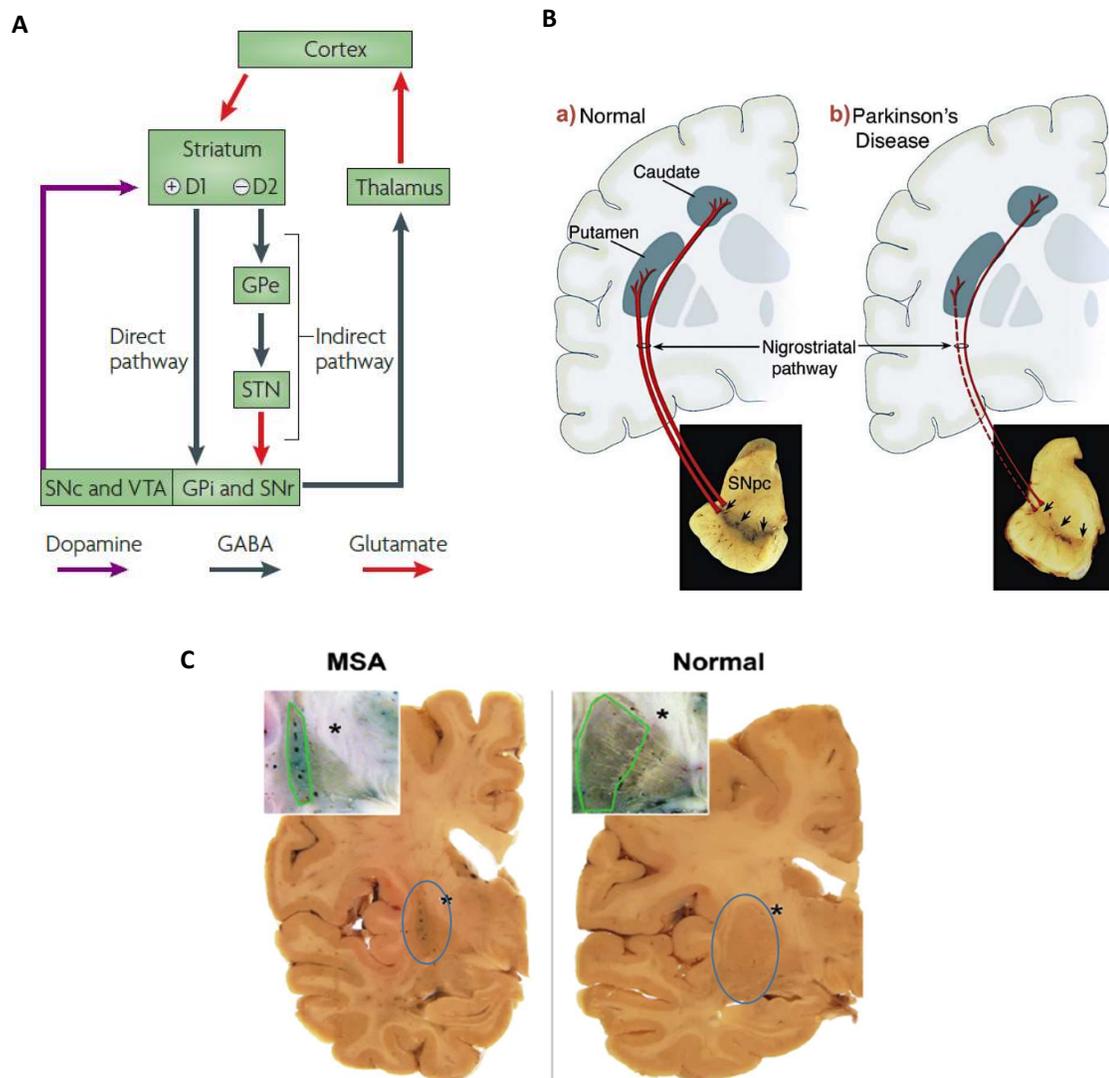


Figure 7 : Représentations simplifiées des interactions des structures des ganglions de la base

Schématisation du circuit des ganglions de la base lors du contrôle des mouvements volontaires (A) et de la voie striato-nigrale chez le sujet sain (Ba) ou atteint de la MP (Bb). Représentation de la dégénérescence du putamen chez le sujet AMS (C). GPi/GPe : globus pallidus interne/externe, STN : noyau sous thalamique, VTA : aire tegmentale ventrale.

D'après Redgrave et al. *Nat Rev Neurosci* 2010, Dauer et al. *Neuron* 2003, et Ahmed et al. *Neuropathol and Applied Neurobiol* 2012

b) Description et topographie des lésions :

Bien que les ICG soient les principales lésions retrouvées dans l'AMS, il y a également des inclusions neuronales cytoplasmiques, nucléaires et neuritiques d' α -syn mais dans une mesure bien moindre. Les inclusions cytoplasmiques neuronales possèdent une composition immunohistochimique et une ultrastructure virtuellement identique à celle des ICG tandis que les inclusions nucléaires neuronales sont un réseau moins dense et irrégulier de fibrilles et leur faible nombre est possiblement lié à la neurodégénérescence sévère impliquée dans l'AMS (**Yokoyama et al., 2001, Nishie et al., 2004**). Les ICG mesurent entre 20 à plus de 30nm, sont formés de filaments tubulaires parallèles qui s'étendent dans les prolongements des oligodendrocytes et possèdent un 'noyau' de 10nm fortement concentré en α -syn, ce noyau étant lui-même composé de fibrilles de 3 à 6nm soupçonnés d'être des oligomères d' α -syn. La partie externe des agrégats est constituée d'un groupe hétérogène de protéines et de molécules, comprenant, entre autres (**Wenning et al., 2008**), de l' α -syn non agrégée et les protéine p25 α , tau, ubiquitine, tubuline, Cdk5 et MAP2 (**Gai et al., 2003, Valera and Masliah, 2018**). On retrouve également une augmentation massive de l' α -syn (monomérique et de haut poids moléculaire) au niveau des membranes cellulaires dans le putamen, la SN et la substance blanche de la capsule interne, avec une déplétion de la forme monomérique cytosolique dans le putamen (**Tong et al., 2010**). Il est possible que l'expression de l' α -syn soit augmentée au niveau des oligodendrocytes ou de manière globale dans l'AMS, ce qui pourrait expliquer la présence des agrégats, mais le peu d'études réalisées sur le sujet ne permettent pas d'affirmer cela de manière catégorique (**Asi et al., 2014, Brudek et al., 2016, Djelloul et al., 2015**).

Les ICG sont retrouvés dans la majorité des régions du SNC et n'ont généralement pas une distribution groupée (en cluster) comme pour les LBs dans la MP (**Armstrong et al., 2006**). Les ICG sont plus présents dans la substance blanche et sont prédominants au niveau des fibres reliant le striatum au globus pallidus, la capsule interne, la capsule externe, le corps calleux, la commissure antérieure, le tractus cortico-pontin, le faisceau pyramidal, la substance blanche cérébelleuse et la substance blanche subcorticale des lobes pariétaux, (régions pré-motrices et motrices) et du lobe frontal (aire motrice corticale supplémentaire). Dans la substance grise, les ICG ont une forte densité de distribution au niveau du striatum (la partie dorsolatérale du putamen étant la plus sévèrement touchée dans l'AMS), le globus pallidus et l'olive bulbaire. Très peu d'ICG sont en revanche retrouvés dans le noyau sous-thalamique, le pédoncule cérébral supérieur, le cortex cérébelleux, le noyau dentelé et la colonne dorsale de la moelle épinière (**Inoue et al., 1997**). La densité des lésions serait corrélée positivement avec la sévérité

de la dégénérescence observée dans le système striato-nigral et olivo-ponto-cérébelleux, les régions les plus affectées par la neurodégénérescence étant la SN (AMS-P) et le vermis cérébelleux (AMS-C) (**Ozawa et al., 2004**). Il est difficile de déterminer si les ICG sont en partie responsables de la pathologie ou si ils en sont une conséquence, mais certains variants AMS très rares et agressifs (appelés ‘minimal change MSA’) présentent une dégénérescence limitée à certaines zones (SNc et locus coeruleus par exemple) qui est plus faible que pour les cas d’AMS classique avec une distribution des ICG qui elle est comparable à celle retrouvée dans une AMS classique, ce qui pourrait indiquer que la présence des ICG serait à l’origine des symptômes qu’on retrouve dans ces cas, avant qu’il n’y ait aucune perte neuronale (il n’est toutefois pas exclu que cela soit dû à d’autres phénomènes pathologiques) (**Ling et al., 2015**). De plus dans de très rares cas d’analyse de tissus cérébraux de sujets âgés sains, des ICG ont été retrouvés, ce qui pourrait indiquer que la formation des ICG serait antérieure à la neurodégénérescence (**Fujishiro et al., 2008**). C’est pour ces raisons que l’AMS est soupçonnée d’être, de manière primaire, une oligodendrogliopathie (**Wenning et al., 2008**).

c) Démyélinisation et altérations oligodendrogliales :

Les oligodendrocytes, ainsi que les microglies, ont été caractérisés en histologie par Pío del Río Hortega en 1921 grâce à un marquage utilisant du carbonate d’argent. Leur nombre important dans la substance blanche et leur apparition pendant le développement au même moment que la myélinisation des axones a rapidement permis de faire le lien entre la myéline (déjà connue depuis 1858, mais considérée comme une substance constituée de corps gras, située autour des axones et sécrétée dans le milieu extracellulaire) et ce nouveau type cellulaire. En 1954, Betty Ben Geren utilisant la microscopie électronique découvre que la myéline est une extension de la membrane des cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique et il sera confirmé par la suite que ce rôle est affecté aux oligodendrocytes dans le SNC. La myéline est donc constituée de plusieurs couches de même épaisseur provenant de la même membrane oligodendrogliale enroulée sur elle-même autour d’un axone. Sa fonction est d’isoler électriquement la membrane axonale sauf sur de petites portions de 1 à 2 μm nommées nœuds de Ranvier (où la concentration des canaux ioniques est forte), ce qui permet une diffusion plus rapide de l’influx nerveux (ce qui est décrit comme une conduction saltatoire car le potentiel d’action ‘saute’ de nœud en nœud). La myéline est ce qui donne sa couleur à la substance blanche et est composée à 40% d’eau (pour comparaison 80% pour la substance grise), le reste étant formé à 70-80% de lipides et de protéines dont la protéine basique de la myéline (MBP)

et la protéine protéolipidique (PLP) qui sont les plus abondantes. Du fait de sa composition lipidique contenant beaucoup d'acides gras saturés à longues chaînes, des glycosphingolipides et environ 40% de cholestérol (avec une demie vie de 7 à 8 mois) et ses protéines qui comptent parmi celles qui possèdent une très longue durée de vie, la myéline est extrêmement stable. La plupart des oligodendrocytes génèrent entre 20 et 60 prolongements qui vont myéliniser les axones sur une longueur de 20 à 200 μm , pouvant parfois s'enrouler plus de cent fois sur eux-mêmes. Plusieurs étapes complexes sont nécessaires à l'oligodendrocyte pour myéliniser un axone ; brièvement, les cellules précurseuses des oligodendrocytes (OPCs) prolifèrent d'abord dans la substance blanche avant de migrer, puis elles ciblent et reconnaissent l'axone à myéliniser. L'OPC va alors se différencier en oligodendrocyte myélinisant (**Simons and Nave, 2015**). Selon son stade de maturation et sa fonction (qui n'est pas réduite à la myélinisation), l'oligodendrocyte va présenter un profil morphologique et d'expression protéique différent (voir **Figure 8** ci-dessous d'après (**Amaral et al., 2016**)).

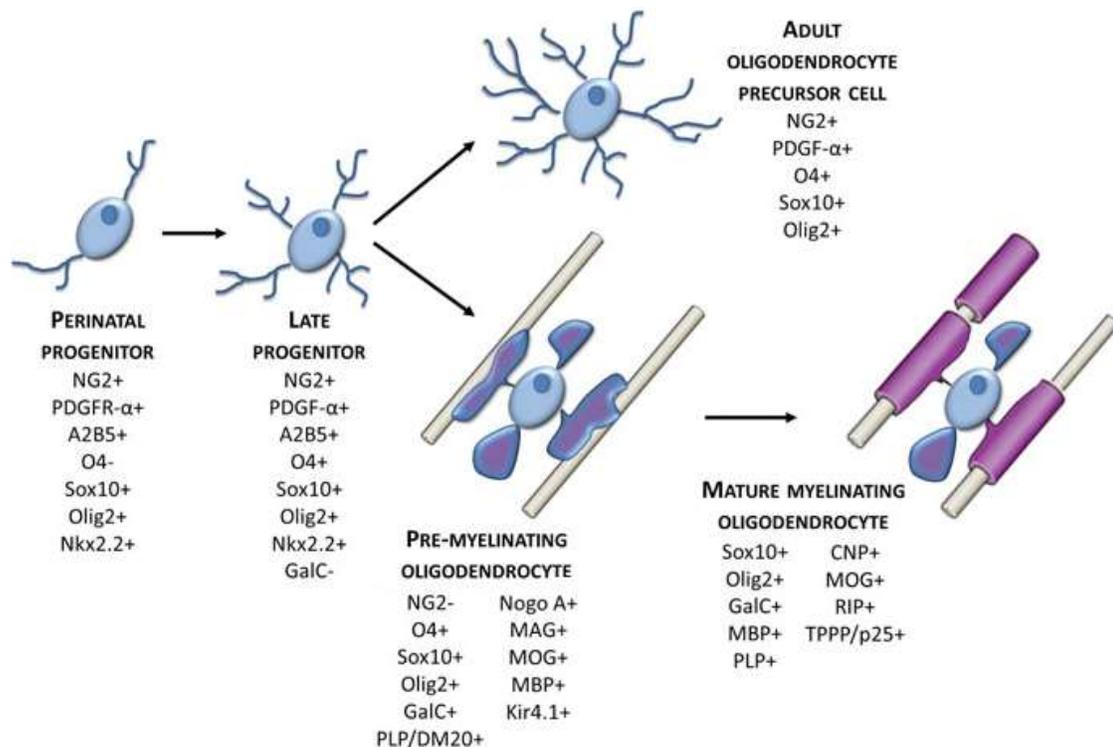


Figure 8 : Profil d'expression des gènes des différents stades de maturation des oligodendrocytes

D'après *Amaral et al. Adv Neurobiol 2016*

En plus d'augmenter la vitesse de l'influx nerveux, la structure de la gaine de myéline préserve l'intégrité de l'axone en limitant l'accès des métabolites de l'espace extracellulaire. Des expériences menées chez la souris montrent que certaines modifications de la structure de la myéline (en altérant l'expression des protéines qui la composent) peuvent induire une détérioration du transport axonal, une dégénérescence tardive des axones et pour certaines être léthales. Le métabolisme énergétique des axones des neurones myélinisés semble en partie lié à celui des oligodendrocytes. En effet les oligodendrocytes peuvent internaliser le glucose provenant de la circulation sanguine et/ou indirectement via les astrocytes et libérer les produits de la glycolyse (pyruvate/lactate) dans l'espace entre l'axone et la gaine de myéline. Ces produits peuvent être captés par l'axone via les transporteurs monocarboxylate (MCT). Le lactate peut ensuite être utilisé localement par la mitochondrie pour produire de l'ATP. Il est difficile d'estimer l'importance de l'apport oligodendroglial sur le métabolisme axonal, mais une diminution de 50% du transporteur MCT1 est suffisante pour déstabiliser le maintien sur le long terme des axones myélinisés (**Simons and Nave, 2015**).

Papp et Lantos avec la découverte des ICG ont également constatés que la myéline est altérée (diminution du marquage Luxol Fast Blue en histologie) dans plusieurs régions du SNC dans les cas d'AMS (voir **tableau 2** pour plus de précision) (**Papp et al., 1989**). Une perte sévère de myéline semble être présentée par environ 50% des patients AMS, de manière prédominante pour l'AMS-C (**Ishizawa et al., 2008**). Dans ces zones de dégénérescence on retrouve une diminution de moitié de la quantité de certaines protéines composant la myéline telles que la sphingomyéline, les sulphatides et la galactosylceramide (**Don et al., 2014**). Des modifications de la protéine MBP rencontrées uniquement dans les cas de démyélinisation sont également fréquemment observables (**Matsuo et al., 1998**). Dans l'AMS, certaines protéines associées à la myéline, comme la protéine MBP ou p25 α , sont relocalisés de manière anormale dans le cytosol et le noyau, parfois de manière précoce précédant l'apparition d'ICG (**Song et al., 2007, Ota et al., 2014**). Une hypothèse est que cette relocalisation est à l'origine de la forme dilatée du corps cellulaire des oligodendrocytes caractéristique de l'AMS. On observe une augmentation de la protéolyse mais aussi une accumulation de la protéine MBP dans ces oligodendrocytes (**Bleasel et al., 2014**). La perturbation de l'interaction myéline-axone est putativement une des causes de la neurodégénérescence dans l'AMS, mais d'autres mécanismes pathologiques interviennent également.

d) Inflammation :

Parmi les cellules gliales, la microglie intervient dans les mécanismes de défense immunitaire et de phagocytose dans le SNC. Les astrocytes quant à eux sont des cellules impliquées dans de nombreux mécanismes physiologiques tels que le maintien de la barrière hémato encéphalique, de l'homéostasie ionique et sont un des acteurs majeurs de la synapse tripartite. Lors d'une altération de l'homéostasie du SNC (corps étranger, lésion...) ces deux types cellulaires peuvent présenter un phénotype pro-inflammatoire adapté à l'élimination des tissus endommagés et des corps étrangers mais qui peut être délétère et promouvoir la mort cellulaire s'il est chronique (**Jakel and Dimou, 2017**). L'astroglie et la microglie (prolifération, changement morphologique et activation pro-inflammatoire) ont été mise en évidence dans de nombreuses régions cérébrales où on retrouve de la neurodégénérescence dans l'AMS, pour n'en citer que quelques-unes : le putamen, la SN, le noyau caudé, le cortex moteur, le noyau pédonculopontin, le locus coeruleus, la substance blanche cérébelleuse, la couche de cellules de Purkinje du cervelet, le noyau du nerf vague ainsi que divers noyaux autonomes (**Adams R, 1961, Shy and Drager, 1960, Probst-Cousin et al., 1998, Wenning et al., 1995, Watanabe et al., 2002**). L'astroglie serait corrélée avec la sévérité de la neurodégénérescence (**Ozawa et al., 2004**), tandis que la microglie serait très présente dans les faisceaux de substance blanche connectés au cervelet et les systèmes moteurs extrapyramidaux (où la phagocytose de la myéline a déjà été observée) et positivement corrélée à la charge d'ICG (toujours dans ces structures) (**Ishizawa et al., 2004**). Il semble que la proximité des astrocytes avec les ICG soit corrélée à leur activation pro-inflammatoire (**Radford et al., 2015**). Il est supposé qu'une inflammation chronique prend place dans l'AMS et qu'elle participerait à la dysfonction oligodendrogliale, la démyélinisation et la neurodégénérescence.

e) Altération des mécanismes de dégradation protéiques :

-Le système ubiquitine-protéasome : c'est le mécanisme le plus commun lors de la dégradation de protéines solubles au niveau cytoplasmique, nucléaire et du réticulum endoplasmique. Le protéasome est une petite organelle circulaire possédant un site catalytique où les protéines sont dégradées en peptides et des sous unités régulant l'entrée des protéines et l'activation du site catalytique (**Ebrahimi-Fakhari et al., 2012**). Le mécanisme d'adressage d'une protéine pour être dégradée par le protéasome nécessite différentes réactions enzymatiques impliquant des

monomères d'ubiquitine (une petite protéine globulaire très stable) et est décrit dans la **Figure 9** d'après (Tu et al., 2012).

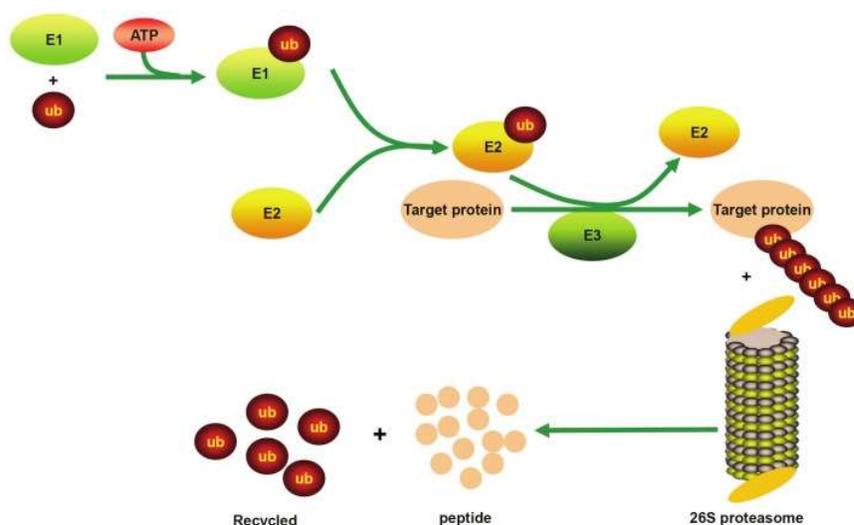


Figure 9 : Le système ubiquitine-protéasome

L'ubiquitine est activée par la liaison à E1 qui la transfère à E2. E3 interagit avec E2 et forme la chaîne d'ubiquitine au niveau de la protéine cible. La protéine est ensuite dégradée par le protéasome 26S reconnaissant la signature de la chaîne d'ubiquitine. Ub : ubiquitine, E1 : enzyme d'activation de l'ubiquitine, E2 : enzyme conjugué à l'ubiquitine, E3 : ubiquitine ligase.

D'après Tu et al. *Int J Clin Exp Pathol* 2012

Le fait que les ICG soient fortement ubiquitinylés (Pountney et al., 2005, Probst-Cousin et al., 1996) a poussé la recherche à s'intéresser à une possible dysfonction du système ubiquitine-protéasome dans l'AMS. Ainsi une modification de l'expression des sous-unités constituant le protéasome dans la SN a été mise en évidence dans le tissu post-mortem de patients AMS (Bukhatwa et al., 2010). De plus son activité semble légèrement diminuée dans le striatum (Furukawa et al., 2002). Une inhibition de l'activité du protéasome in-vitro sur des neurones corticaux est suffisante pour induire la formation d'agrégats cytoplasmiques ubiquitinylés contenant de l' α -syn (bien qu'elle ne soit ni agrégée, ni ubiquitinylée) et la mort cellulaire (Rideout and Stefanis, 2002).

-Le système autophagie-lysosomes : Les lysosomes sont des vésicules de 0,2 à 0,5 μ m ayant une membrane lipidique simple qui contiennent diverses protéases, hydrolases, lipases et glycosidases. Les conditions de dégradations des divers substrats sont assurées par une régulation du pH acide via des pompes à protons ATP dépendantes (Ebrahimi-Fakhari et al.,

2012). Les différentes voies adressant les substrats dégradés au niveau du lysosome, dont fait partie l'autophagie, sont décrites dans la **Figure 10**, d'après (Dehay et al., 2013).

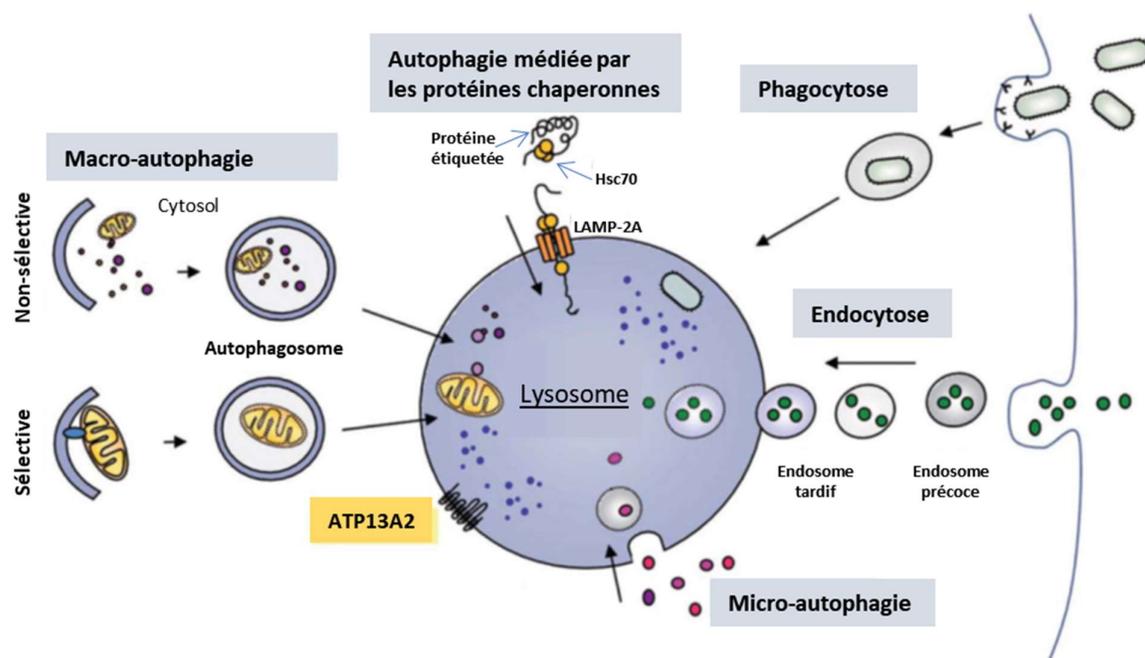


Figure 10 : Les voies de dégradations par le lysosome

Plusieurs voies de dégradation incluant l'endocytose, la phagocytose et l'autophagie convergent vers le lysosome. Différents types d'autophagies existent tel que la micro-autophagie impliquant l'invagination de la membrane du lysosome séquestrant et dégradant directement des régions entières du cytoplasme (organelles et protéines comprises). Lors de la macro-autophagie, qui peut être sélective de certains substrats marqués ou non spécifique en englobant une partie du cytosol, les composants à recycler sont confinés dans des vésicules formées de doubles membranes lipidiques nommées autophagosomes qui vont ensuite fusionner avec le lysosome. L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes est spécifique de certaines protéines marquées qui sont directement transférées dans le lysosome via les canaux LAMP-2A par un mécanisme impliquant les chaperonnes incluant l'Hsc70. ATP13A2 est une ATPase transmembranaire lysosomale.

D'après Dehay et al. *Mov Disord* 2013

Dans l'AMS, au niveau de la substance blanche cérébelleuse, l'expression des protéines GABARAPL1 et GATE16 impliquées dans la formation des autophagosomes est diminuée tandis que les enzymes lysosomales cathepsine A et D sont, elles, plus fortement exprimées (Tanji et al., 2013). De plus LC3 et AMBRA1, des protéines clefs dans la régulation de l'autophagie, colocalisent fortement avec les ICG (Schwarz et al., 2012, Miki et al., 2018). Une étude récente a montré que certains micros ARNs régulant l'autophagie (let-7b, miR-101 et miR-34c) ont une expression différente dans le putamen des patients AMS comparativement aux sujets sains (Valera et al., 2017). Cette même étude décrit les autophagosomes de patients

AMS comme étant plus gros et possédants plus d'inclusions denses en microscopie électronique.

Il est possible que ces deux systèmes connus pour réguler la dégradation de l' α -syn (**Xilouri et al., 2016**) soient altérés, ce qui participerait à son agrégation et à la formation d'ICG.

f) Résistance à l'insuline :

L'insuline est une hormone produite par les cellules β du pancréas qui est majoritairement connue pour son action hypoglycémiante via l'activation de récepteurs responsables du transport du glucose de la circulation sanguine au compartiment intracellulaire. Elle peut traverser la barrière hémato encéphalique (**Schwartz et al., 1991**) à l'aide de transporteurs en suivant un gradient de concentration saturable (**Banks et al., 1997**) et être diffusée au niveau du SNC. Des expériences in-vitro sur des cultures neuronales ont démontrées que l'insuline promeut la survie cellulaire (**Mielke et al., 2006**), le maintien des connexions synaptiques (**Man et al., 2000**) et le développement dendritique (**Govind et al., 2001**). In-vivo, l'insuline améliore la mémoire à long et court terme chez le rat (**Dou et al., 2005**) et la souris (**Marks et al., 2009**) et est essentielle à la formation de certains circuits neuronaux (**Chiu and Cline, 2010**).

Chez les patients atteints de maladies neurodégénératives telles que la MP ou la maladie d'Alzheimer, il y a une diminution de la sensibilité de la voie de signalisation intracellulaire de l'insuline (récepteurs moins disponibles, acteurs de la voie inhibés par phosphorylation) qu'on nomme résistance à l'insuline. Chez les animaux modélisant ces pathologies, l'insuline, le facteur de croissance de l'insuline (IGF-1) et le glucagon like peptide 1 (GLP-1), activant des récepteurs différents mais dont les voies de signalisation intracellulaires sont interconnectées (**Figure 11**, d'après (**Bassil et al., 2014**)) ont montrés des effets neuroprotecteurs (**Bassil et al., 2014**).

Dans l'AMS, on retrouve cette résistance à l'insuline (mesurée par la phosphorylation inhibitrice de la protéine IRS-1 en Ser312) au niveau des neurones et des oligodendrocytes des patients et du striatum d'animaux modélisant certains aspects de la pathologie. Cette résistance à l'insuline est atténuée par un analogue de GLP-1, ce qui diminue également la neurodégénérescence dans ce modèle (**Bassil et al., 2017**). Cette altération du métabolisme cellulaire n'a pas encore été analysée en profondeur et pourrait être impliqué dans la dysfonction oligodendrogliale et neuronale.

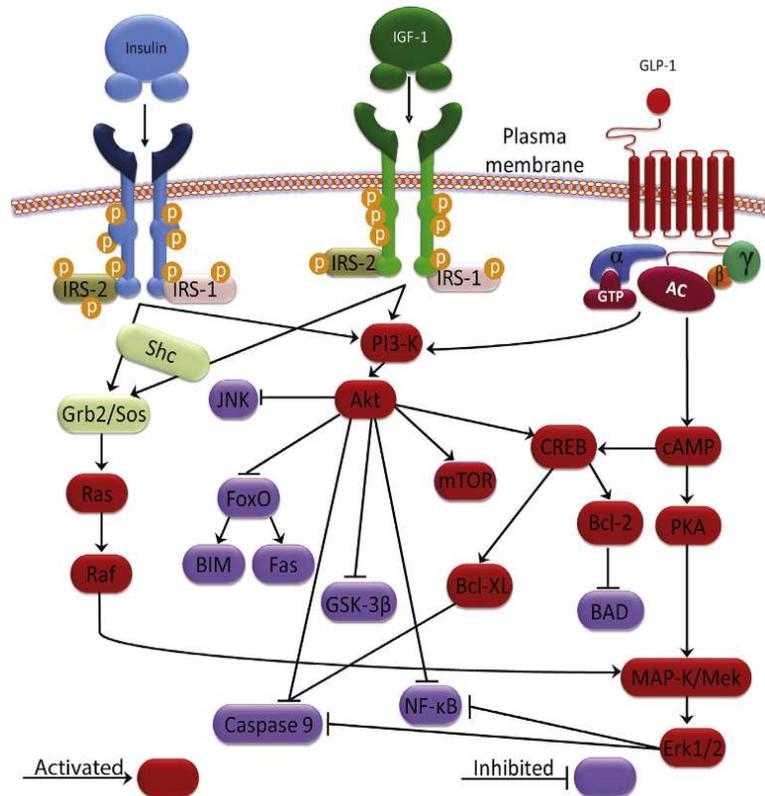


Figure 11 : Les voies de signalisation cellulaires de l'insuline, IGF-1 et GLP-1

D'après *Bassil et al. Prog Neurobiol 2014*

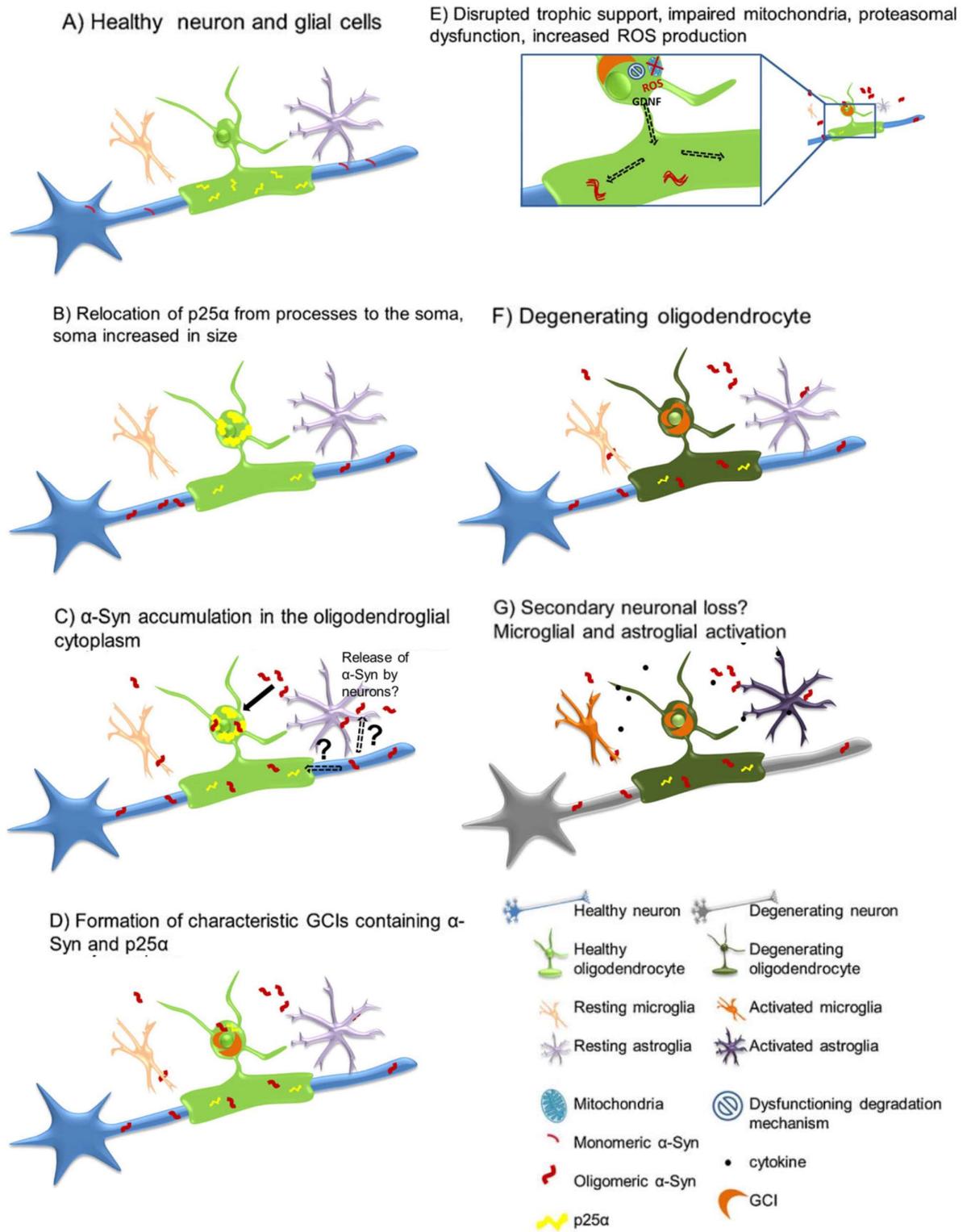
g) Cascade d'événements pathologiques dans l'AMS : où en sommes-nous ?

La cascade d'événements entraînant la neurodégénérescence est encore méconnue et hypothétique du fait de la complexité des phénomènes pathologiques. On pense aujourd'hui que l'AMS est une oligodendroglieopathie primaire et qu'une des premières conséquences de la pathologie est l'agrégation de l' α -syn dans les oligodendrocytes (voir '**b) Topographie et description des lésions**'). L'expression basale d' α -syn étant faible au niveau des oligodendrocytes, la raison de son accumulation est soumise à débat ; une étude a montré une surexpression de l'ARNm de l' α -syn dans les oligodendrocytes en post mortem chez les patients AMS (**Asi et al., 2014**) (contrairement à des études antérieures (**Miller et al., 2005, Jin et al., 2008, Ozawa et al., 2001**)). Une autre hypothèse est que l' α -syn produite par les neurones pourrait être captée par les oligodendrocytes via l'endocytose, ceci étant appuyé par des expériences in-vitro et in-vivo (**Reyes et al., 2014, Lee et al., 2008**), bien qu'il n'y ait pas

d'agrégation similaire aux ICGs (**Valera and Masliah, 2018**). Cela semble indiquer que les oligodendrocytes sont capables, en situation physiologique, de ménager et dégrader l' α -syn captée depuis le milieu extra cellulaire et qu'une dysfonction inconnue altérant ces mécanismes pourrait être à l'origine de l'agrégation. Précédant l'accumulation d' α -syn, la relocalisation de la protéine p25 α dans le soma a pu être observée avec une modification morphologique typique de celle retrouvée dans les oligodendrocytes présentant des ICG (gonflement du soma). P25 α stimulerait en outre l'agrégation de l' α -syn et sa relocalisation serait responsable de la dégradation de la protéine MBP avec qui elle interagit en conditions physiologiques (**Song et al., 2007**). Plusieurs études suggèrent que l' α -syn pathologique est capable d'engendrer un environnement propice à la neuroinflammation (voir partie '2 α -Synucléine') et dans le modèle de souris PLP-syn surexprimant l' α -syn dans les oligodendrocytes, l'apparition de l'inflammation est corrélée à la neurodégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc (**Stefanova and Wenning, 2016**). L'inflammation chronique et la dysfonction oligodendrogliale seraient alors impliquées dans la neurodégénérescence (**Figure 12**, d'après (**Stefanova and Wenning, 2016**)).

Figure 12 : Possible cascade d'événements impliqués dans la mort neuronale de l'AMS

D'après *Stefanova et al. Neuropathol Appl Neurobiol 2016*



1.5 Prise en charge clinique

Dans les stades les plus précoces de la maladie, les symptômes moteurs parkinsoniens peuvent parfois être atténués par la L-Dopa (précurseur de la dopamine), dont l'effet est bénéfique pour environ 31% des patients pour une durée moyenne de 3,5 ans. Les traitements symptomatiques pharmacologiques existants sont listés dans le **Tableau 3** (d'après **(Maass et al., 2016)**). Associé à un traitement médicamenteux, l'hypotension peut être amoindrie par des bas de contention élastiques, une diète riche en sel, une hydratation importante, des repas fréquents mais en faibles quantités, une surélévation de la tête durant le sommeil et des précautions pour passer à l'état debout. Dans de très rares cas (si le patient a un stridor en journée ou les cordes vocales immobilisées), une trachéotomie peut être envisagée **(Maass et al., 2016)**. Les stratégies thérapeutiques ciblant les différents phénomènes pathologiques de l'AMS ont montrés qu'ils pouvaient infléchir le cour de la maladie dans des modèles précliniques, mais dans la majorité des cas, échouent à induire un effet en phase clinique (voir **Tableau 4**, d'après **(Stefanova and Wenning, 2016)**). La pathologie étant diagnostiquée lors de l'apparition des symptômes moteurs, la neurodégénérescence est déjà avancée, ce qui limite l'effet potentiel des stratégies thérapeutiques. La recherche de biomarqueurs pour détecter précocement l'AMS est donc une nécessité, ensemble avec le développement de biomarqueurs du pronostic qui pourraient également servir comme critère de jugement des essais cliniques à venir.

Parkinsonism	Levodopa (3–4 × 100–200 mg) (evidence level 2–, recommendation grade B) Amantadine (3 × 100–200 mg); (evidence level 1–, recommendation grade 0) Dopamine agonists (no evidence, recommendation grade 0) Physical therapy (no evidence, recommendation grade 0)														
Dystonia	Botulinum toxin A: (evidence level 3, recommendation grade 0)														
Cerebellar ataxia	No drug treatment option available Physical therapy (no evidence, recommendation grade 0)														
Autonomic failure	<table border="0"> <tbody> <tr> <td>Orthostatic hypotension</td> <td>Ephedrine (3 × 15–45 mg) (evidence level 3, recommendation grade 0) Midodrine (3 × 5–10 mg) (evidence level 1+, recommendation grade A) Fludrocortisone (1–3 × 0,1 mg) (evidence level 3, recommendation grade 0) L-threo-DOPS (100, 200 and 300 mg, twice daily) (evidence level 1, recommendation grade B)</td> </tr> <tr> <td>Postprandial hypotension</td> <td>Octreotide (25–50 mg s.c. 30 min before meals) (evidence level 2–, recommendation grade 0)</td> </tr> <tr> <td>Urge incontinence</td> <td>Oxybutinin (2–3 × 2.5–5 mg) (evidence level 4, recommendation grade 0)</td> </tr> <tr> <td>Incomplete bladder emptying</td> <td>Self-catheterization or suprapubic catheter</td> </tr> <tr> <td>Constipation</td> <td>Macrogol 3350 (evidence level 4, recommendation grade 0)</td> </tr> <tr> <td>Nocturnal polyuria</td> <td>Desmopressin (10–40 µg spray, 100–400 µg tablets) (evidence level 3, recommendation grade 0)</td> </tr> <tr> <td>Erectile dysfunction</td> <td>Sildenafil (50 mg p.o.) (evidence level 1, recommendation grade 0) <u>Cave: Orthostatic dysfunction</u></td> </tr> </tbody> </table>	Orthostatic hypotension	Ephedrine (3 × 15–45 mg) (evidence level 3, recommendation grade 0) Midodrine (3 × 5–10 mg) (evidence level 1+, recommendation grade A) Fludrocortisone (1–3 × 0,1 mg) (evidence level 3, recommendation grade 0) L-threo-DOPS (100, 200 and 300 mg, twice daily) (evidence level 1, recommendation grade B)	Postprandial hypotension	Octreotide (25–50 mg s.c. 30 min before meals) (evidence level 2–, recommendation grade 0)	Urge incontinence	Oxybutinin (2–3 × 2.5–5 mg) (evidence level 4, recommendation grade 0)	Incomplete bladder emptying	Self-catheterization or suprapubic catheter	Constipation	Macrogol 3350 (evidence level 4, recommendation grade 0)	Nocturnal polyuria	Desmopressin (10–40 µg spray, 100–400 µg tablets) (evidence level 3, recommendation grade 0)	Erectile dysfunction	Sildenafil (50 mg p.o.) (evidence level 1, recommendation grade 0) <u>Cave: Orthostatic dysfunction</u>
Orthostatic hypotension	Ephedrine (3 × 15–45 mg) (evidence level 3, recommendation grade 0) Midodrine (3 × 5–10 mg) (evidence level 1+, recommendation grade A) Fludrocortisone (1–3 × 0,1 mg) (evidence level 3, recommendation grade 0) L-threo-DOPS (100, 200 and 300 mg, twice daily) (evidence level 1, recommendation grade B)														
Postprandial hypotension	Octreotide (25–50 mg s.c. 30 min before meals) (evidence level 2–, recommendation grade 0)														
Urge incontinence	Oxybutinin (2–3 × 2.5–5 mg) (evidence level 4, recommendation grade 0)														
Incomplete bladder emptying	Self-catheterization or suprapubic catheter														
Constipation	Macrogol 3350 (evidence level 4, recommendation grade 0)														
Nocturnal polyuria	Desmopressin (10–40 µg spray, 100–400 µg tablets) (evidence level 3, recommendation grade 0)														
Erectile dysfunction	Sildenafil (50 mg p.o.) (evidence level 1, recommendation grade 0) <u>Cave: Orthostatic dysfunction</u>														
Inspiratory stridor	Ventilation by continuous positive airway pressure (CPAP)														
Depression	Selective serotonin reuptake inhibitors (evidence level 1, recommendation grade 0)														

Evidence level 1 = randomized controlled study (studies); 2 = case-control study (studies); 3 = non-analytic case study (studies); 4 = expert opinion; recommendation grade A = strongly recommended [should]; B = recommended; 0 = no recommendation [can]

Tableau 3 : Les traitements symptomatiques dans l'AMS

D'après *Maaß et al. Curr Treat Options Neurol 2016*

Tableau 4 : Essais cliniques dans l'AMS
 D'après Stefanova et al. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2016

Therapy	Target(s)	α -Synuclein MSA model	Efficacy in α -Synuclein MSA model(s)	Clinical trial
Recombinant human growth hormone	Neuronal and glial proliferation	n.a.	n.a.	Design: Randomized, double-blind, placebo-controlled; Primary end-point: UPDRS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale)-total, autonomic testing; Result: Ineffective [107]
Minocycline	Microglial activation	PLP- α -synuclein [57]	Suppression of microglial activation, neuroprotection in early disease stage	Design: Randomized, double-blind, placebo-controlled; phase III study Primary end-point: Change of UMSARS (Unified Multiple System Atrophy Rating Scale)-II Result: Suppression of microglial activation, but no change of symptom severity [108]
Riluzole	Cell death	n.a.	n.a.	Design: Randomized, double-blind, placebo-controlled; phase III study Primary end-point: survival Result: No effect on survival and motor decline [109]
Autologous MSCs (intravenous and intraarterial)	Unclear	PLP- α -synuclein [110]	Modulation of neuroinflammatory responses; mild nigral neuroprotection	Design: Randomized, double-blind, placebo-controlled; phase II study Primary end-point: Change of UMSARS-total Result: Slowed disease progression [111], safety concerns
Lithium	α -synuclein	n.a.	n.a.	Design: Randomized, double-blind, placebo-controlled; phase II study Primary end-point: frequency of severe AE Result: Discontinued due to safety concerns [112]
Rifampicin	α -synuclein	MBP- α -synuclein [113]	Reduced α -synuclein load, reduced astrogliosis, neuroprotection	Design: Randomized, double-blind, placebo-controlled; phase III study
Rasagiline	Cell death	PLP- α -synuclein + 3NP [115]	Neuroprotection and functional improvement in early disease stage	Design: Randomized, double-blind, placebo-controlled; phase II study Primary end-point: Change of UMSARS-total Result: No change in outcome measures [116]
Fluoxetine	Neuroinflammation, Oligodendroglial dysfunction	MBP- α -synuclein [117]	Modulation of trophic factor support, improved neurogenesis, reduced astrogliosis, ameliorated demyelination, reduced α -synuclein aggregation, neuroprotection and functional improvement	Design: Randomized, double-blind, placebo-controlled; phase II study Primary end-point: Change of UMSARS-II Result: pending
MPO inhibitor (AZD3241)	Microglial activation	PLP- α -synuclein + 3NP [58,118]	Suppression of microglial activation, reduced α -synuclein aggregation, neuroprotection and functional improvement in early disease stage Suppression of microglial activation but no neuroprotection nor functional improvement in advanced disease	Design: Randomized, double-blind, parallel group; phase II study Primary end-point: safety, tolerability and effect on microglia activation via PET imaging Result: Ongoing
Active immunization (AFFITOPE PD01A; PD03A)	α -synuclein	MBP- α -synuclein [119]	Reduced α -synuclein load, reduced demyelination, neuroprotection, functional improvement	Design: A randomized, placebo-controlled, parallel group, patient-blind, phase I study; Primary end-point: Safety and immunological/therapeutic activity Result: Ongoing
Autologous MSCs (intrathecal)	Unclear	PLP- α -synuclein [110]	Modulation of neuroinflammatory responses; mild nigral neuroprotection	Design: Open label; Single group assignment, phase I study Primary end-point: Safety/Efficacy Result: Ongoing

1.6 Modélisation animale de l'atrophie multisystématisée

Les premiers modèles animaux tentant de reproduire certaines caractéristiques de l'AMS se sont focalisés sur la neurodégénérescence des régions atteintes. Ces modèles consistent en l'injection de toxines dans le striatum et la substance noire ou en intrapéritonéal comme la 6-Hydroxydopamine (entraînant la mort des neurones dopaminergiques de manière spécifique), l'acide quinoléique (agoniste des récepteurs NMDA entraînant des effets délétères), l'acide 3-nitropropionique (bloquant la chaîne de respiration mitochondriale) et le 1-méthyl-4-phényl pyridinium (bloque la chaîne de respiration mitochondriale, réduit les niveaux de dopamine). L'intérêt de ces modèles est la neurodégénérescence importante provoquée qui est utile pour analyser et traiter les symptômes moteurs causés, mais contrairement aux modèles transgéniques ils ne modélisent pas les lésions retrouvées dans l'AMS. Ces derniers surexpriment l' α -syn humaine sous le contrôle de promoteurs oligodendrogliaux tels que ceux des gènes MBP, PLP ou CNP. Cela entraîne l'agrégation de la protéine dans les oligodendrocytes et pour les modèles MBP et PLP induit la mort neuronale (**Tableau 5**, d'après (**Fernagut and Tison, 2012**)). Ces modèles sont utiles pour étudier la cascade d'événements pathologiques putative impliquée dans la dégénérescence.

	Nigral cell loss	Striatal cell loss	Behaviour
Stereotaxic rat models			
6-OHDA followed by QA	>90%	56%	Bilateral paw reaching deficit
QA followed by 6-OHDA	>90%	85%	Bilateral paw reaching deficit
QA+6-OHDA	15%	27%	Abolition of drug-induced rotations Bilateral paw reaching deficit
3-NP	45%	76%	Bilateral paw reaching deficit
MPP+	48%	47%	Abolition of drug-induced rotations Bilateral stepping deficits
Systemic models			
Non-human primate			
MPTP followed by 3-NP	70–90%	35–45%	Levodopa unresponsive parkinsonism, transient hind limb dystonia
Mouse			
MPTP followed by 3-NP	44%	43%	↓ locomotor activity
3-NP followed by MPTP	26%	54%	
MPTP+3-NP	26%	36%	↓ locomotor activity, ↓ rotarod, ↓ pole test
T transgenic mouse models (oligodendroglial expression of human wild-type alpha-synuclein)			
PLP promoter	23%	—	↓ hindlimb stride length
MBP promoter	≈40%	≈40%	↓ rotarod and pole test
CNP promoter	—	—	↓ rotarod
Dual-hit mouse models			
PLP+3-NP	≈50%	≈50%	↓ locomotor activity, pole test
MBP+3-NP	>70%	60%	↓ pole test

Tableau 5 : Modèles animaux présentant certaines des caractéristiques de l'AMS

D'après *Fernagut et al. Neuroscience 2012*

Chacun de ces modèles présente des avantages et des inconvénients et il est nécessaire d'en développer de nouveaux de manière à étudier les différents aspects pathologiques de l'AMS.

On peut voir que la seule surexpression de l' α -syn est capable d'induire la mort neuronale dans certains modèles transgéniques et de nombreuses données tendent à indiquer que cette surexpression et l'agrégation de l' α -syn auraient des propriétés délétères sur la physiologie cellulaire.

2 L' α -Synucléine

2.1 Rôle physiologique

En 1993, une protéine est découverte chez l'homme dans les plaques amyloïdes de la maladie d'Alzheimer (**Ueda et al., 1993**) et est identifiée comme homologue de l' α -syn connue chez le rat et la raie électrique (Torpedo) l'année suivante (**Jakes et al., 1994**). Son gène *SNCA* est localisé sur le chromosome 4q21 (**Spillantini et al., 1995**). Elle est exprimée de manière prédominante dans le SNC, notamment dans le néocortex, l'hippocampe, la SN, le thalamus et le cervelet. Sa localisation cellulaire est majoritairement pré-synaptique bien qu'on en retrouve dans le noyau et le cytosol. C'est une petite protéine acide de 140 acides aminés composée de trois domaines que sont : l' α -hélice N-terminale ayant une affinité pour les lipides (1-60), le domaine central ayant une affinité pour les amyloïdes (61-95) et la queue C-terminale acide (96-140) (**Emamzadeh, 2016**). Elle peut soit adopter une conformation α -hélicoïdale lorsqu'elle est associée avec des phospholipides, soit une conformation non repliée dans le cytosol (**Ahn et al., 2002**) et a une affinité d'interaction avec les lipides et membranes contenant des acides gras insaturés, ayant des petits groupes anioniques et une forte courbure (**Wang et al., 2010**).

Les rôles de l' α -syn restent encore largement énigmatiques, mais de par sa localisation présynaptique préférentielle ainsi que son interaction avec les membranes, la recherche s'est rapidement intéressée à son implication possible dans les mécanismes relatifs au trafic des vésicules synaptiques. Elle interagit avec de nombreuses protéines synaptiques dont Rab3 (impliquée dans la régulation de l'exocytose de neurotransmetteurs et hormones) (**Chen et al., 2013**), la synaptobrevine-2 (qui fait partie de la famille des protéines SNARE, qui ont un rôle important dans les processus de fusion et trafic membranaire) (**Burre et al., 2010**), la synapsine-

3 (qui est associée à la surface des vésicules synaptiques et module la libération des neurotransmetteurs) (**Zaltieri et al., 2015**), divers transporteurs de neurotransmetteurs tels que VMAT2 (transporteur de monoamines dont la dopamine, la noradrénaline et la sérotonine) (**Guo et al., 2008**) et les transporteur de dopamine et de sérotonine (**Swant et al., 2011, Butler et al., 2015, Wersinger et al., 2006**). Elle a la capacité d'induire la courbure (**Varkey et al., 2010**) et moduler la composition membranaire (**Madine et al., 2006**). Cela laisse supposer que l' α -syn aurait un rôle dans la scission des membranes lipidiques et dans la biogénèse membranaire. L' α -syn promeut la formation du complexe SNARE via son activité chaperonne et un triple knockout des formes $\alpha/\beta/\gamma$ -synucléine entraîne une mort prématurée chez la souris (**Burre et al., 2010**) ainsi qu'une modification de la concentration des protéines synaptiques, de la taille et la structure de la synapse (**Burre, 2015**). Elle est associée aux vésicules du pool de réserve synaptiques, et elle aurait un rôle dans l'arrimage membranaire et la recapture des neurotransmetteurs de ces vésicules en cas de stimulation prolongée (**Figure 13**, d'après (**Lashuel et al., 2013**)). Les knockout individuels des trois membres de la famille des synucléines ne sont pas létaux, ce qui semble indiquer que les synucléines ne sont pas essentielles à la machinerie de neurotransmission mais pourraient contribuer à la maintenance sur le long terme de la fonction synaptique (**Chandra et al., 2004**). L'effet de l' α -syn sur la libération des neurotransmetteurs est controversé car certaines études ont montré un effet potentiateur de la transmission synaptique, d'autres un effet inhibiteur ou encore aucun effet apparent (**Burre, 2015**). De par son affinité avec les transporteurs des catécholamines, il est possible que l' α -syn ait un rôle dans la modulation de leur libération et peut être de leur biogénèse également, ceci étant appuyé par le fait qu'elle inhibe l'expression et l'activité de la tyrosine hydroxylase (TH) impliquée dans la synthèse de la dopamine (**Baptista et al., 2003, Perez et al., 2002**). La déplétion de l' α -syn in-vitro augmente l'autophagie, ce qui suggère qu'elle aurait un rôle régulateur de ce mécanisme (**Winslow and Rubinsztein, 2011**).

Comme dit précédemment, l'expression de l' α -syn dans les oligodendrocytes est soumise à débat ; il semble qu'elle soit très faible voire nulle pour les oligodendrocytes matures, mais plus importante dans les progéniteurs oligodendrogliaux (**Djelloul et al., 2015**) impliquant qu'elle pourrait avoir un rôle dans le développement oligodendrogliol.

Si l'absence d' α -syn n'a qu'un faible impact pathologique dans la majorité des modèles animaux, il en va autrement de sa surexpression et de son agrégation (**Burre, 2015**).

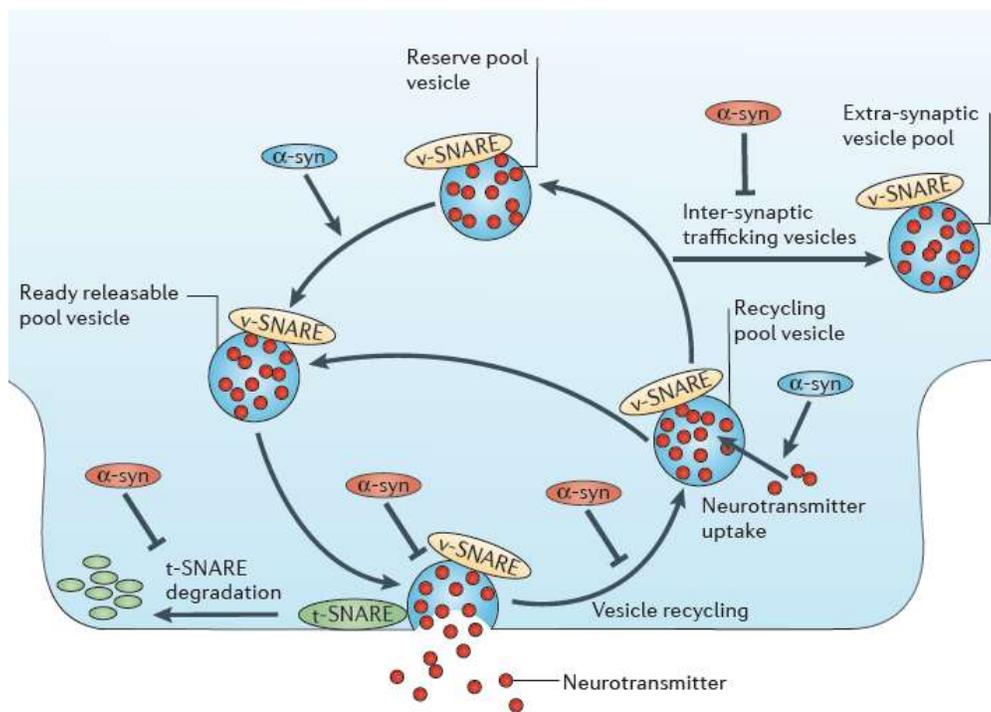


Figure 13 : Interactions de l' α -syn avec les mécanismes de libération et de trafic des neurotransmetteurs à la synapse

D'après Lashuelet al. Nat Rev Neurosci 2013

2.2 Rôle pathologique

L' α -syn existe sous différentes conformations, les isoformes monomériques cytosoliques et membranaires peuvent subir des changements structuraux drastiques entraînant la formation d'assemblages oligomériques riches en feuillets β (Dehay et al., 2015). La région centrale de l' α -syn (résidus 61-95) est impliquée dans la formation des feuillets β (Emamzadeh, 2016) et possède un motif extrêmement hydrophobe (Lashuel et al., 2013). Les études in-vitro montrent que la conformation de l' α -syn est dépendante d'un équilibre dynamique où les monomères peuvent s'agréger tout d'abord en plusieurs petites espèces oligomériques stabilisées par les interactions des feuillets β , puis en protofibrilles insolubles de plus haut poids moléculaire pour enfin polymériser en fibrilles amyloïdes (Figure 14, d'après (Dehay et al., 2015)).

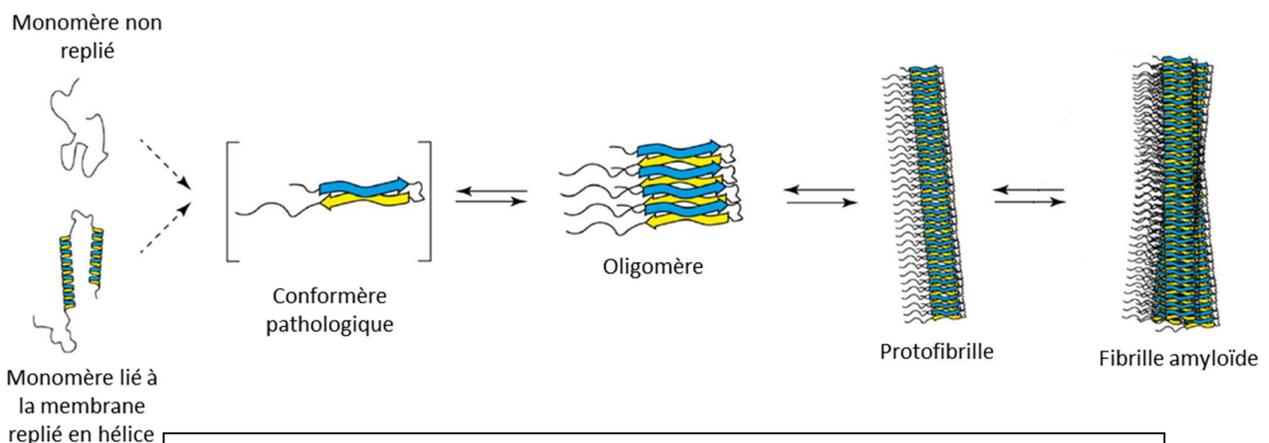


Figure 14 : Etapes théoriques de la formation des formes agrégées de l' α -syn

D'après Dehay al. Lancet Neurol 2015

Il est difficile de déterminer quelles formes oligomériques de l' α -syn sont les plus toxiques et lesquelles sont responsables des divers phénomènes pathologiques décrits plus bas, mais certaines études suggèrent une toxicité plus prononcée des petites espèces oligomériques (**Cremades et al., 2012, Ingelsson, 2016, Winner et al., 2011**), et le rôle pathologique ou protecteur des formes agrégées comme les LB et le ICG reste débattu (**Tanaka et al., 2004**).

L' α -syn retrouvée dans les agrégats présente diverses modifications post-traductionnelles dans les synucléinopathies telles que des hyperphosphorylations (au niveau de la Ser129 par exemple), des oxydations et des troncations qui pourraient potentialiser la formation d'espèces oligomériques toxiques (**Lashuel et al., 2013, Fujiwara et al., 2002, Fujishiro et al., 2008**).

La neurodégénérescence peut être induite dans divers modèles animaux surexprimant l' α -syn humaine que ce soit au niveau des neurones dopaminergiques avec des modèles viraux (**Van der Perren et al., 2015**), ou au niveau des oligodendrocytes avec des modèles transgéniques (voir modélisation animale de l'AMS). Les agrégats d' α -syn peuvent directement causer la dysfonction neuronale et l'apoptose (**Volpicelli-Daley et al., 2011, Desplats et al., 2009, Lee et al., 2005**) ; des études in-vitro et in-vivo ont montrées que la surexpression d' α -syn oligodendrogliale pouvait avoir un rôle dans l'activation de diverses voies apoptotiques (**Kawamoto et al., 2008, Kragh et al., 2013**), et entraînerait une diminution de l'expression de facteurs neurotrophiques (**Ubhi et al., 2010**). Cette surexpression induirait également un ralentissement de la maturation des oligodendrocytes, une diminution de la quantité des constituants de la myéline comme CNPase et MBP et des altérations morphologiques (**Ettle et al., 2014**), ce qui pourrait expliquer le plus grand nombre de progéniteur oligodendrogliaux retrouvés dans le striatum de patients AMS (**May et al., 2014**). L' α -syn cytosolique ne polymérise qu'en présence de fractions membranaires et cette polymérisation protofibrillaire crée des lésions membranaires in-vitro responsables de libération non physiologique de neurotransmetteurs depuis les vésicules synaptiques. Elle est également responsable de l'induction de l'apoptose via la dépolarisation de la membrane mitochondriale (**Emamzadeh, 2016**) et augmente par ailleurs la perméabilité des lysosomes (**Dehay et al., 2015**) ; or on retrouve une fraction importante d' α -syn agrégée au niveau des membranes cellulaires dans l'AMS (**Tong et al., 2010**). Les formes oligomériques sont capables d'inhiber l'arrimage des vésicules synaptiques à la membrane contrairement à la forme monomérique (**Dehay et al., 2015**).

L' α -syn inhibe la macroautophagie in-vitro et in-vivo lorsqu'elle est surexprimée à un stade précoce de la formation des autophagosomes **(Winslow et al., 2010)**, de plus les formes agrégées similaires aux LBs résistent à la dégradation et altèrent également la macroautophagie in-vitro **(Tanik et al., 2013)**. Les formes oligomériques sont également capables de perturber l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes **(Lashuel et al., 2013)**.

L' α -syn peut induire de nombreuses réponses inflammatoires in-vitro et in-vivo **(Fellner et al., 2011)**. La mise en contact de cellules microgliales avec l' α -syn entraîne la libération de molécules pro-inflammatoires de manière dose dépendante **(Klegeris et al., 2008, Su et al., 2008)**. Les formes agrégées et nitratées d' α -syn induisent une réponse inflammatoire et la mort neuronale dans les co-cultures de neurones-microglies mésencéphaliques **(Zhang et al., 2005, Reynolds et al., 2008)**. La neurotoxicité de l' α -syn sur les co-cultures neuronales dopaminergiques est associée à la production d'espèces réactives à l'oxygène par les microglies indiquant une implication du stress oxydant **(Zhang et al., 2005)**. L' α -syn monomérique augmente la phagocytose microgliale d'une manière dose dépendante, tandis qu'elle l'inhibe sous sa forme agrégée **(Park et al., 2008)**. En dehors des expériences sur les cultures cellulaires, les données in-vivo renforcent l'idée d'un effet pro-inflammatoire de l' α -syn. Sa surexpression seule engendre une activation microgliale et une stimulation du système immunitaire adaptatif dans un modèle animal viral de la MP **(Theodore et al., 2008)**. Le modèle PLP-syn développe une microgliose chronique région spécifique qui est corrélée à la perte neuronale progressive de la SNc **(Stefanova et al., 2007)**.

En plus de ses effets délétères, il semble que l' α -syn ayant une conformation pathologique ait la capacité de se propager depuis différents types cellulaires **(Valera and Masliah, 2018)**. Ainsi in-vitro les agrégats d' α -syn peuvent se transmettre de neurones à neurones **(Lee et al., 2012, Desplats et al., 2009)**, de neurones aux cellules astrogliales et oligodendrogliales **(Reyes et al., 2014, Lee et al., 2010)**, et des oligodendrocytes aux astrocytes **(Valera et al., 2014)**, causant la dysfonction neuronale, l'apoptose et la neuroinflammation **(Klucken et al., 2012, Valera et al., 2014, Lee et al., 2010, Volpicelli-Daley et al., 2011)**. L'apparition de LB a pu être observée chez les patients atteints de MP qui ont reçus des greffes neuronales **(Li et al., 2008, Kordower et al., 2008)**, mais il convient de rester prudent sur les conclusions à tirer de ces rares cas ainsi que des différentes expériences, car si la présence d'agrégats a pu être causée par la propagation de l' α -syn, il est également possible que l'environnement pathologique ait induit l'agrégation directement au niveau de ces neurones **(Dehay et al., 2015, Walsh and Selkoe, 2016)**.

La découverte des nombreux aspects pathologiques de la surexpression et l'agrégation de l' α -syn pousse la recherche à s'intéresser de plus en plus à l'exploration de nouvelles stratégies empêchant cette agrégation (Figure 15, d'après (Lashuel et al., 2013)).

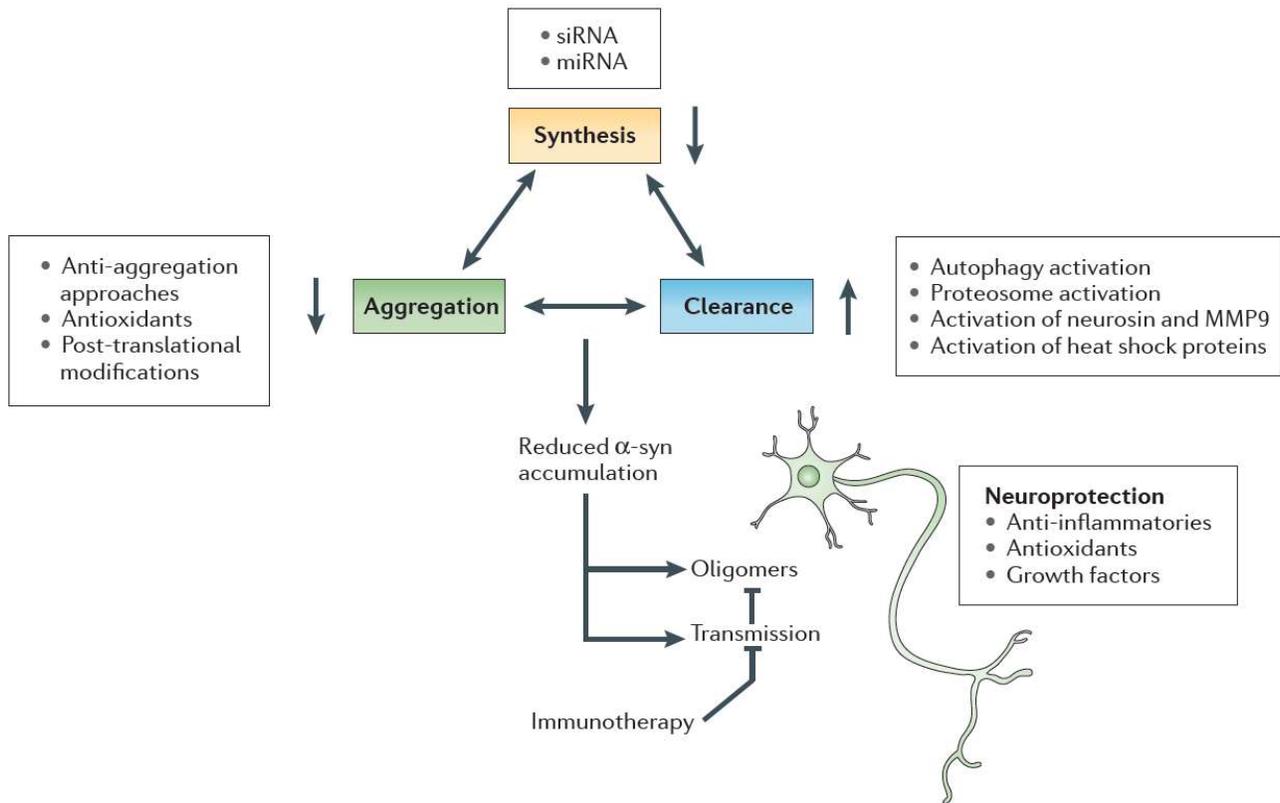


Figure 15 : Stratégies visant à diminuer l'agrégation d' α -syn

D'après Lashuelet al. *Nat Rev Neurosci* 2013

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Le manque de traitements modifiant la progression de la maladie engendre un besoin urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans l'AMS et pour explorer ces stratégies thérapeutiques en phase pré-clinique, des modèles animaux reproduisant au mieux différents aspects de la maladie sont nécessaires. De par l'aspect foudroyant de l'AMS, il existe également une nécessité de découvrir des marqueurs biologiques pour aider au diagnostic et pronostic, ainsi qu'à l'évaluation de l'efficacité dans des essais thérapeutiques à venir.

Ma thèse est une approche multifactorielle dont les objectifs ont été, en premier lieu, de développer de nouveaux modèles animaux reproduisant certains aspects de la maladie par une approche virale jusqu'ici peu développée dans le cadre de l'AMS, explorer dans un second temps des voies thérapeutiques en ciblant l'agrégation de l' α -syn et la résistance à l'insuline, et enfin d'analyser des biomarqueurs d'intérêts sur des échantillons de patients AMS.

Nous avons donc utilisé une approche de surexpression via un vecteur comprenant le gène de l' α -syn humaine sous le contrôle d'un promoteur oligodendroglial chez le rat et le singe. Cette construction intégrée à un adénovirus a été injecté au niveau du striatum de ces deux modèles animaux. Nous avons suivi chez le modèle de rat l'effet de cette surexpression sur le comportement moteur 3 et 6 mois après l'injection, la spécificité de l'expression oligodendrogliale, la neurodégénérescence ainsi que l'agrégation pathologique de l' α -syn. Pour le modèle primate nous avons déterminé la spécificité de l'expression de l' α -syn oligodendrogliale.

Dans un second temps nous avons étudié l'effet de trois stratégies thérapeutiques ciblant divers phénomènes pathologiques retrouvés dans l'AMS sur le modèle de souris transgénique PLP-synucléine (PLP-syn) :

°Le but du premier projet est de déterminer si la levée de l'inhibition du complexe mammalian target of rapamycin (mTOR) sur l'autophagie peut induire une amélioration des phénomènes pathologiques retrouvés chez la souris PLP-syn (neurodégénérescence et agrégation). Nous avons pour cela administré la rapamycine (inhibiteur de mTOR) dans la nourriture de ce modèle transgénique sur une période de 4 mois. Nous avons également voulu confirmer l'inhibition de l'autophagie sur des échantillons de tissus cérébraux de patients AMS.

°Le second projet consiste à tester l'effet de l'injection intrapéritonéale du nilotinib, un traitement indiqué dans les cas de leucémies myéloïdes chroniques mais qui a aussi montré des effets sur l'agrégation de l' α -syn et la diminution de la mort neuronale chez des modèles murins de la MP, sur le modèle PLP-syn et de déterminer si sa cible, la kinase cABL, présente des modifications au niveau du tissu cérébral des patients AMS.

°La dernière stratégie thérapeutique consiste à agir sur la résistance à l'insuline, retrouvée chez le modèle PLP-syn, par une approche d'injection virale au niveau du striatum. L'adénovirus utilisé porte une construction exprimant un micro ARN inhibant la traduction de la kinase GRK2 (miARN GRK2) connue pour son effet métabolique et son implication dans la résistance à l'insuline dans le cadre du diabète. De la même manière, nous avons analysé les effets de cette inhibition sur les différents aspects pathologiques du modèle PLP-syn et également exploré la résistance à l'insuline sur du tissu cérébral de patients AMS.

Le troisième projet de ma thèse a pu être réalisé grâce à une bourse IDEX de l'université de Bordeaux qui m'a permis de travailler en collaboration avec le service neuropathologie de l'université de Göttingen en Allemagne et de déterminer grâce à la technologie SIMOA s'il y avait des différences de concentration de plusieurs biomarqueurs dans le sérum et dans le liquide céphalo-rachidien de patients AMS et à corrélérer ces différences avec les données cliniques.

Au cours de ma thèse, j'ai pu travailler sur les diverses étapes de la recherche à visée thérapeutique, de la modélisation animale à la phase pré-clinique, puis à l'évaluation de fluides biologiques de patients AMS dans le but de développer des biomarqueurs pour le pronostic et l'évaluation de l'efficacité dans des essais thérapeutiques à venir.

RÉSULTATS



La surexpression de l' α -synucléine oligodendrogliale médiée par un vecteur viral modélise certains aspects de l'atrophie multistématisée

Fares Bassil, PhD,^{1,2†} Paul A. Guerin, MS,^{1,2†} Nathalie Dutheil, PhD,^{1,2} Qin Li, PhD,^{3,4} Matthias Klugmann, PhD,⁵ Wassilios G. Meissner, MD, PhD ,^{1,2,6,7} Erwan Bezard, PhD,^{1,2,3,4†} and Pierre-Olivier Fernagut, PhD^{1,2†*}

†,*: Contribution équivalente.

Contexte : Dans l'AMS, certains modèles de souris transgéniques surexprimant l' α -syn humaine au niveau des oligodendrocytes montrent une agrégation pathologique de l' α -syn ainsi qu'une neurodégénérescence modérée. Ces modèles sont utiles pour explorer les phénomènes cellulaires pathologiques putativement impliqués dans l'AMS mais ne présentent pas une dysfonction motrice et une neurodégénérescence importante comme celles retrouvées chez les modèles basés sur l'inoculation de toxines neuronales.

Les virus adéno-associés permettent une transduction performante des constructions génétiques qu'ils transportent et ont été utilisés dans le cadre de la MP pour générer de nouveaux modèles rongeurs récapitulants certains aspects clés de la maladie, notamment une forte neurodégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc au cours du temps et une agrégation de la protéine α -syn. Cette approche virale a également été utilisée chez des modèles de primate non humains et a pu recréer une agrégation pathologique ainsi qu'une neurodégénérescence des neurones dopaminergiques.

Dans le but de générer un modèle de rat AMS présentant les mêmes caractéristiques de dégénérescence forte et d'agrégation pathologique que les modèles viraux de la MP, nous avons injecté un adénovirus à vecteur AAV1/2 recombinant portant le promoteur oligodendroglial MBP contrôlant l'expression de l' α -syn humaine au niveau du striatum de rats Sprague-Dawley adultes. En parallèle, nous avons injecté ce même virus au niveau du putamen d'un modèle de primate non humain *Macaca fascicularis*.

Nous avons pu montrer chez le modèle de rat une dysfonction motrice ainsi qu'une neurodégénérescence progressive des neurones de la SNc et du striatum accompagné de

l'accumulation d' α -syn agrégée insoluble et phosphorylée. Chez le modèle primate le virus s'est propagé dans une partie du putamen mais présente une spécificité oligodendrogliale plus faible que le modèle murin.

Viral-Mediated Oligodendroglial Alpha-Synuclein Expression Models Multiple System Atrophy

Fares Bassil, PhD,^{1,2†} Paul A. Guerin, MS,^{1,2†} Nathalie Duthéil, PhD,^{1,2} Qin Li, PhD,^{3,4} Matthias Klugmann, PhD,⁵ Wassilios G. Meissner, MD, PhD ^{1,2,6,7} Erwan Bezard, PhD,^{1,2,3,4†} and Pierre-Olivier Fernagut, PhD^{1,2,*}

¹Université de Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, Bordeaux, France

²CNRS, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, Bordeaux, France

³China Academy of Medical Sciences, Institute of Lab Animal Sciences, Beijing, China

⁴Motac neuroscience Ltd, Manchester, United Kingdom

⁵Translational Neuroscience Facility and Department of Physiology, School of Medical Sciences, UNSW Australia, Sydney, NSW, Australia

⁶Service de Neurologie, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France

⁷Centre de référence atrophie multisystématisée, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France

ABSTRACT: Background: MSA is a fatal neurodegenerative disorder characterized by a combination of autonomic dysfunction, cerebellar ataxia, and L-dopa unresponsive parkinsonism. The hallmark of MSA is the accumulation of α -synuclein, forming cytoplasmic inclusions in oligodendrocytes. Adeno-associated viruses allow efficient targeting of disease-associated genes in selected cellular ensembles and have proven efficient for the neuronal overexpression of α -synuclein in the substantia nigra in the context of PD.

Objectives: We aimed to develop viral-based models of MSA.

Methods: Chimeric viral vectors expressing either human wild-type α -synuclein or green fluorescent protein under the control of mouse myelin basic protein were injected in the striatum of rats and monkeys. Rats underwent a longitudinal motor assessment before histopathological analysis at 3 and 6 months.

Results: Injection of vectors expressing α -synuclein in the striatum resulted in >80% oligodendroglial

selectivity in rats and >60% in monkeys. Rats developed progressive motor deficits that were L-dopa unresponsive when assessed at 6 months. Significant loss of dopaminergic neurons occurred at 3 months, further progressing at 6 months, together with a loss of striatal neurons. Prominent α -synuclein accumulation, including phosphorylated and proteinase-K-resistant α -synuclein, was detected in the striatum and substantia nigra.

Conclusions: Viral-mediated oligodendroglial expression of α -synuclein allows replicating some of the key features of MSA. This flexible strategy can be used to investigate, in several species, how α -synuclein accumulation in selected oligodendroglial populations contributes to the pathophysiology of MSA and offers a new framework for preclinical validation of therapeutic strategies. © 2017 International Parkinson and Movement Disorder Society

Key Words: multiple system atrophy; oligodendrocytes; alpha-synuclein; rat; animal model

*Correspondence to: Dr. Pierre-Olivier Fernagut, CNRS UMR 5293, Institute of Neurodegenerative Diseases, Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France.; E-mail: pierre-olivier.fernagut@u-bordeaux.fr

F.B. and P.A.G. should be considered as first authors.

E.B. and P.O.F. should be considered as senior authors.

Funding agencies: This work was supported by grant LABEX BRAIN (ANR-10-LABX-43).

Relevant conflicts of interest/financial disclosures: Nothing to report. Full financial disclosures and author roles may be found in the online version of this article.

Received: 10 November 2016; **Revised:** 21 March 2017; **Accepted:** 7 April 2017

Published online 00 Month 2017 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/mds.27041

MSA is a sporadic adult-onset neurodegenerative disorder leading to severe disability and death after 6 to 9 years from symptom onset.¹ MSA has a prevalence of 2 to 5 in 100,000^{2,3} and is characterized clinically by a variable combination of dysautonomia, parkinsonism, and cerebellar symptoms. Two forms of MSA are recognized based on the predominant motor syndrome: MSA-P (parkinsonian subtype) and MSA-C (cerebellar subtype). Contrary to Parkinson's disease (PD), parkinsonism in MSA is either unresponsive or only transiently responsive to levodopa.¹ There is no treatment option to significantly alleviate symptom severity or to slow down disease progression.⁴

MSA is characterized by neurodegeneration affecting the substantia nigra pars compacta (SN), the striatum (MSA-

P), and the olivopontocerebellar system (MSA-C). In both MSA-P and MSA-C, degeneration also affects the brainstem, including chemosensitive respiratory neurons,⁵ pre-Bötzinger complex,⁶ and serotonergic neurons in the raphe and ventrolateral medulla.⁷ MSA is a “proteinopathy,” as shown by the accumulation of misfolded proteins forming cytoplasmic aggregates. Specifically, MSA is characterized by the presence of argyrophilic oligodendroglial cytoplasmic inclusions (GCIs) containing α -synuclein (α -syn), which are the hallmark of the disease.⁸ While protein aggregates occur mostly in neurons under the form of Lewy bodies in PD and dementia with Lewy bodies, MSA is characterized by the preferential aggregation of α -syn in oligodendrocytes, but neuronal inclusions similar to Lewy bodies are also frequently found.⁹

Currently available animal models of MSA encompass symptomatic toxin-based models in mice, rats, and nonhuman primates (replicating the combined degeneration of the SNc and striatum, but not the oligodendroglial accumulation of α -syn) as well as three transgenic mouse models with constitutive expression of human α -syn ($h\alpha$ -syn) in oligodendrocytes under the control of the proteolipid promoter,¹⁰ 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase,¹¹ and myelin basic protein (MBP)¹² (for review, see a previous work¹³). These models recapitulate the accumulation of insoluble $h\alpha$ -syn, motor impairments, and neurodegeneration, providing evidence that constitutive oligodendroglial $h\alpha$ -syn overexpression can induce secondary neurodegeneration, even if cell loss is quite moderate compared to human disease. Whether de novo expression of $h\alpha$ -syn in oligodendrocytes in an adult brain can induce key features of MSA has not yet been shown.

Viral vectors expressing $h\alpha$ -syn in specific brain structures are currently widely used for modeling of PD in rodents and nonhuman primates and recombinant adeno-associated virus (AAV) vectors have high transduction efficiency and allow recapitulating some of the progressive neuropathological changes observed in idiopathic PD,^{14,15} suggesting that this approach could be worthwhile for MSA. We here assessed the efficacy of recombinant AAV1/2 vectors and the MBP promoter¹⁶ to induce oligodendroglial $h\alpha$ -syn expression following striatal delivery to adult rats and nonhuman primates. We show that this strategy leads to gradual and L-dopa-unresponsive motor deficits, together with the accumulation of insoluble and phosphorylated $h\alpha$ -syn and progressive neurodegeneration in the SNc and striatum.

Materials and Methods

Animals

All experiments were performed in accord with the European Union directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. Rodent

experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Bordeaux (CE50–France) under the license 5012099-A. Male Sprague-Dawley rats ($n = 27$; Charles River Laboratories, Saint-Germain-Nuelles, France) weighting 200 g at the beginning of the experiment were housed 2 per cage in a temperature-controlled room under a 12-hour light/dark cycle with free access to food and water.

Nonhuman primate experiments were performed in an Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care–accredited facility following acceptance of study design by the Institute of Lab Animal Science (Chinese Academy of Science, Beijing, China). Two male macaque monkeys (age, 6 years; weight = 5.9 ± 0.4 kg; *Macaca fascicularis*; Beijing, People's Republic of China) were housed in individual cages allowing visual contacts and interactions with other monkeys in adjacent cages. Food and water were available ad libitum. Animal care was supervised daily by veterinarians skilled in the health care and maintenance of nonhuman primates.

Plasmids

To generate the pAAV-MBPprom- α syn-WPRE construct containing the 1.3-kilobase murine MBP promoter and AAV2 inverted terminal repeats (ITRs), the $h\alpha$ -syn complementary DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using pAAV-SynP- α syn-WPRE (SnaSW) as a template.¹⁷ The resulting PCR fragment was used to replace EGFP in pAAV-MBPprom-EGFP-WPRE.¹ Because long-term accumulation of green fluorescent protein (GFP) may be associated with cellular toxicity in vulnerable cells, we used GFP fused with a peptide degron that allows targeting to the proteasome, thereby avoiding the accumulation of GFP.¹⁸ To generate the pAAV2-MBP-GFPdegron-WPRE construct, the same PCR based strategy was used with pEGFP-CL1 as a template.¹⁸

AAV Vector Production

Chimeric AAV1/2 vectors containing the capsid proteins of AAV1 and AAV2 were produced by polyethylenimine-mediated transfection of low-passage HEK-293T /17 cells (catalog number: CRL-11268; ATCC, Manassas, VA). The AAV expression plasmid was cotransfected with the adeno helper pAd Delta F6 plasmid (catalog number: PL-F-PVADF6; Penn Vector Core, Philadelphia, PA) and both Rep2/Cap2 and Rep2/Cap1 expression plasmids at equal ratios.^{19,20} AAV vectors were purified as previously described.²¹ Titrations were performed at the transcriptome core facility (INSERM U862, Bordeaux, France). The genomic titer (vector genome per mL, vg/mL) was determined by quantitative real-time PCR with primers specific for the AAV2 ITRs (forward 5'-GGAACCCCTAGTGATGGAGTT-3'; reverse 5'-CGG CCTCAGTGAGCGA-3').²² Purity assessment of vector

stocks was estimated by loading 10 μ L of vector stock on 10% sodium dodecyl sulfate acrylamide gels; total proteins were visualized using the Krypton Infrared Protein Stain (Life Technologies, Carlsbad, CA).

AAV Injection

Under sterile conditions, rats were anesthetized with isoflurane and secured in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments, Tujunga, CA). All rats were injected bilaterally in the striatum (anteroposterior [AP]: +0.68; mediolateral [ML]: \pm 3.5; dorsoventral [DV]: -4.7; in millimeters; from bregma and pial surface) with a total of 10 μ L of viral vector containing GFP-degron (2.53×10^{13} vg/mL; $n = 13$) or h α -syn (2.33×10^{13} vg/mL; $n = 14$) as previously described.²³⁻²⁵ Briefly, a Hamilton syringe with a 33-Ga needle was used for AAV delivery (5 μ L per site) at a rate of 0.5 μ L per minute using a Kopf microinjector. The needle was left in place for 5 minutes after injection to minimize the backflow of the viral solution. Under sterile conditions, striatal stereotactic delivery of viral vector in monkeys was conducted under isoflurane anesthesia as previously described.^{23,24} The Horsley-Clarke stereotaxic technique, coupled with ventriculography, was used to determine the position the putamen. A total volume of 50 μ L of viral vector containing h α -syn (2.33×10^{13} vg/mL) was injected unilaterally into each animal (25 μ L per side at two sites: AP, -1 and -2.5; ML, +14; DV, 3; in mm from anterior commissure) with a Hamilton syringe mounted into a microinjector system.

Stepping Test

Forelimb akinesia was assessed using the stepping test.²⁶ Briefly, animals were gently held and conducted over a 90-cm distance to allow forehand followed by backhand steps count. Performances were evaluated over two daily sessions on 4 consecutive days. The average number of forelimb steps was averaged over the last three sessions for each time point.

Adhesive Removal Task

After conducting the last stepping test, 6-month-old rats were isolated in their home cage for sensorimotor integration assessment. Briefly, a small circular piece of adhesive paper (1.2-cm diameter) was applied to the tip of the snout. Latencies to remove the stimulus were recorded.

Tissue Processing

Rats were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (100 mg/kg, intraperitoneally) and transcardially perfused with 0.9% saline followed by 4% paraformaldehyde (PFA). Monkeys were euthanized by sodium pentobarbital overdose (150 mg/kg,

intravenously) and perfused transcardially with 0.9% saline + 1% heparin followed by 4% PFA. Brains were extracted, postfixed overnight in 4% PFA, cryoprotected in 20% sucrose, 0.1 M of phosphate-buffered saline (PBS), frozen on isopentane, and stored at -80 $^{\circ}$ C until sectioning. Then, 40 μ m free-floating coronal sections were collected for histopathological analysis.

Histopathological Analysis and Immunofluorescent Labeling

To assess the presence and solubility of α -syn inclusions in oligodendrocytes, sections were first incubated with and without proteinase-K at 10 μ g/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 10 minutes at room temperature (RT) as previously described.^{27,28} Proteinase-K-treated and non-treated adjacent sections were then processed for α -syn immunohistochemistry using the primary antibody against h α -syn (MJFR-1; 1:6,000; Abcam, Cambridge, MA) as previously described.²⁸

Striatal and nigral sections were incubated overnight with the primary antibody against NeuN (1:500; Millipore, Billerica, MA) or tyrosine hydroxylase (1:10,000; Millipore). For staining revelation, the HRP EnVision polymer system followed by DAB as substrate (Dako, Glostrup, Denmark) was used. Nissl counterstaining was performed with 0.1% cresyl violet.

To assess α -syn phosphorylation, striatal sections from three representative levels (anterior, medial, and posterior) and two representative nigral levels (anterior and medial) were incubated with α -syn serine 129 phosphorylation (1:1,000; Abcam) and revealed as described above.

For double immunofluorescence, free-floating sections were incubated for 30 minutes in Target Retrieval Solution 1 \times concentrate (Dako) at 80 $^{\circ}$ C to unmask antigenic sites. Sections were then transferred for 30 minutes at RT in a blocking solution containing 1:50 bovine serum albumin (BSA) and 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS, then incubated overnight with mouse anti-Olig2 (oligodendrocyte lineage transcription factor 2; 1:1,000; Millipore), anti-GST- π (glutathione S-transferase pi; 1:500; BD Biosciences, San Jose, CA), anti-NeuN (neuron nucleus; 1:500; Millipore), tyrosine hydroxylase (1:4,000; Millipore), or glial fibrillary acidic protein (GFAP)/S100 (1:1,000 [Millipore] and 1:1,000 [Abcam]) all diluted in PBS containing 1:500 BSA and 0.3% Triton X-100. After three washes in PBS, sections were incubated with goat anti-mouse Alexa Fluor 488 coupled (1:400; Abcam) for 30 minutes at RT. Finally, after three washes, sections were incubated with rabbit anti-h α -syn (MJFR-1; 1:6,000; Abcam) or anti-GFP (1:1,000; Invitrogen, Carlsbad, CA), then with goat anti-rabbit Alexa Fluor 568 coupled (1:400; Abcam).

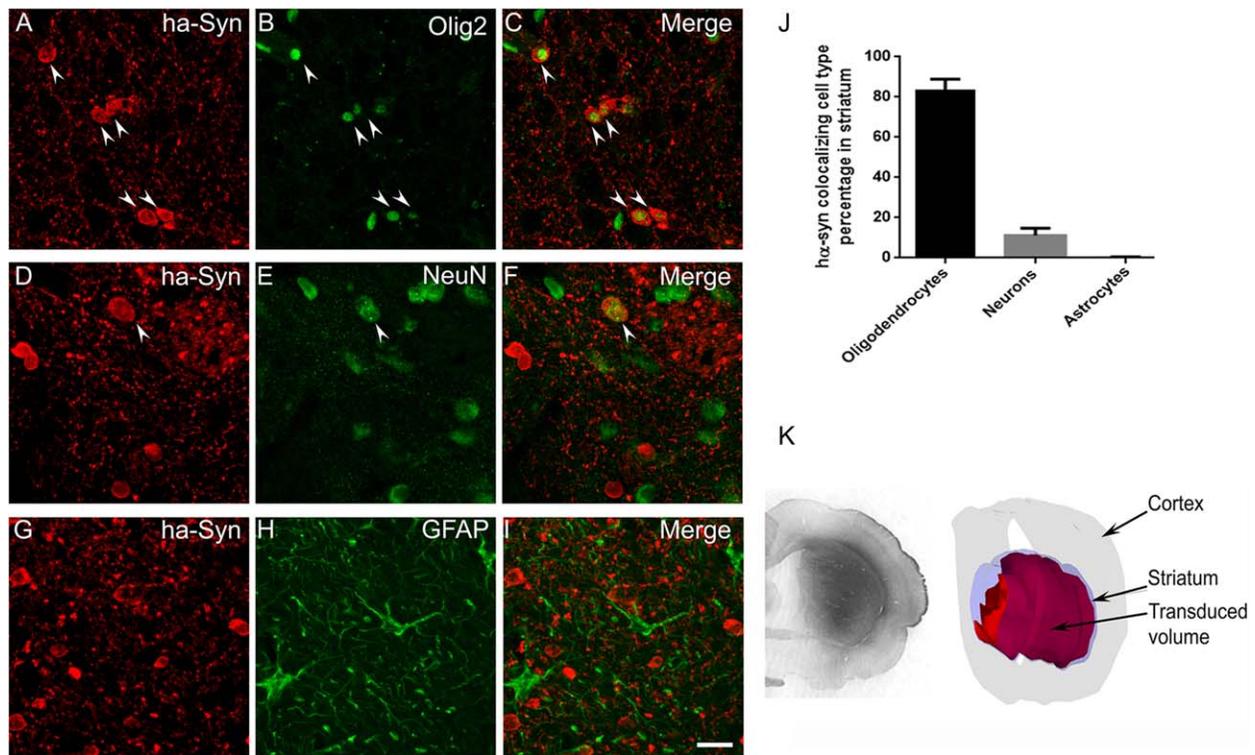


FIG. 1. Oligodendroglial selectivity of MBP-driven α -syn expression in rat. (A–C) α -syn expression in oligodendrocytes. (D–F) α -syn expression in neurons. (G–I) Lack of α -syn expression in astrocytes. (J) Quantification of α -syn expression among the different cell types. (K) Photomicrograph of α -syn immunoreactivity in the striatum and three-dimensional reconstruction of the striatal volume displaying α -syn expression (red) relative to the total volume of the striatum (blue). Scale bar = 20 μ m. ha-Syn, human α -synuclein. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Quantitative Analysis

For striatal NeuN, SNc tyrosine hydroxylase (TH), and Nissl counts, stereological sampling was performed using Mercator Pro V6.5 software (Explora Nova, La Rochelle, France). Following delineation of the striatum and SNc at $5\times$ objective as described previously,^{27,29} counting was performed at $40\times$ objective. Guard zones of 1.5 μ m ensured the exclusion of lost profiles on the top and bottom of the section sampled. Analysis of the number of immunofluorescent cells was performed using Morphostrider (Explora Nova). For colocalization analysis, 12 pictures were taken for each α -syn-injected rat respectively from three striatal sections (anterior, medial, and posterior) and analysis was done using ImageJ software (v1.47; National Institutes of Health, Bethesda, MD). Quantitative analysis was carried out on all images, and results are expressed as a proportion of immunopositive cell type colocalizing with α -syn over total α -syn stained cells.

Statistical Analysis

Data were analysed with two-way analysis of variance with experimental group (α -syn and GFP) and time (3 and 6 months) as between-subject factors. Upon significant main effects, post-hoc analyses were performed using Fisher's least significant difference

test. All data are presented as mean \pm standard error of the mean. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (version 6.02; GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) and R software (multiple spearman correlations; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Oligodendroglial selectivity of MBP-Driven Expression

To assess the cellular pattern MBP-driven expression of α -syn, double immunofluorescence was performed with α -syn coupled either with olig2 (oligodendrocytes), NeuN (neurons), and GFAP (astrocytes; Fig. 1). Consistent with previous findings,¹⁶ counts of double-stained cells revealed that MBP-driven expression of α -syn resulted in preferential expression in oligodendrocytes (83.8%; Fig. 1A–C,J), with minimal neuronal expression (11.2%; Fig. 1D–F,J), whereas almost no expression was detected in astrocytes (0.12%; Fig. 1G–J). Analysis of the extent of striatal α -syn expression revealed that 59.3% of the total striatal volume contained α -syn-positive oligodendrocytes (Fig. 1K).

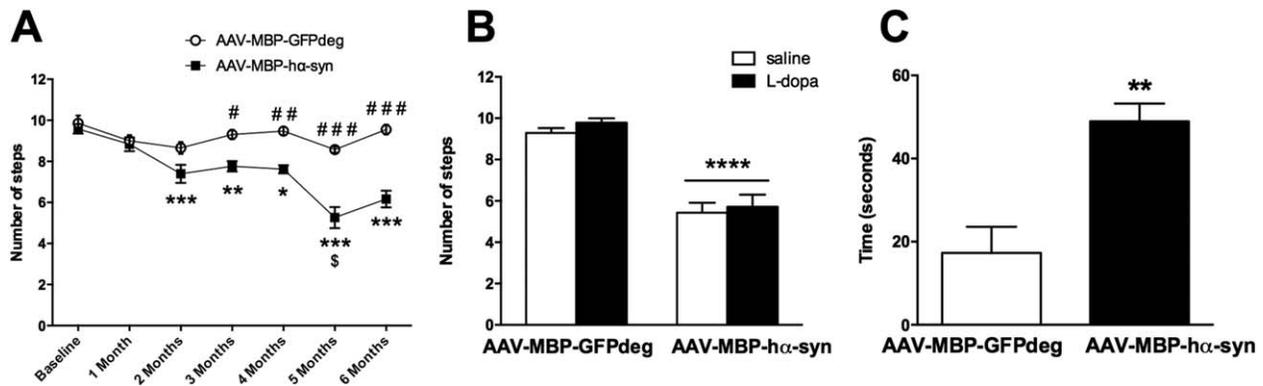


FIG. 2. Effects of oligodendroglial overexpression of α -syn on motor and sensorimotor performances. (A) Longitudinal assessment over 6 months of motor performances, with the stepping test demonstrating significant motor impairments from 2 months onward in AAV-MBP-h α -syn rats (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.0001 vs. baseline performance; # P < 0.05; ## P < 0.01; ### P < 0.0001 AAV-MBP-h α -syn vs. AAV-MBP-GFP; \$ P < 0.01 for AAV-MBP-h α -syn at 2 vs. 5 months). (B) Effect of L-dopa on stepping deficits at 6 months showing no improvement of stepping performances in AAV-MBP-h α -syn (**** P < 0.0001 vs. AAV-MBP-GFP). (C) Sensorimotor impairment in AAV-MBP-h α -syn as shown using the adhesive removal test (** P < 0.01).

Oligodendroglial Overexpression of α -syn Leads to Progressive Motor Deficits and Altered Response to L-dopa

Oligodendroglial expression of α -syn resulted in progressive stepping deficits with a significant effect of α -syn ($F_{(1,136)} = 83.52$; $P < 0.0001$), a significant effect of time ($F_{(6,136)} = 13.34$; $P < 0.0001$), and a significant α -syn \times time interaction ($F_{(6,136)} = 6.71$; $P < 0.0001$; Fig. 2A). Post-hoc analysis revealed significant motor deficits in AAV-MBP-h α -syn compared with their baseline performance from 2 months onward ($P < 0.0001$; Fig. 2A) and motor deficits worsened during follow-up (2 vs. 5 months; $P < 0.01$; Fig. 2A). Evaluation of the effect of L-dopa performed at 6 months revealed that these stepping impairments were not alleviated by L-dopa ($F_{(1,24)} = 0.91$; $P = 0.35$; Fig. 2B). The motor response to a sensory stimulus assessed using the adhesive removal test at 6 months revealed that AAV-MBP-h α -syn rats were significantly slower than AAV-MBP-GFPdeg rats to remove the adhesive ($P < 0.01$; Fig. 2C).

Oligodendroglial Overexpression of α -syn Leads to a Progressive Degeneration of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra

Stereological counts of TH-immunopositive neurons indicated that intrastriatal injection of AAV-MBP-h α -syn induced a loss of nigrostriatal dopaminergic neurons (Fig. 3A), with a significant effect of α -syn ($F_{(1,23)} = 53.93$; $P < 0.0001$), and a trend for an α -syn \times time interaction ($F_{(1,23)} = 3.35$; $P = 0.07$). Post-hoc analysis indicated a significant reduction of the number of TH-immunopositive cells at 3 months (-41.7% ; $P < 0.001$; Fig. 3A) and 6 months (-66.5% ; $P < 0.0001$; Fig. 3A) in AAV-MBP-h α -syn compared with AAV-MBP-GFPdeg rats. The number of TH-immunopositive cells was also further reduced in AAV-MBP-h α -syn at 6 months compared with

3 months ($P < 0.05$; Fig. 3A). Stereological counts of Nissl-stained neurons confirmed that the reduced number of TH-immunopositive cells was attributable to neuronal loss (Fig. 3B) with a significant effect of α -syn ($F_{(1,23)} = 62.35$; $P < 0.0001$) and a trend for an effect of time ($F_{(1,23)} = 2.97$; $P = 0.09$). Post-hoc analysis indicated a significant reduction of the number of Nissl-stained neurons at 3 months (-42.4% ; $P < 0.001$) and 6 months (-63.4% ; $P < 0.0001$) in AAV-MBP-h α -syn rats, as well as a reduction of number of Nissl-stained neurons in AAV-MBP-h α -syn at 6 months compared with 3 months ($P < 0.05$). Total nigral cell counts positively correlated with the number of adjusting steps in the stepping test at 3 and 6 months ($R^2 = 0.62$; $P < 0.05$ and $R^2 = 0.91$; $P < 0.001$).

Oligodendroglial Overexpression of α -syn Leads to a Delayed Degeneration of Striatal Neurons

Stereological counts of NeuN-immunopositive neurons revealed that AAV-MBP-h α -syn induced a loss of striatal neurons with a significant effect of α -syn ($F_{(1,23)} = 8.96$; $P < 0.01$) and a trend for an effect of time ($F_{(1,23)} = 3.88$; $P = 0.06$; Fig. 3). At 3 months postinjection, cell counts were not significantly reduced in AAV-MBP-h α -syn compared with AAV-MBP-GFPdeg rats (-7.8%). At 6 months, post-hoc analysis indicated a significant reduction of the number of NeuN-immunopositive cells in the striatum of AAV-MBP-h α -syn compared with AAV-MBP-GFPdeg rats (-23.1% ; $P < 0.01$) and with AAV-MBP-h α -syn at 3 months ($P < 0.05$; Fig. 3O). There was a positive correlation between striatal and nigral cell counts ($R^2 = 0.54$; $P < 0.01$), indicating that rats with the highest magnitude of nigral loss had the largest striatal degeneration.

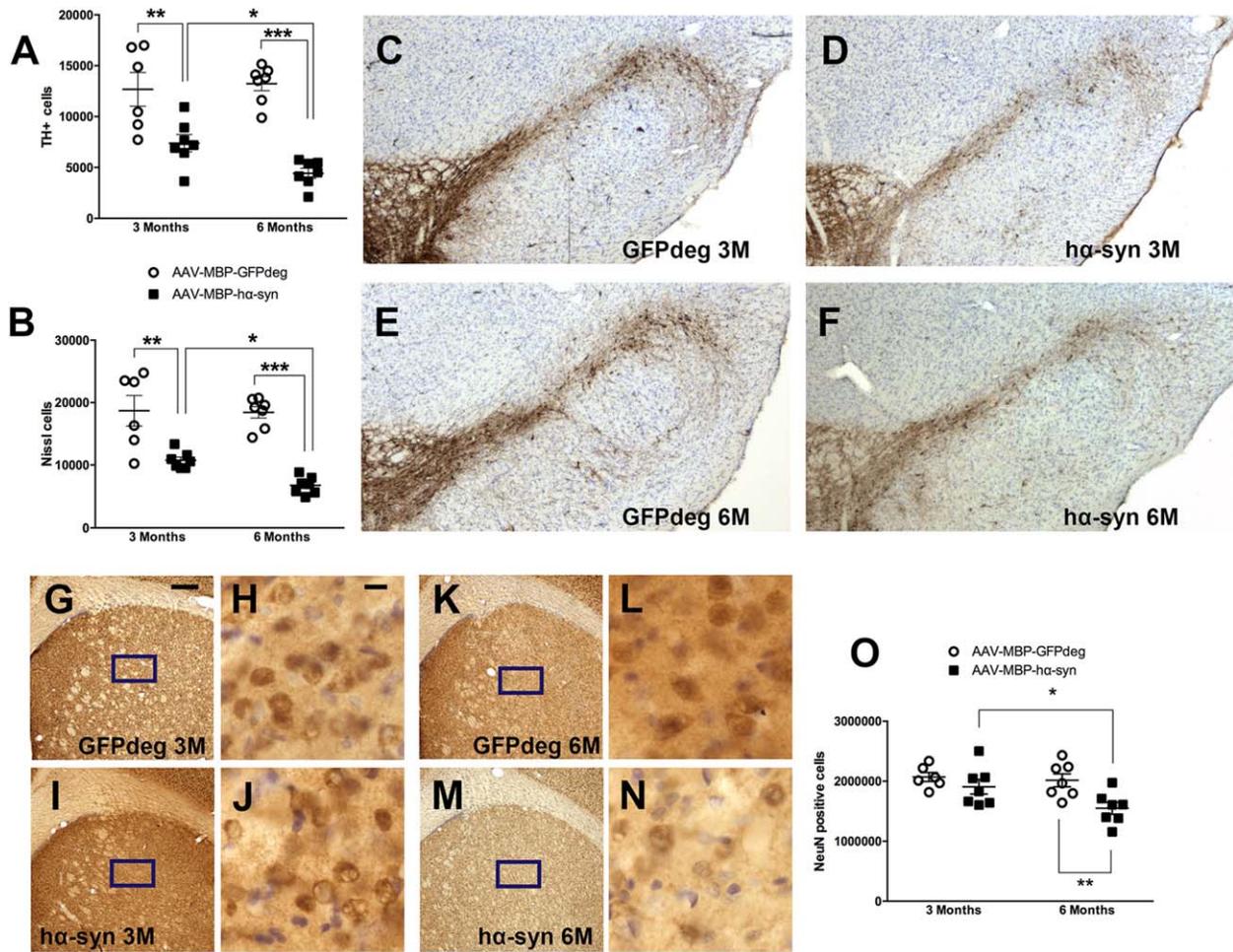


FIG. 3. Effect of oligodendroglial overexpression of α -syn on nigral and striatal neurons. (A) Stereological counts of TH-immunopositive neurons in the SN of AAV-MBP-GFP and AAV-MBP-h α -syn rats. (B) Stereological counts of Nissl-stained neurons in the SN of AAV-MBP-h α -syn and AAV-MBP-GFP rats. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$. (C–F) Representative images of TH immunostaining + Nissl counterstaining 3 (3M) and 6 (6M) months postinjection in the SN of AAV-MBP-GFP (C,E) and AAV-MBP-h α -syn rats (D,F). Scale bar = 400 μ m (C–F). (G–N) Representative images of NeuN immunostaining + Nissl counterstaining in the striatum of AAV-MBP-GFP (G,H,K,L) and AAV-MBP-h α -syn rats (I,J,M,N) at 3 (G–J) and 6 months (K–N). Scale bar = 400 μ m (G,I,K,M) and 10 μ m (H,J,L,N). (O) Stereological counts of NeuN-immunopositive neurons in the striatum of AAV-MBP-GFP and AAV-MBP-h α -syn rats at 3 and 6 months postinjection. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Oligodendroglial Overexpression of α -syn Leads to the Accumulation of Insoluble and Phosphorylated α -syn in the Substantia Nigra and Striatum

Striatal injection of AAV-MBP-h α -syn led to a prominent expression of h α -syn in the striatum, corpus callosum, and SN (Fig. 4). h α -syn oligodendrocytes were also observed in the motor cortex and globus pallidus. Adjacent sections were processed for h α -syn immunohistochemistry after proteinase-K treatment to reveal insoluble h α -syn. In the striatum, although proteinase-K also decreased h α -syn immunoreactivity ($F_{(1,24)} = 49.48$; $P < 0.0001$), the remaining staining was 67.8% at 3 months and 46% at 6 months. h α -syn-immunopositive oligodendrocytes and white matter bundles could still be detected following proteinase-K (Fig. 4B,D). In the SN, prominent h α -syn immunoreactivity was also significantly reduced following proteinase-K treatment ($F_{(1,24)} = 23.15$; $P < 0.0001$), but remained detectable

(28.5% remaining staining at 3 months and 20.8% at 6 months; Fig. 4G,I). Sparse GFP-positive cells were detected in the SN of rats injected with AAV-MBP-GFP. Stereological counts revealed $1,306 \pm 389$ GFP-positive cells, indicating a small uptake of the viral vector at the level of striatal dopaminergic terminals resulting in the expression of the transgene in 7% of nigral neurons in AAV-MBP-GFP-injected rats (Supporting Fig. 1). However, the extent of h α -syn expression and accumulation in the SN (Fig. 4F–I) largely exceeds that of GFP (Supporting Fig. 1) and thus suggests that a majority of nigral h α -syn may stem from the uptake of h α -syn expressed by striatal oligodendrocytes. There was a positive correlation between proteinase-K-resistant h α -syn staining intensity in the SN and striatum ($R^2 = 0.65$; $P < 0.05$).

Immunostaining against α -syn phosphorylated at serine 129 (p- α -syn) was performed in the SN and striatum using an antibody that recognizes both phosphorylated rodent

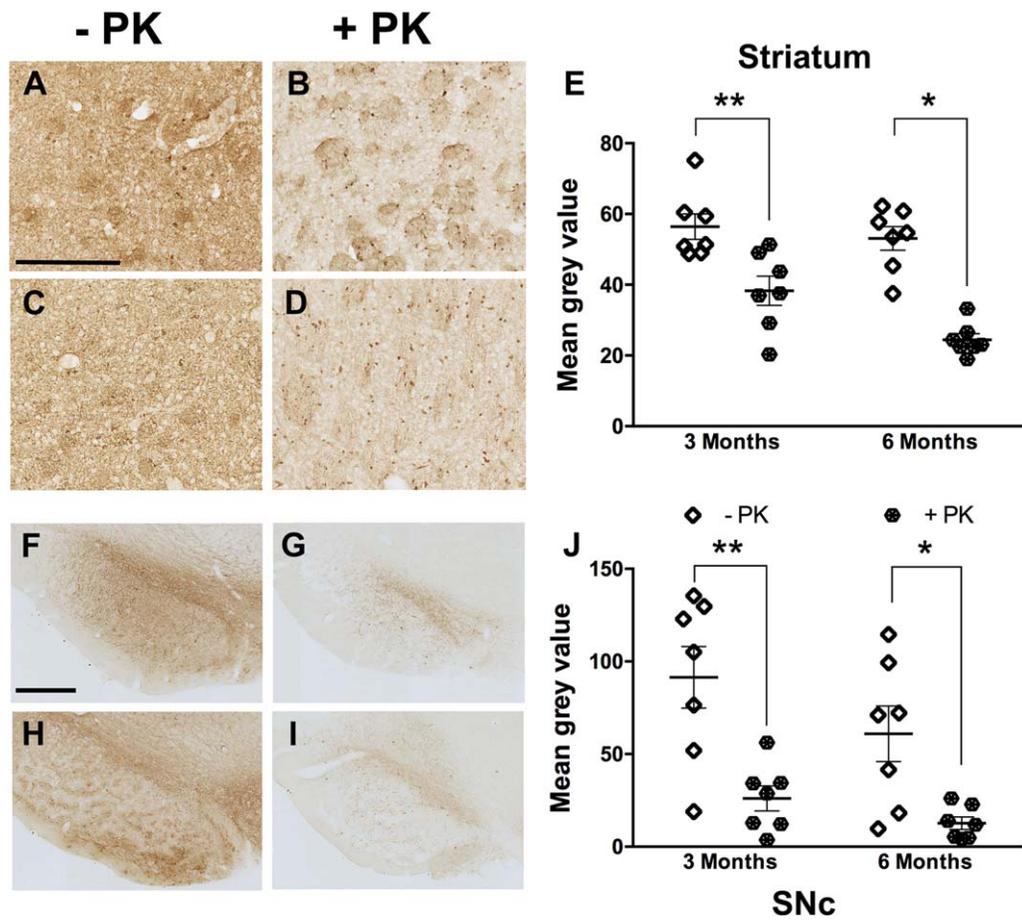


FIG. 4. $h\alpha$ -syn expression and insolubility in the striatum and SN of AAV-MBP- $h\alpha$ -syn rats. (A–D) $h\alpha$ -syn immunostaining in the striatum at 3 (A,B) and 6 months (C,D). (E) Quantification of $h\alpha$ -syn signal intensity in the striatum. (F–I) $h\alpha$ -syn immunostaining in the SN at 3 (F,G) and 6 months (H,I). (J) Quantification of $h\alpha$ -syn signal intensity in the substantia nigra. – PK: sections immunostained without proteinase-K. + PK: sections immunostained following proteinase-K digestion. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Scale bar = 250 μ m (A–D), 500 μ m (F,I). [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

and $h\alpha$ -syn (Supporting Fig. 2). Accordingly, p- α -syn was detected both in AAV-MBP-GFPdeg and AAV-MBP- $h\alpha$ -syn rats. However, AAV-MBP- $h\alpha$ -syn rats displayed increased p- α -syn staining in the SN ($F_{(1,24)} = 11.83$; $P < 0.01$) at 3 months compared with AAV-MBP-GFPdeg ($P < 0.01$). In the striatum, there was a significant effect of $h\alpha$ -syn ($F_{(1,24)} = 9.83$; $P < 0.01$), with increased p- α -syn staining at 3 and 6 months in AAV-MBP- $h\alpha$ -syn compared with AAV-MBP-GFPdeg ($P < 0.05$). Similar to results obtained with $h\alpha$ -syn, the magnitude of p- α -syn accumulation in the SN is compatible with the uptake of $h\alpha$ -syn or p- α -syn by striatal dopaminergic terminals. There was a positive correlation between nigral and striatal ($R^2 = 0.58$; $P < 0.01$), striatal and corpus callosum ($R^2 = 0.68$; $P < 0.0001$), and nigral and corpus callosum ($R^2 = 0.58$; $P < 0.01$) p- α -syn levels, indicating that the most severely affected animals displayed a high burden of p- α -syn in all investigated areas.

Oligodendroglial Overexpression of $h\alpha$ -syn in the Macaque Putamen

Injection of AAV-MBP- $h\alpha$ -syn in the macaque putamen led to a detectable expression of $h\alpha$ -syn (Fig. 5).

Double immunofluorescence was performed with α -syn coupled either with GST- π or NeuN to assess the cellular pattern of MBP-driven expression of $h\alpha$ -syn. Counts of double-stained cells revealed that MBP-driven expression resulted in the expression of $h\alpha$ -syn in oligodendrocytes (60.4%) and neurons (39.6%). Within the injected area, 39.8% of GST- π -positive cells and 8.7% of NeuN-positive cells were positive for $h\alpha$ -syn.

Discussion

AAV-mediated overexpression of wild-type or mutated $h\alpha$ -syn in neurons has proven to be a robust, disease-relevant, and reproducible way of modeling PD in rodents and nonhuman primates.^{14,30} However, its usefulness for developing experimental models of other synucleinopathies, such as MSA, had not been evaluated. Here, we demonstrate that targeted expression of $h\alpha$ -syn in oligodendrocytes leveraging selectivity of the mouse MBP promoter utilizing AAV-mediated somatic gene transfer is a valid strategy for modeling MSA by inducing progressive motor impairments,

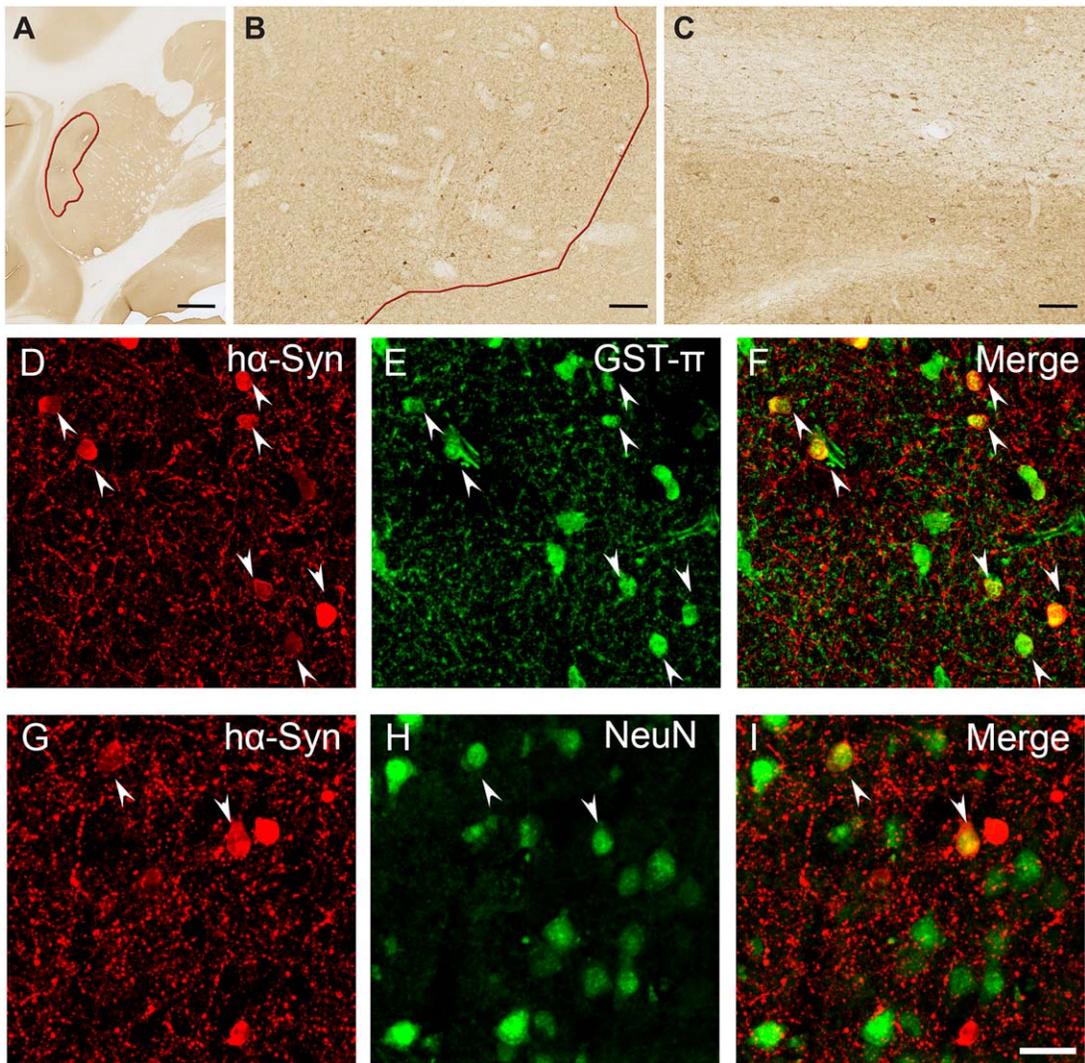


FIG. 5. Oligodendroglial selectivity of MBP-driven α -syn expression in macaque monkey. (A) Area of AAV1/2 transduction in the macaque putamen (red line) showing α -syn-immunopositive cells (B,C). (D–F) Double immunofluorescence for α -syn (D,G) and the oligodendroglial marker, GST- π (E), or the neuronal marker, NeuN (H), demonstrating expression in oligodendrocytes (F) and, to a lesser extent, in neurons (I). Scale bar: 2 mm (A), 100 μ m (B,C), and 20 μ m (D–I). [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

neurodegeneration in the SN, and striatum together with the accumulation of insoluble and phosphorylated α -syn.

Viral-mediated expression of α -syn under the control of the mouse MBP promoter resulted in a high selectivity (>80%) of oligodendroglial expression of α -syn in rats, consistent with the selectivity previously achieved in mice using the same promoter.^{16,31} In macaque monkeys, AAV-MBP- α -syn was still able to preferentially drive α -syn expression in oligodendrocytes, albeit to a lower extent (>60%). Even though MSA is defined as an oligodendroglial synucleinopathy, the presence of neuronal accumulation of α -syn has historically been described,^{32,33} but remained largely overlooked until a recent study demonstrated that neuronal cytoplasmic α -syn inclusions are widespread and systematically found in MSA.⁹

AAV-mediated expression of α -syn in oligodendrocytes led to the development of progressive motor

deficits 2 months following intrastriatal AAV injections and gradually worsening over the 6-month duration of follow-up. This longitudinal analysis of motor behavior defines the rate of progression of motor impairments in this model and provides useful information for future studies aiming at counteracting α -syn-induced oligodendroglial accumulation and neurodegeneration. Stepping performances correlated with nigral, but not with striatal, cell counts, suggesting that nigral degeneration is the main contributor to these motor impairments. Importantly, we also demonstrate a lack of response to L-dopa in AAV-MBP- α -syn-injected rats, a key feature of parkinsonism in MSA associated with the loss of striatal medium spiny neurons,³⁴ indicating that this model may be useful to investigate the therapeutic potential of nondopaminergic options to alleviate motor symptoms.

The progression of neurodegeneration at both sides of the nigrostriatal pathway was different, with

significant neuronal loss at 3 months occurring only in the SNc and combined SNc and striatal degeneration at 6 months. Such dissociation between the progression of pre- and prosynaptic degeneration of the nigrostriatal pathway is consistent with clinical findings of a significant, but transient, therapeutic benefit of L-dopa in 30% to 50% of MSA patients¹ and suggesting that substantial nigral degeneration can occur before significant striatal neuron loss as observed in some MSA patients. This disconnection between the onset and rate of nigral and striatal degeneration also indicates that dopaminergic neurons are more vulnerable than striatal medium spiny neurons to α -syn-induced neurodegeneration.

Importantly, striatal injection of AAV-MBP- α -syn was able to induce a widespread synucleinopathy in the striatum, white matter, and SN. Prominent α -syn immunoreactivity was observed in the striatum and SN 3 months after AAV-MBP- α -syn and remained persistent at 6 months, indicating sustained expression of the transgene. Moreover, a substantial proportion of α -syn was insoluble, as assessed using previous incubation with proteinase-K, and the amounts of α -syn and proteinase-K resistant α -syn were positively correlated in the SN. Significant amounts of α -syn phosphorylated at serine 129 were also detected in the SN and striatum at 3 and 6 months, indicating that this post-translational modification of α -syn extensively found in GCIs^{35,36} is largely recapitulated in this AAV model. However, available antibodies do not discriminate between human and rodent p- α -syn and thus do not allow concluding about the endogenous or human origin of p- α -syn. Interestingly, substantial accumulation of α -syn and p- α -syn was found in the SN following striatal injection of AAV-MBP- α -syn. We did observe sparse GFP immunoreactivity in the SN of AAV-MBP-GFP-injected rats, suggesting that uptake of AAV1/2 by striatal dopaminergic terminals can occur. Stereological counts of GFP-positive cells in AAV-MBP-GFP-injected rats revealed that the transgene was expressed in 7% of nigral neurons. Considering the magnitude of neurodegeneration in AAV-MBP-SYN-injected rats (-42.4% at 3 months and -63.4% at 6 months), such nigral expression of the transgene is unlikely to play a major role in neurodegeneration. Given that there is a small expression of α -syn in the SN, it is impossible to estimate how much of the nigral α -syn comes from nigral transgene expression versus transfer from striatal oligodendrocytes. However, the extent of α -syn immunoreactivity in the SN (Fig. 4) largely exceeds that of GFP immunoreactivity (Supporting Fig. 1), thus supporting the suggestion that most of the nigral α -syn may essentially (although not exclusively) come from striatal oligodendrocytes. Such a scenario is compatible with the demonstrated capacity of overexpressed

α -syn to propagate within the brain through anatomical connections^{37,38} and suggests that the oligodendrocyte-to-neuron propagation may be involved in the pathogenesis of MSA.

This AAV-based approach expands the currently limited range of preclinical models of MSA by allowing, for the first time, to target the expression of α -syn in oligodendrocytes in the adult rat brain. We further demonstrate that such an AAV-mediated approach may be usable in nonhuman primates and provide the first description of AAV-mediated transgene expression in oligodendrocytes in the nonhuman primate that was achieved by the use of a cellular promoter. However, longitudinal studies must be performed to determine the progression of behavioral deficits and MSA-like pathology in this species. AAV-mediated expression of α -syn in oligodendrocytes in adult rats offers a flexible strategy able to recapitulate various aspects of MSA pathology and progression. Such a model enables studying the consequences of adult-onset α -syn expression in oligodendrocytes following normal development. While the present strategy of intra-striatal injection is mainly relevant to MSA-P, simultaneous multisystem injections will allow inducing a full-blown pathology, discrete injections in selected brain nuclei affected in MSA can allow investigating the underlying mechanisms of neuronal dysfunction and degeneration, as well as their respective contribution to the symptomatology of the disease without putative confounding effects of other dysfunctional systems. This AAV-based model will be useful for investigating the pathophysiology of MSA and for developing currently lacking symptomatic or disease-modifying therapeutic strategies. ■

Acknowledgments: The Université de Bordeaux and the Centre National de la Recherche Scientifique provided infrastructural support. Slide scanning was performed at the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the CNRS-INSERM and University of Bordeaux, member of the national infrastructure France Bioimaging. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The authors thank Drs. M. Decressac and A. Björklund for providing α -syn construct, Drs T. Nonaka and M. Hasegawa for providing GFP-deg construct, Dr Mathieu Bourdenx for providing the R script for multiple correlations, and Miss Sandra Dovero for technical assistance with histopathological analysis.

References

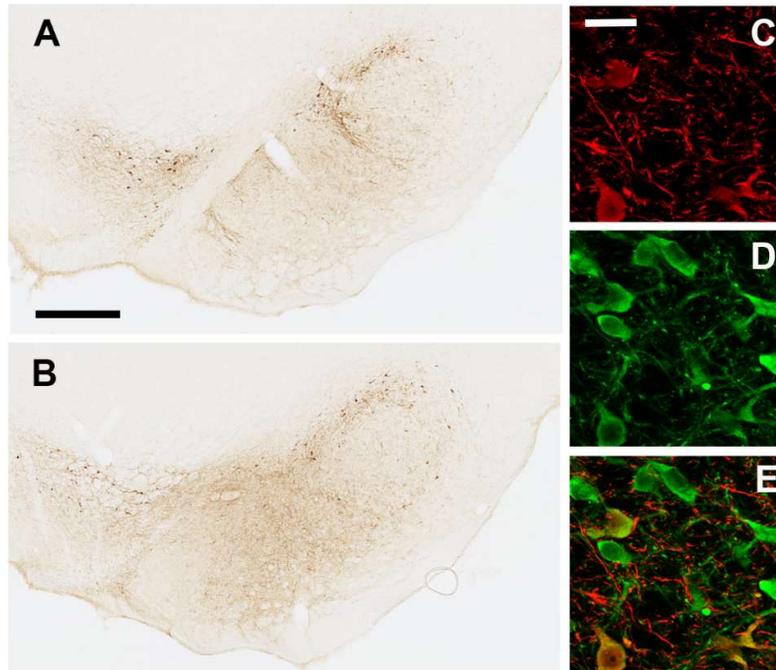
1. Wenning GK, Geser F, Krismer F, et al. The natural history of multiple system atrophy: a prospective European cohort study. *Lancet Neurol* 2013;12:264-274.
2. Schrag A, Ben-Shlomo Y, Quinn NP. Prevalence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy: a cross-sectional study. *Lancet* 1999;354:1771-1775.
3. Tison F, Yekhlef F, Chrysostome V, Sourgen C. Prevalence of multiple system atrophy. *Lancet* 2000;355:495-496.
4. Meissner WG, Frasier M, Gasser T, et al. Priorities in Parkinson's disease research. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10:377-393.
5. Benarroch EE, Schmeichel AM, Low PA, Parisi JE. Depletion of putative chemosensitive respiratory neurons in the ventral medullary surface in multiple system atrophy. *Brain* 2007;130(Pt 2):469-475.

6. Schwarzacher SW, Rub U, Deller T. Neuroanatomical characteristics of the human pre-Botzinger complex and its involvement in neurodegenerative brainstem diseases. *Brain* 2011;134(Pt 1):24-35.
7. Tada M, Kakita A, Toyoshima Y, et al. Depletion of medullary serotonergic neurons in patients with multiple system atrophy who succumbed to sudden death. *Brain* 2009;132(Pt 7):1810-1819.
8. Spillantini MG, Goedert M. The alpha-synucleinopathies: Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy. *Ann N Y Acad Sci* 2000;920:16-27.
9. Cykowski MD, Coon EA, Powell SZ, et al. Expanding the spectrum of neuronal pathology in multiple system atrophy. *Brain* 2015;138(Pt 8):2293-2309.
10. Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, et al. Hyperphosphorylation and insolubility of alpha-synuclein in transgenic mouse oligodendrocytes. *EMBO Rep* 2002;3:583-588.
11. Yazawa I, Giasson BI, Sasaki R, et al. Mouse model of multiple system atrophy alpha-synuclein expression in oligodendrocytes causes glial and neuronal degeneration. *Neuron* 2005;45:847-859.
12. Shults CW, Rockenstein E, Crews L, et al. Neurological and neurodegenerative alterations in a transgenic mouse model expressing human alpha-synuclein under oligodendrocyte promoter: implications for multiple system atrophy. *J Neurosci* 2005;25:10689-10699.
13. Fernagut PO, Tison F. Animal models of multiple system atrophy. *Neuroscience* 2012;211:77-82.
14. Ulusoy A, Decressac M, Kirik D, Bjorklund A. Viral vector-mediated overexpression of alpha-synuclein as a progressive model of Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 2010;184:89-111.
15. Dehay B, Dalkara D, Dovero S, Li Q, Bezaud E. Systemic scAAV9 variant mediates brain transduction in newborn rhesus macaques. *Sci Rep* 2012;2:253.
16. von Jonquieres G, Mersmann N, Klugmann CB, et al. Glial promoter selectivity following AAV-delivery to the immature brain. *PLoS One* 2013;8:e65646.
17. Decressac M, Mattsson B, Lundblad M, Weikop P, Bjorklund A. Progressive neurodegenerative and behavioural changes induced by AAV-mediated overexpression of alpha-synuclein in midbrain dopamine neurons. *Neurobiol Dis* 2012;45:939-953.
18. Nonaka T, Hasegawa M. A cellular model to monitor proteasome dysfunction by alpha-synuclein. *Biochemistry* 2009;48:8014-8022.
19. McClure C, Cole KL, Wulff P, Klugmann M, Murray AJ. Production and titration of recombinant adeno-associated viral vectors. *J Vis Exp* 2011;(57):e3348.
20. Xiao W, Chirmule N, Berta SC, McCullough B, Gao G, Wilson JM. Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol* 1999;73:3994-4003.
21. Zolotukhin S, Byrne BJ, Mason E, et al. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther* 1999;6:973-985.
22. Aurnhammer C, Haase M, Muether N, et al. Universal real-time PCR for the detection and quantification of adeno-associated virus serotype 2-derived inverted terminal repeat sequences. *Hum Gene Ther Methods* 2012;23:18-28.
23. Engeln M, Bastide MF, Toulmé E, et al. Selective inactivation of striatal fosb/deltafosb-expressing neurons alleviates L-DOPA-Induced dyskinesia. *Biol Psychiatry* 2016;79:354-361.
24. Porras G, Berthet A, Dehay B, et al. PSD-95 expression controls L-DOPA dyskinesia through dopamine D1 receptor trafficking. *J Clin Invest* 2012;122:3977-3989.
25. Urs NM, Bido S, Peterson SM, et al. Targeting beta-arrestin2 in the treatment of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:E2517-E2526.
26. Engeln M, Fasano S, Ahmed SH, et al. Levodopa gains psychostimulant-like properties after nigral dopaminergic loss. *Ann Neurol* 2013;74:140-144.
27. Fernagut PO, Hutson CB, Fleming SM, et al. Behavioral and histopathological consequences of paraquat intoxication in mice: effects of alpha-synuclein over-expression. *Synapse* 2007;61:991-1001.
28. Fernagut PO, Meissner WG, Biran M, et al. Age-related motor dysfunction and neuropathology in a transgenic mouse model of multiple system atrophy. *Synapse* 2014;68:98-106.
29. Bastide MF, Dovero S, Charron G, et al. Immediate-early gene expression in structures outside the basal ganglia is associated to L-DOPA-induced dyskinesia. *Neurobiol Dis* 2014;62:179-192.
30. Dehay B, Fernagut PO. Alpha-synuclein-based models of Parkinson's disease. *Rev Neurol (Paris)* 2016;172:371-378.
31. Lawlor PA, Bland RJ, Mouravlev A, Young D, During MJ. Efficient gene delivery and selective transduction of glial cells in the mammalian brain by AAV serotypes isolated from nonhuman primates. *Mol Ther* 2009;17:1692-1702.
32. Arima K, Ueda K, Sunohara N, et al. NACP/alpha-synuclein immunoreactivity in fibrillary components of neuronal and oligodendroglial cytoplasmic inclusions in the pontine nuclei in multiple system atrophy. *Acta Neuropathol* 1998;96:439-444.
33. Ozawa T, Paviour D, Quinn NP, et al. The spectrum of pathological involvement of the striatonigral and olivopontocerebellar systems in multiple system atrophy: clinicopathological correlations. *Brain* 2004;127(Pt 12):2657-2671.
34. Fearnley JM, Lees AJ. Striatonigral degeneration. A clinicopathological study. *Brain* 1990;113(Pt 6):1823-1842.
35. Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, et al. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 2002;4:160-164.
36. Ishizawa K, Komori T, Arai N, Mizutani T, Hirose T. Glial cytoplasmic inclusions and tissue injury in multiple system atrophy: a quantitative study in white matter (olivopontocerebellar system) and gray matter (nigrostriatal system). *Neuropathology* 2008;28:249-257.
37. Ulusoy A, Musgrove RE, Rusconi R, et al. Neuron-to-neuron alpha-synuclein propagation in vivo is independent of neuronal injury. *Acta Neuropathol Commun* 2015;3:13.
38. Ulusoy A, Rusconi R, Perez-Revuelta BI, et al. Caudo-rostral brain spreading of alpha-synuclein through vagal connections. *EMBO Mol Med* 2013;5:1119-1127.

Supporting Data

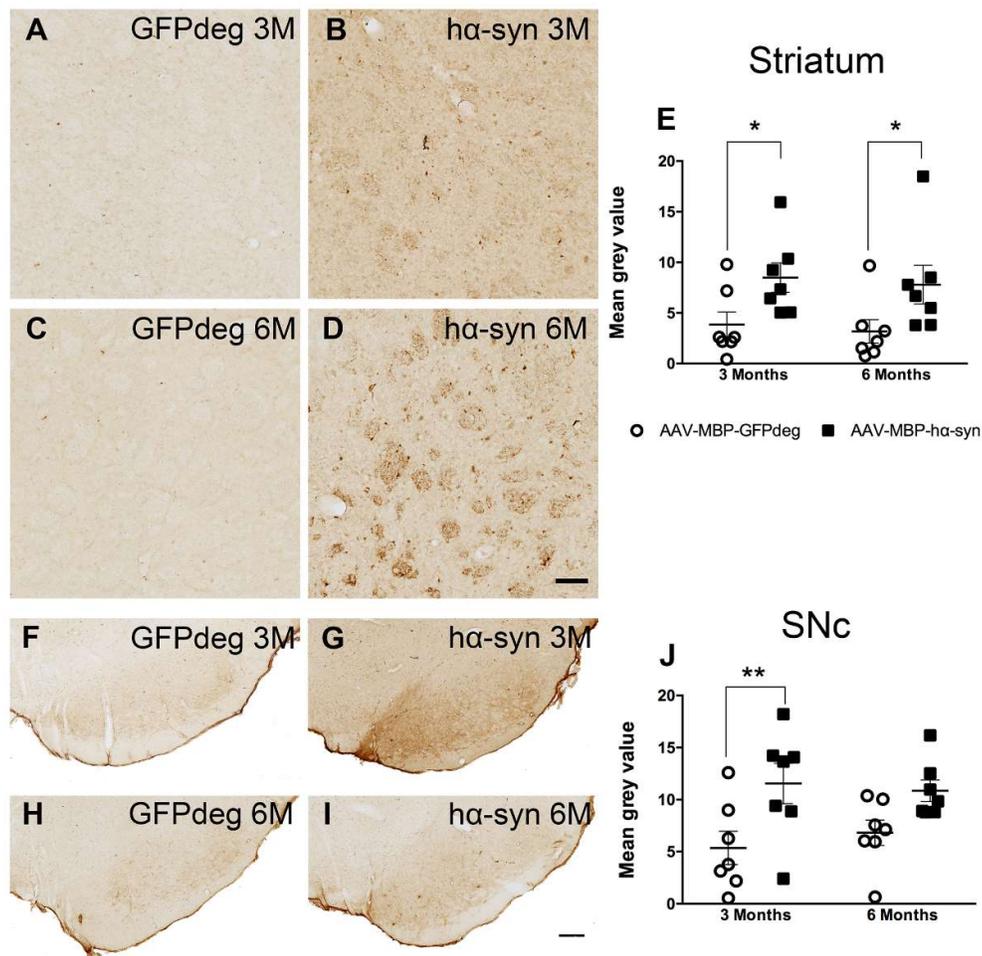
Additional Supporting Information may be found in the online version of this article

Supplementary material



Supplementary Figure 1: *transgene expression in the substantia nigra following intrastriatal injection of AAV-MBP-GFP.*

A, B. Representative images of GFP immunoreactivity in the substantia nigra following intrastriatal injection of AAV-MBP-GFP. **C-E.** Double immunofluorescence for GFP (**C**) tyrosine hydroxylase (**D**) demonstrating expression in a subset of nigral neurons (**E**). Scale bar: 500 μm (**A, B**), 25 μm (**C-E**).



Supplementary Figure 2: *Effect of oligodendroglial overexpression of α -syn on phosphorylated α -syn (p - α -syn) in the striatum and substantia nigra.*

A-D. p - α -syn immunostaining in the striatum of AAV-MBP-GFP (**A, C**) and AAV-MBP-h α -syn rats (**B, D**). Scale bar = 100 μ m. **E.** Quantification of p - α -syn signal intensity in the striatum. *, $p < 0.05$. **F-I.** p - α -syn immunostaining in the substantia nigra of AAV-MBP-GFP (**F, H**) and AAV-MBP-h α -syn rats (**G, I**). Scale bar = 300 μ m. **J.** Quantification of p - α -syn signal intensity in the substantia nigra. **, $p < 0.01$.

En résumé : Après injection du vecteur viral dans le striatum des rats, l' α -syn sous le contrôle du promoteur MBP est exprimée préférentiellement au niveau des oligodendrocytes (83%). Dans le putamen du modèle primate la spécificité oligodendrogliale est de 60,4%. Dans le modèle de rat la surexpression de l' α -syn oligodendrogliale est responsable du développement progressif d'une dysfonction motrice mesurable par le test de stepping deux mois après l'injection virale. Six mois après l'injection, la L-Dopa ne modifie pas le comportement moteur.

A trois mois post injection nous avons déterminé chez le rat une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc de 41%, qui est encore aggravée à six mois post injection (66%). S'il n'y a pas d'effet sur les neurones striataux trois mois après l'inoculation virale, à six mois 23% d'entre eux ont dégénérés.

Trois mois après l'injection nous avons mesuré la présence d' α -syn agrégée résistante à la protéinase K (PK) dans le striatum et la SNc. Il y a une augmentation significative de la forme phosphorylée pathologique de l' α -syn (Ser129) à trois et six mois dans le striatum et à trois mois uniquement dans la SNc des rats MBP-syn.

La dégénérescence nigrale chez le rat corrèle positivement avec l'aggravation de la dysfonction motrice.

Partie 2 : Approches thérapeutiques

Nous avons utilisé le modèle de souris transgénique PLP-syn pour explorer trois différentes stratégies thérapeutiques ; ce modèle est présenté en détail plus bas. Les méthodes utilisées pour les trois études sont identiques, à quelques détails près qui seront précisés (les différents anticorps utilisés en Western Blot selon les cibles des traitements, les statistiques pour les différents projets ainsi que le matériel d'enregistrement utilisé pour déterminer le comportement moteur) et sont donc communes pour cette seconde partie. Ce travail n'a pas été effectué seul, les projets étant partagés avec Miguel Lopez Cuiña également étudiant en thèse ; nous avons travaillé de concert pour l'analyse du comportement moteur des animaux et tandis que je me chargeais de la partie immunomarquages sur sections flottantes, il a de son côté fait toute la partie Western Blot. Comme nous n'étions pas habilités à manipuler des échantillons humains, Marie-Laure Arotcarena a pris en charge la partie Western Blot pour l'analyse du tissu cérébral de patients AMS et de témoins.

Modèle animal

Ce modèle de souris a été développé par Philip Kahle à Munich et sur-exprime l' α -syn sous le contrôle du promoteur oligodendroglial PLP. Il développe une dysfonction motrice légère et progressive (**Fernagut et al., 2014**) ainsi qu'une dysautonomie progressive (**Boudes et al., 2013, Flabeau et al., 2014, Hartner et al., 2016, Kuzdas et al., 2013, Stemberger et al., 2010**). La dysfonction motrice chez ce modèle est bien évidente après 12 mois de vie chez la souris PLP-syn comparé à la souris PLP-Wild Type (fond C57BL6, qu'on nommera simplement WT) lorsqu'on mesure le nombre d'erreurs lors du test de la traversée d'une poutre (voir matériel et méthodes ci-dessous) (**Fernagut et al., 2014, Refolo et al., 2018**). En revanche, les résultats sont variables si on regarde les différentes études menées avant 12 mois de vie (**Bassil et al., 2016, Bassil et al., 2017**).

Les dysfonctions motrices et autonomes sont couplées à une neurodégénérescence modérée et progressive des neurones dopaminergiques de la SNc entre 2 et 4 mois de vie (**Bassil et al., 2016, Refolo et al., 2018**), une neurodégénérescence des neurones striataux plus tardive à partir de un an de vie et une neurodégénérescence de plusieurs centres autonomes cérébraux à différents âges (**Stefanova and Wenning, 2015**). Parallèlement, une accumulation de formes agrégées insolubles et hyperphosphorylées (S129) de l' α -syn dans les oligodendrocytes (**Refolo**

et al., 2018, Kahle et al., 2002) ainsi qu'une activation des processus neuroinflammatoires (Stefanova et al., 2007) se développe chez ce modèle.

Dans les différentes stratégies thérapeutiques présentées, nous avons souhaité interférer avec la perte des neurones dopaminergiques de la SNc qui intervient entre 2-4 mois de vie. Les souris traitées ont donc été sacrifiées avant d'atteindre l'âge d'un an mais nous avons tout de même étudié leur comportement moteur par le test de traversée d'une poutre.

C'est un modèle présentant plusieurs des phénomènes pathologiques retrouvés dans l'AMS, qui a donc de nombreux avantages malgré les lacunes relatives aux modèles transgéniques (voir Introduction, L'atrophie multisystématisée, Partie 1.6 Modélisation de l'atrophie multisystématisée).

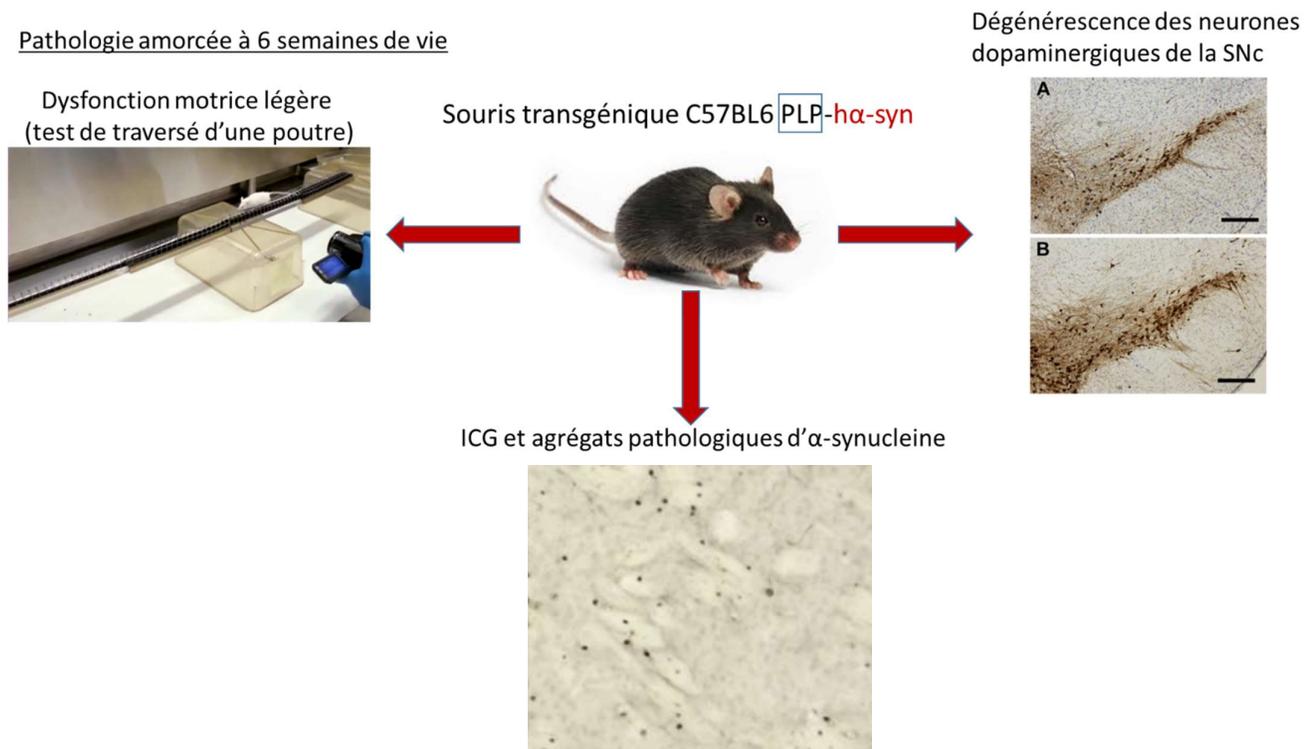


Figure 16 : Mécanismes pathologiques examinés chez le modèle PLP-syn pour les différentes approches thérapeutiques étudiées au cours de la thèse

Matériel et méthodes

Tissu cérébral humain

Les analyses ont été effectuées sur des échantillons de tissu du cortex frontal, du putamen et du pont, issus de la cérébrothèque nationales (GIE Neuro-Ceb, Paris) et dont certains ont été prélevés au Centre de Référence Maladie Rare AMS du CHU de Bordeaux. Les caractéristiques des sujets AMS et contrôles sont données dans le **Tableau 6**.

n°cas	Diagnostic neuropathologique	sexe	âge en années	dpm
1	MSAp (avec stimulation sous thalamique)	M	54	5h15
2	MSAp	F	64	6h30
3	MSAp	F	60	nd
4	MSAp	F	57	7h
5	MSAp	M	75	72h
6	MSAp	F	78	48h
7	MSAp	M	77	39h
8	Témoin	M	84	15h30
9	Témoin avec lésions Alzheimer stade II de Braak	M	79	nd
10	Témoin	M	69	6h30
11	Témoin avec lésions Alzheimer stade II de Braak	F	83	21h
12	Témoin	M	80	4h
13	Témoin avec angiopathie amyloïde sévère	M	78	23h

Tableau 6 : Caractéristiques des sujets contrôles et AMS étudiés dans la partie stratégie thérapeutique

Dpm = délai de prélèvement post mortem

Analyse du comportement moteur des souris PLP-syn

Le test de traversée d'une poutre a été utilisé pour analyser le comportement moteur des souris PLP-syn (**Fleming et al., 2013**). Brièvement, ce test permet d'enregistrer et de compter ultérieurement le nombre d'erreurs commises par les souris traversant une poutre d'un mètre de long, couverte par une grille (voir **Figure 16**). Les résultats sont calculés par le ratio d'erreurs faits par pas. L'enregistrement a été fait avec une caméra JVC Everio GZ-MG630 pour les études rapamycine et nilotinib et avec une Gopro 5 heroes permettant une analyse en slow motion pour l'étude GRK2.

Prélèvement du tissu cérébral murin

A la fin de la période de traitement (voir plan de l'étude pour chacune des différentes stratégies thérapeutiques), les souris ont été anesthésiées avec une dose létale de pentobarbital (100mg/kg en intrapéritonéal). Les souris ont été perfusées en intracardiaque avec une solution saline à 0,9%. Les cerveaux ont été prélevés et coupés entre les deux les hémisphères. L'hémisphère gauche a été directement congelé pour des analyses biochimiques, tandis que l'hémisphère droit a été post-fixé dans une solution de paraformaldéhyde à 4% pendant 5 jours, cryo-protégé dans une solution de sucrose à 20% (dilué dans du PBS 0,1%), gelé dans de l'isopentane (SNAPFROST, Excilone) et conservé à -80°C pour l'analyse immunohistologique.

Analyses biochimiques des échantillons

Extraction et quantification protéique. L'extraction protéique des échantillons de tissus humains a été effectuée à 4°C en utilisant 1mL de tampon RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1.0% Triton X-100, 0.5% Na-deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate) avec une pastille inhibitrice des protéases (Complext Mini, Roche Diagnostics). Après 20 min d'extraction à 4°C, les lysats protéiques ont été centrifugés à 14000 rpm, 15 min, 4°C. Le surnageant a ensuite été collecté et un test utilisant l'acide bicinchoninique (BCA) a permis de déterminer la quantité protéique présente dans chaque lysat, qui ont été conservés à -80°C.

L'extraction protéique du tissu de striatum de souris a été effectuée de la même manière mais avec un tampon d'extraction RIPA différent (10mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 0.5mM 1,4-Dithiothreitol, 0.5mM acide ethylenediaminetetraaceti, 1% N-Lauroylsarcosine (Sarkosyl)), complété avec une pastille inhibitrice des phosphatases et des protéases (ThermoFisher Scientific).

En se basant sur la concentration protéique totale mesurée par le test BCA, des 'aliquots' de lysat tissulaire ont été préparés pour chaque patient et souris dans du tampon Laemmli (Tris-HCl 25mM pH=6.8, Glycerol 7.5%, SDS 1%, DTT 250mM and Bromophenol Blue 0.05%).

Western Blot. Pour les échantillons humains, 40µg de protéines par analyte (sauf pour LC3, 10µg) ont été séparés par SDS-PAGE et transférés sur une membrane de nitrocellulose. L'incubation avec l'anticorps (AC) primaire a été effectuée durant une nuit à 4°C. Les AC primaires utilisés sont listés ici : anti-LC3 lapin (1 : 1000, N100-2220, Novus Biologicals©),

anti-mTOR lapin (1 : 1000, 2972S ; Cell Signaling Technology), anti-p70S6 Kinase lapin (1 : 1000, 9202S, Cell Signaling Technology), anti-Phospho-p70 S6 Kinase lapin (Thr389) (1 : 1000, 9205S, Cell Signaling Technology), anti-GRK2 lapin (1 : 1000, ab153712, Abcam).

Pour les échantillons de souris, 20µg de protéines ont été séparés par SDS-PAGE avant d'être transférés sur une membrane de nitrocellulose. L'incubation avec l'anticorps (AC) primaire a été effectuée durant une nuit à 4°C. Les AC primaires utilisés sont listés ici : anti- α -syn humaine souris (1 : 2000, 4B12, ThermoFisher), anti-cAbl totale lapin (1 : 1000, PA1-46467, ThermoFisher), anti-GRK2 souris (1 : 1000, sc-13143, Santa Cruz Biotechnology), anti phospho-IRS1 Ser307 lapin (1 : 2000, PA1-1054, Thermofisher).

Un AC Anti-actine souris (1 : 5000, Sigma) a été utilisé pour contrôler les niveaux de protéines chargées en Western Blot. La révélation de l'AC secondaire approprié, couplé à la peroxydase, a été effectuée en utilisant un kit Super Signal West Pico Chemiluminescent (Immobilon Western, Chemiluminescent HRP substrate, Millipore). Les images ont été acquises en chémioluminescence grâce au système ChemiDoc+XRS system measurement (BioRad). L'intensité des bandes a été quantifiée via le programme ImageJ.

Analyses histopathologiques des échantillons de souris

Marquage immunohistochimique TH et Nissl des neurones de la SNc. Après un lavage au PBS 0,1M (PBS), les coupes de 40µm de la SNc ont été incubées dans une solution de citrate x1 (pH=6, Dako Target Retrieval Solution, dilué dans de l'eau distillée) et chauffées à 80°C pendant 30min pour effectuer un démasquage antigénique. Les sections ont ensuite été lavées trois fois au PBS et incubées avec une solution de peroxyde d'hydrogène à 0,3% (dilution PBS) pendant 10min de manière à inhiber les peroxydases endogènes. Après trois rinçages les coupes ont été incubées avec une solution à 2% d'albumine sérique bovine (BSA), 0,3% Triton X-100 (dilution PBS, solution de blocage) pendant une heure à température ambiante (Tamb). Après cela les sections ont été transférées dans l'AC primaire anti TH mAB 318 (Millipore, 1 : 4000, dilution PBS, 1% BSA, 0,3% Triton X-100, solution d'incubation) toute la nuit à Tamb. Après trois rinçages, les coupes ont été incubées avec le polymère Dako Envision anti souris pendant 30min, rincées à nouveau trois fois, puis révélées avec le kit DAB de Dako en suivant les instructions du fournisseur. Enfin, les sections ont été montées et séchées sur des lames gélatinées, immergées toute une nuit dans une solution composée à 50% d'éthanol absolu et

50% de chloroforme, et marquées avec une solution de crésyl violet (marque les noyaux cellulaires) après plusieurs rinçages à l'éthanol et au xylène.

Marquage immunofluorescent de l' α -syn résistante à la protéinase K dans le striatum des souris PLP-syn. Après trois rinçages les coupes de striatum ont été incubées pendant 10min à Tamb dans une solution à 10mg/mL de protéinase-K (Sigma, dilution PBS). Les sections ont ensuite été transférées dans deux bains d'eau distillée et deux bains de PBS pendant 10min à Tamb pour inhiber l'effet de la protéinase K. Après cela, les coupes ont été immergées dans la solution de blocage (30min à Tamb) puis dans l'AC primaire anti α -syn humaine lapin MJFR1 (1 : 10 000 dans la solution d'incubation, toute la nuit à Tamb). Après trois rinçages les coupes ont été incubées avec l'AC secondaire chèvre anti-lapin 568 (1 : 400, Alexa Fluor) pendant deux heures à Tamb, rincées trois fois dans une solution de PBS et montées sur lames avec un milieu de montage Vectashield + dapi.

Analyses. Une série de SNC (1/4, permettant le comptage de 5 sections) a été utilisée par animal pour le comptage stéréologique des neurones TH et Nissl. Le quadrillage des sondes stéréologiques a été effectué avec le programme Mercator Pro V6.5 (Explora Nova) couplé à un microscope Leica DM-6000B. Après délimitation de la SNC à l'objectif x5, le comptage a été fait à l'objectif x40 (**Fernagut et al., 2014**).

Pour le marquage immunofluorescent de l' α -syn, une coupe de striatum a été utilisée par animal. Six captures par striatum de souris du marquage immunofluorescent dans des zones précises ont été prises à l'objectif x20 et le nombre de cellules positives à l' α -syn a été compté en utilisant le programme ImageJ.

Statistiques

Pour les comparaisons entre deux groupes avec une distribution normale, un *t*-test a été utilisé, dans le cas échéant un test de Mann Whitney a été utilisé. Pour la comparaison d'un nombre de groupes supérieur à deux, une one-way Anova, si approprié, suivie d'un test post hoc de Bonferroni est effectuée dans le cas d'une distribution normale et un test de Kruskal-Wallis, si approprié, suivi d'une comparaison multiple de Dunn dans le cas d'une distribution non-gaussienne. Pour une comparaison à deux facteurs, une two-way Anova a été utilisée, si approprié, suivie d'un test post hoc de Bonferroni.

1) Rapamycine

Contexte : Les formes oligomériques de l' α -syn sont soupçonnées de médier des effets toxiques au niveau de plusieurs composants et fonctions cellulaires tels que la membrane, le recyclage des vésicules synaptiques, le stress oxydant, le système ubiquitine protéasome, la voie autophagie-lysosome et également d'avoir un rôle dans l'activation de processus pro-inflammatoires et apoptotiques, la mort neuronale et la dysfonction oligodendrogliale (**voir Introduction, 2.2**).

Diverses altérations de l'expression de protéines et de micro ARNs impliqués dans la voie ou bien la régulation de l'autophagie ont été recensées au niveau du tissu cérébral des patients AMS, ce qui laisse penser que l'atteinte de la voie autophagie-lysosome contribue potentiellement au processus neuropathologique. L' α -syn étant en partie dégradée par cette voie, ces altérations pourraient être à l'origine d'un cercle vicieux d'accumulation et de potentialisation de la toxicité de l' α -syn (**voir Introduction, 1.4, e**).

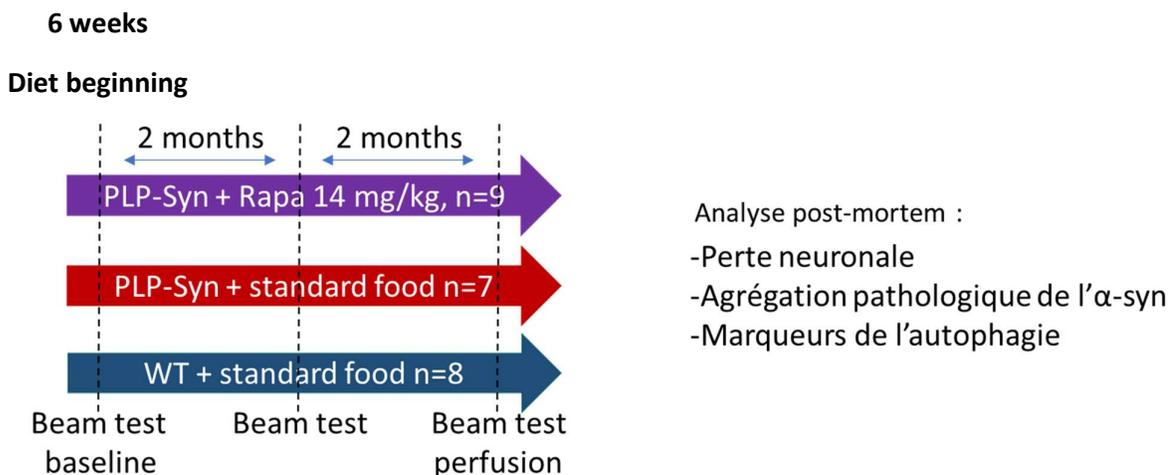
mTORC1 est un complexe protéique clef régulant la synthèse des protéines et inhibant l'autophagie (**Jung et al., 2010**). L'inhibiteur de mTORC1, la rapamycine, a montré des effets neuroprotecteurs dans plusieurs modèles de souris de la MP (**Bove et al., 2011**), où elle allège la perte des neurones dopaminergiques ainsi que l'agrégation de l' α -syn et augmente l'autophagie (**Crews et al., 2010, Dehay et al., 2010, Malagelada et al., 2010, Santini et al., 2009**).

Dans cette première partie, nous avons mesuré certaines protéines clefs de la voie autophagie-lysosome dans le tissu cérébral de patients AMS par rapport à un groupe témoin. Nous avons également déterminé l'effet de l'administration journalière de rapamycine via la nourriture, sur la perte neuronale et l'agrégation de l' α -syn dans le modèle de souris PLP-syn.

Plan de l'étude:

Dans un premier temps, des lysats protéiques issus de tissus cérébraux de patients AMS (putamen) ont été analysés en Western Blot pour mesurer les niveaux de protéines liées à la voie autophagie-lysosome (mTOR, LC3-I et LC3-II protéines dont le ratio reflète l'activation de l'autophagie et p70S6, une kinase activée par mTOR via phosphorylation en Thr389 (Harada et al., 2001)).

Dans un second temps, la rapamycine a été administrée aux souris PLP-syn via la nourriture, à une dose de 14 mg/kg de nourriture, qui a été choisie en accord avec les précédentes publications (Fok et al., 2014, Harrison et al., 2009). En parallèle, deux groupes contrôles de souris PLP-wild-type (WT) et PLP-syn ont reçu une alimentation standard. La diète a débuté 6 semaines après la naissance des animaux de manière concomitante à l'apparition des premières altérations neuropathologies (agrégation de l' α -synucléine notamment). Le comportement moteur a été analysé par le test de traversée d'une poutre (voir matériel et méthodes p72) avant le début de la diète (baseline), puis à deux et quatre mois après le début du traitement. Les animaux ont ensuite été euthanasiés par injection létale de pentobarbital sodique, une moitié du cerveau est utilisée pour l'analyse immunohistochimique (perte des neurones de la SNc et analyse de l'accumulation de l' α -syn) et biochimimique (Western Blot de l' α -syn monomérique). Les données n'étant pas distribuées normalement, nous avons utilisé des tests non paramétriques.



Les niveaux de mTOR sont diminués et ceux de LC3-II augmentés dans le putamen des patients AMS

Les niveaux des protéines ont été mesurés en Western Blot et normalisés avec l'actine (sauf dans le cas du ratio LC3-II/LC3-I). Les unités sont arbitraires les sujets AMS étant comparés aux sujets contrôles (100%).

La quantité de protéine mTOR (**Figure 17 A**) est diminuée de 95,3% chez les patients AMS (test de Mann Whitney, $p=0,035$, **Figure 17 B**) en comparaison aux sujets contrôles.

Le ratio LC3-II/LC3-I (**Figure 17 C**) est 8,1 fois plus élevé chez les patients AMS comparé aux sujets contrôles (test de Mann Whitney, $p=0,022$, **Figure 17 D**), ceci étant dû à la forte augmentation de la quantité de protéines LC3-II chez ces patients (niveaux 11,7 fois plus élevés, test de Mann Whitney, $p=0,022$, **Figure 17 E**).

S'il n'y a pas de différences significatives entre les groupes concernant les niveaux de la protéine totale p70S6 kinase (**Figure 17 F** et **Figure 17 H**) ainsi que de sa forme phosphorylée (**Figure 17 G** et **Figure 17 I**), le ratio phospho-p70S6/p70S6 totale est lui 3,4 fois plus élevé chez les patients AMS (test de Mann Whitney, $p=0,014$, **Figure 17 J**).

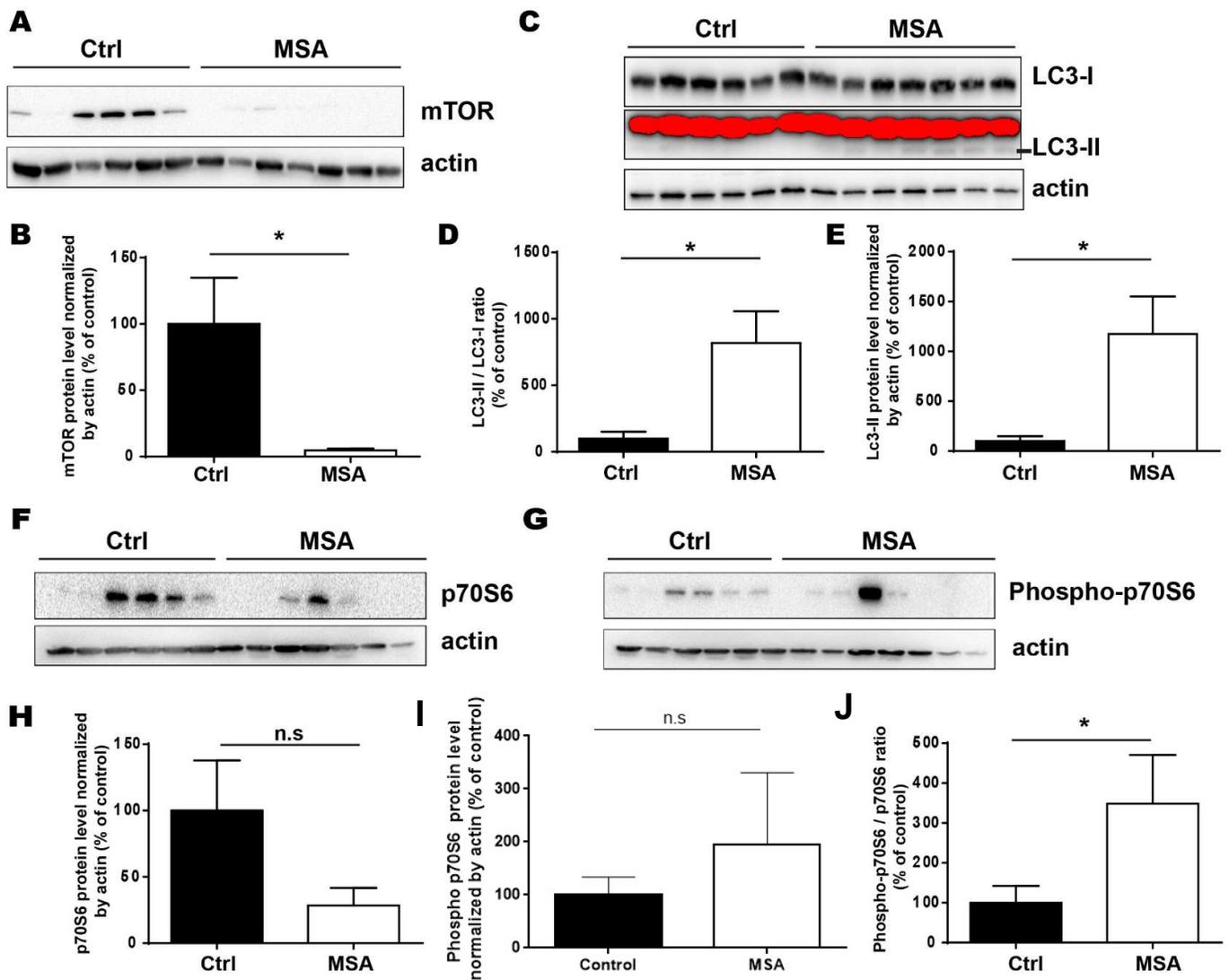


Figure 17 : Mesures par Western Blot de protéines participant à la voie autophago-lysosomale chez les patients AMS

Images représentatives des niveaux de protéines striatales chez les patients AMS et les sujets contrôles en Western Blot (A, C, F et G). Mesures des niveaux de mTOR (B), de LC3-I et LC3II (D et E) et de la forme totale de la kinase p70S6 (H), de sa forme phosphorylée (I) et du ratio des deux (J). Les mesures sont en unités arbitraires, les niveaux sont normalisés avec l'actine et exprimés en pourcentage en comparaison au groupe de sujets contrôles, mis à part le ratio LC3-II/LC3-I. Les barres d'erreurs sont représentées en SEM, sujets AMS (n=7) et sujets contrôles (n=6). *p<0,05, analyse de Mann Whitney.

La rapamycine n'entraîne pas de modification du comportement moteur

La comparaison entre les groupes par two-way Anova à un temps donné (baseline, 2 mois et 4 mois) n'est pas significative ; il n'y a donc pas de différence comportementale, que ce soit entre les groupes ayant reçu la nourriture standard (WT vs PLP-syn) ou les groupes ayant reçu la nourriture standard et le groupe PLP-syn ayant reçu la rapamycine pendant 4 mois (**Figure 18**).

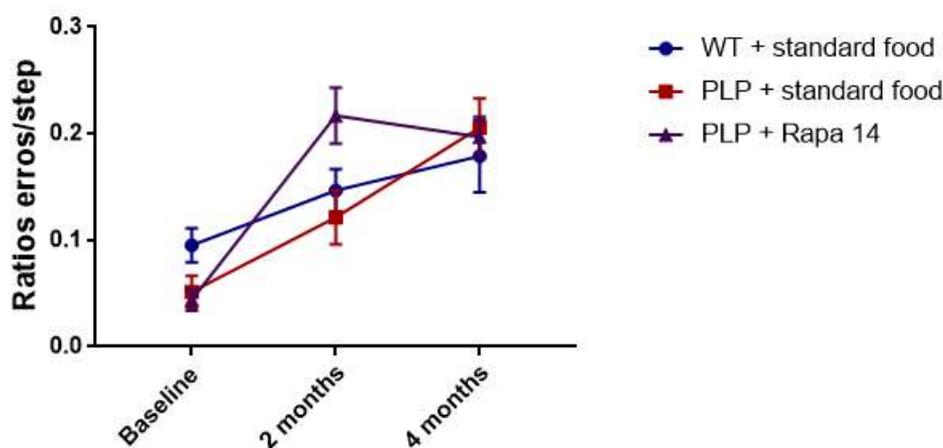


Figure 18 : Analyse du comportement moteur du test d'une traversée d'une poutre des souris PLP-syn et WT soumises ou non à une diète rapamycine

Les enregistrements ont été faits avant le début de la diète (baseline), deux et quatre mois après le début de la diète. L'analyse a été effectuée en two-way Anova.

La rapamycine induit une protection partielle des neurones dopaminergiques de la SNc chez les souris PLP-syn

Nous avons déterminé l'effet de la rapamycine sur la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc qui apparaît normalement entre 2 et 4 mois de vie chez le modèle PLP-syn. Nous avons également compté le nombre de neurones positifs à la contre coloration au crésyl violet (Nissl), qui marque les noyaux (les noyaux des cellules gliales sont écartés lors du comptage par leur morphologie qui diffère). Ce comptage des neurones n'exprimant pas la TH permet de déterminer dans le cas d'une diminution du nombre de neurones dopaminergiques si nous avons une mort de ces neurones ou bien si ceux-ci n'expriment simplement plus la TH (nous nous attendons dans ce cas-là à une augmentation du nombre de neurones n'exprimant pas la TH).

Une analyse de Kruskal-Wallis pour la comparaison entre les groupes du nombre de neurones dopaminergiques, des neurones n'exprimant pas la TH et la somme des deux a montré une

différence significative (respectivement $H=12,9$ et $p<0,05$ – $H=6,4$ et $p<0,05$ – $H=12$ et $p<0,05$, $df=2$).

Nous retrouvons une diminution de 29,5% du nombre de neurones dopaminergiques (TH) caractéristique du modèle PLP-syn (**Figure 19 B**) en comparaison avec les souris WT (**Figure 19 A**) ($p<0,005$ post-hoc test de Dunn, **Figure 19 D**). Il n'y a pas de différences significatives du nombre de neurones Nissl positifs entre les groupes (**Figure 19 E**). Si les souris PLP-syn traitées avec la rapamycine (**Figure 19 C**) ne présentent pas une augmentation significative du nombre de neurones TH positifs en comparaison aux PLP-syn ayant reçu la nourriture normale, elles n'ont pas un nombre de neurones dopaminergiques significativement différent en comparaison au groupe WT ayant reçu la nourriture normale (**Figure 19 D**), bien que la valeur p soit très proche de montrer une diminution ($p=0,0502$). Nous retrouvons ce cas de figure dans le cas de l'addition des neurones TH positifs et Nissl positifs avec en revanche une valeur p bien plus franche ne montrant pas de différence significative entre le groupe WT ayant reçu la nourriture normale et le groupe PLP-syn traité à la rapamycine ($p=0,15$) (**Figure 19 F**).

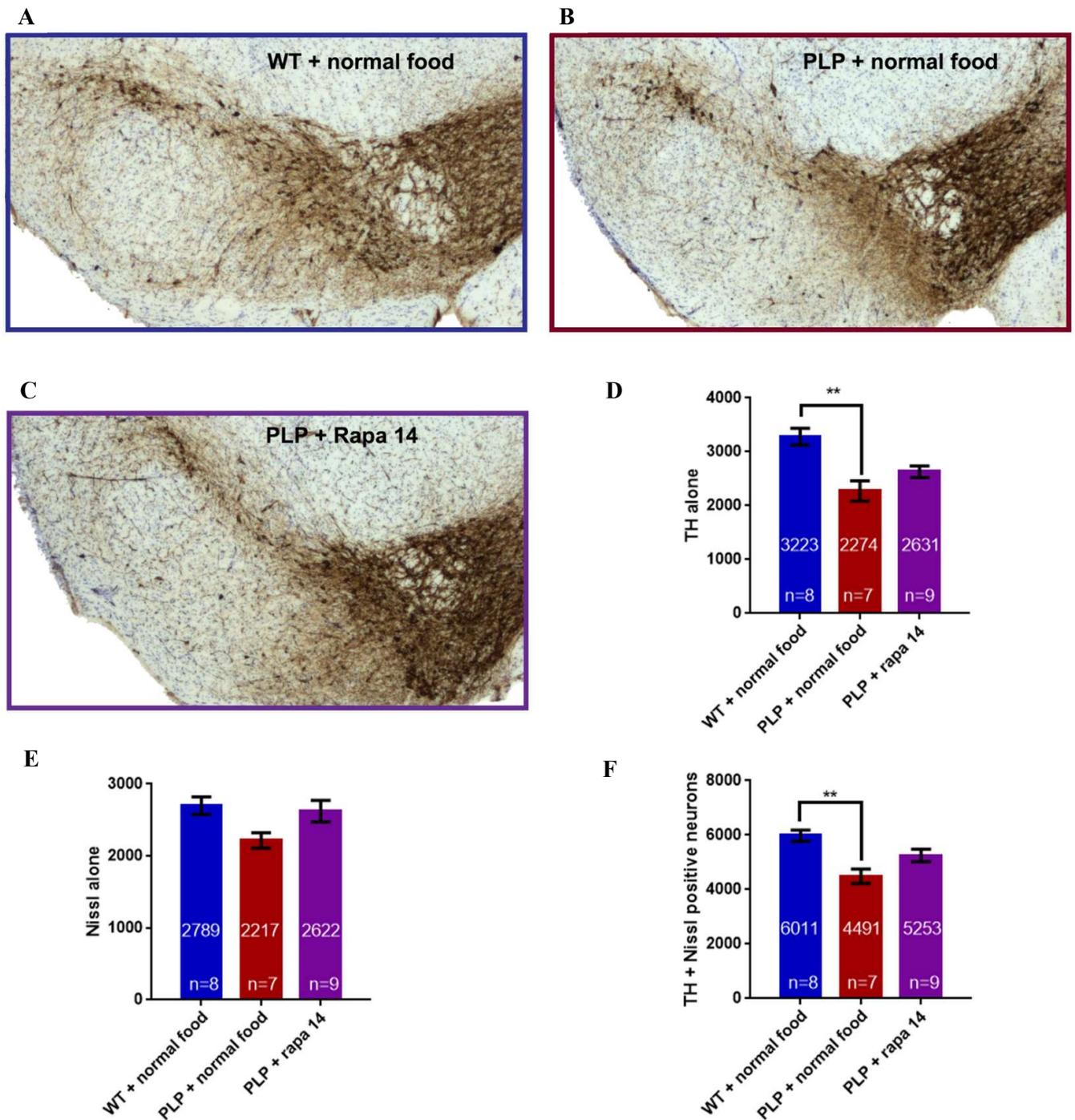


Figure 19 : Illustration et comptage des neurones de la SNc

Marquage des neurones dopaminergiques TH et contre coloration au crésyl violet des noyaux cellulaires (coupes flottantes de souris 40µm, images prise en zoom x5) chez le groupe WT + nourriture standard (A), PLP-syn + nourriture standard (B) et PLP-syn + rapamycine 14mg/kg (C).

Résultats des comptages stéréologiques des neurones TH (D), Nissl (E) et de la somme des deux (F). Les barres d'erreurs sont représentées en SEM. **p<0,01, analyse de Kruskal Wallis et post-hoc test de Dunn.

La rapamycine induit une diminution des formes agrégées de l' α -syn dans le striatum des souris PLP-syn

Les coupes de striatum des souris PLP-syn ont été traitées de manière à éliminer les formes d' α -syn non résistantes à la protéinase K. Le nombre de cellules positives à l' α -syn a été compté en microscopie à fluorescence. En comparaison des souris ayant reçu la nourriture normale (**Figure 20 A**), les souris PLP-syn traitées à la rapamycine (**Figure 20 B**) présentent moins de cellules positives à l' α -syn après traitement à la protéinase K (-32,1% en moyenne, test de Mann Whitney, $p < 0,05$, **Figure 20 C**).

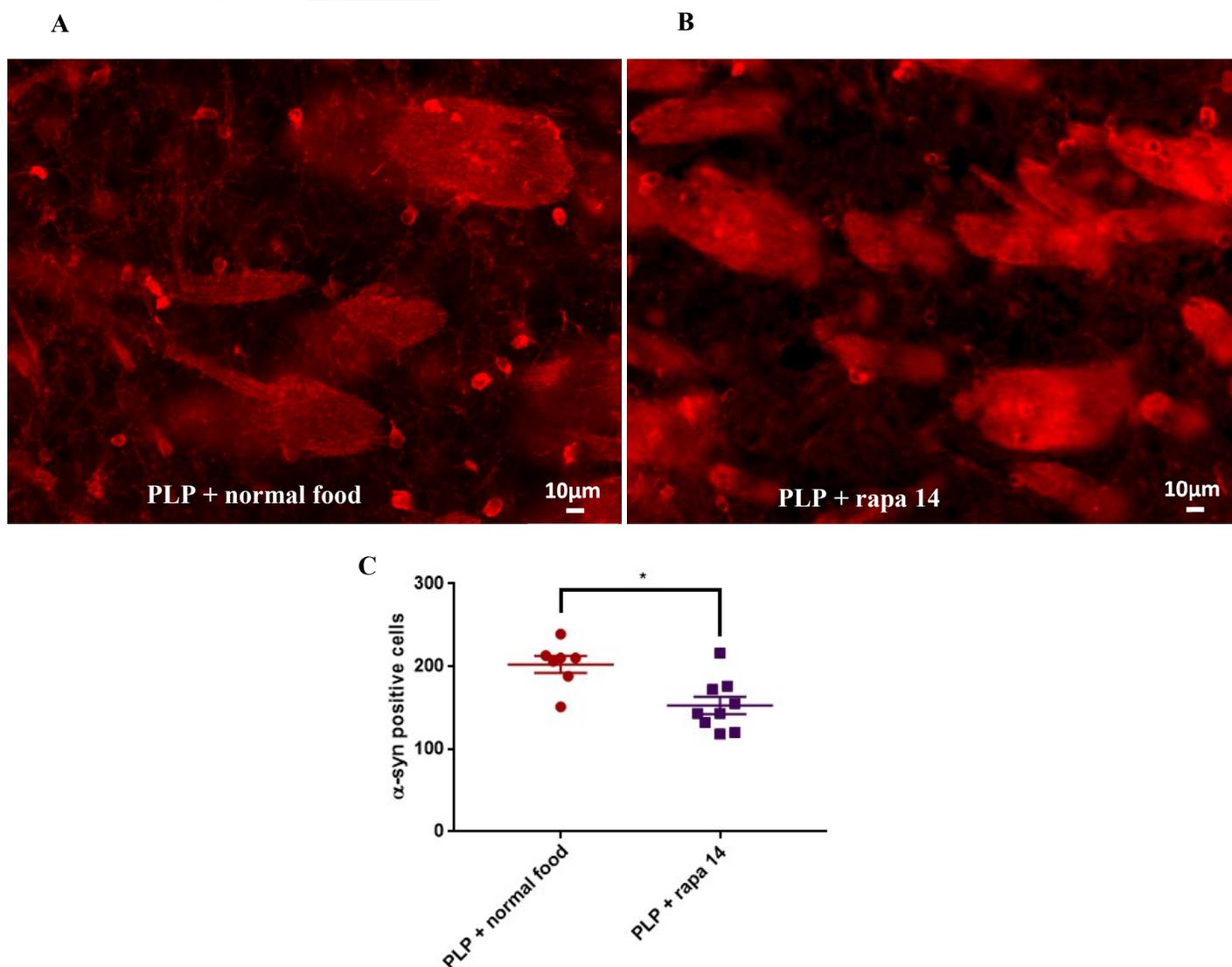


Figure 20 : Illustration et comptage des cellules positives à l' α -syn dans le striatum des souris PLP-syn après traitement à la protéinase K

Marquage en fluorescence de l' α -syn sur des coupes striatales de souris PLP-syn ayant reçu la nourriture standard (A) ou la rapamycine (B). Coupes flottantes de 40 μ m préalablement traitées à la protéinase K (10 μ g/ml dans du PBS, 10 min à température ambiante), images prise en zoom x20. Résultat des comptages des cellules positives à l' α -syn (C) dans 6 zones d'une coupe de striatum médian/animal en zoom x20. Les barres d'erreurs sont représentées en SEM, PLP + nourriture standard (n=7) et PLP + rapa 14 (n=9). * $p < 0,05$, test de Mann Whitney.

La rapamycine ne modifie pas les niveaux d' α -syn monomérique chez la souris PLP-syn

Les niveaux d' α -syn monomérique ont été mesurés en Western Blot et normalisés avec l'actine (**Figure 21 A**). L'intensité des bandes a été comparé au groupe PLP-syn + nourriture normale.

Il n'y a pas de différence significative entre le groupe PLP-syn + nourriture normale et le groupe PLP-syn + rapa 14 (test de Mann Whitney, **Figure 21 B**).

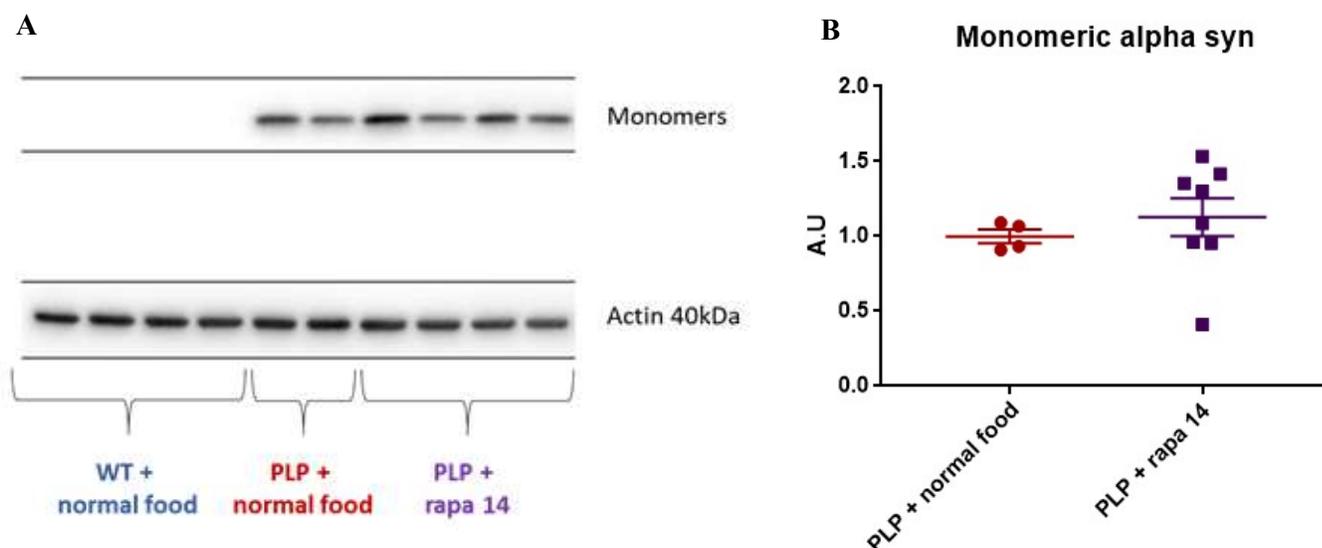


Figure 21 : Mesures par Western Blot de l' α -syn monomérique dans l'étude rapamycine

Image représentative des niveaux de protéines striatales des souris PLP-syn et des souris WT (A). Mesures des niveaux d' α -syn monomérique (B), des formes de haut poids moléculaire (C) et de la p70S6K (D). Les mesures sont en unités arbitraires (A.U) et les niveaux sont normalisés par rapport à un groupe de référence qui est le groupe PLP-syn + nourriture normale pour les mesures d' α -syn et le groupe WT + nourriture normale pour la p70S6K. Les barres d'erreurs sont représentées en SEM, WT + nourriture normale (n=7), PLP + nourriture normale (n=4), PLP + rapa 14 (n=8). **p<0,01, analyse de Mann Whitney pour les mesures d' α -syn et de Kruskal-Wallis pour la p70S6K.

En résumé : Les niveaux de mTOR sont fortement diminués dans le striatum des patients AMS (95%) en comparaison aux sujets contrôles. En revanche, le marqueur des autophagosomes LC3-II est 8,1 fois plus élevée chez les patients AMS et la kinase p70S6 est hyperphosphorylée en Thr388, indiquant une activation accrue, ne passant probablement pas par mTOR.

La rapamycine ne modifie pas le comportement moteur des PLP-syn qui ne montrent pas d'altérations motrices 4 mois après le début de la diète en comparaison au groupe WT.

Le groupe PLP-syn ayant reçu la nourriture normale présente une dégénérescence caractéristique des neurones dopaminergiques de la SNc (-29,5%) en comparaison au groupe WT ayant reçu la nourriture normale. Pour le groupe PLP-syn traité avec la rapamycine, il n'y a pas de différence significative du nombre de neurones dopaminergiques en comparaison avec le groupe PLP-syn + nourriture standard, mais il n'y a pas non plus de différence avec le groupe WT + nourriture standard.

La rapamycine n'induit pas de modification de la quantité d' α -syn monomérique dans le striatum des souris PLP-syn, mais provoque en revanche une diminution de 32% du nombre de cellules positives aux formes agrégées de l' α -syn.

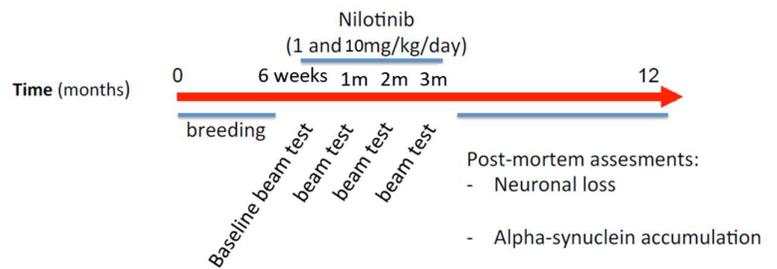
2) Nilotinib

Contexte : Le nilotinib est un inhibiteur de la tyrosine kinase cAbl utilisé pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique où une mutation induit la fusion pathologique de cAbl avec une autre protéine et dérégule son activité kinase (**Hantschel, 2012**). Il a été montré qu'il y a une augmentation de la forme active de cAbl dans le striatum et la SNc des patients atteints de la MP (**Imam et al., 2011, Ko et al., 2010**). Dans un modèle de souris surexprimant l' α -syn mutée au niveau de la SN, on retrouve une augmentation de la forme activée de cAbl. De plus, l'inhibition de cAbl par le nilotinib induit la dégradation de l' α -syn par la voie autophagique et diminue la mort des neurones dopaminergiques de la SNc dans ce modèle (**Hebron et al., 2013**). L' α -syn est un substrat de cAbl qui catalyse sa phosphorylation au niveau de la tyrosine 39 (retrouvée dans la MP), ce qui potentialiserait son agrégation (**Brahmachari et al., 2016**). Une première étude clinique ouverte chez 12 patients atteints de la MP ou de la DCL, montre un potentiel effet sur l'inactivation (phosphorylation) de la cAbl, mais l'effet sur les signes cliniques reste inconnu (**Pagan et al., 2016**).

Pour cette étude, nous avons déterminé si l'administration journalière de nilotinib par injection intrapéritonéale pendant 3 mois pouvait diminuer l'agrégation de l' α -syn dans le modèle PLP-syn et atténuer la neurodégénérescence de la SNc.

Plan de l'étude:

- Souris wild type C57BL6 + placebo (n=9)
- Souris PLP-SYN + placebo (n=8)
- Souris PLP-SYN + nilotinib (1mg/kg) (n=8)
- Souris PLP-SYN + nilotinib (10mg/kg) (n=9)



Nous avons administré le nilotinib par injection intrapéritonéale chez les souris PLP-syn à 6 semaines de vie, à une dose de 10mg/kg/jour, selon la publication précédente sur le modèle de souris de la MP (**Hebron et al., 2013**), ainsi qu'une dose plus faible de 1mg/kg/jour afin de déterminer si l'effet dépend de la concentration. Le nilotinib a été dilué dans une solution constituée à 90% de DMSO et 10% d'eau distillée aux concentrations voulues et injecté tous les jours sur une période de 3 mois (volume de 50µL/souris, la dose était ajustée selon la moyenne du poids de chaque groupe chaque semaine). Les groupes placebos ont reçu une injection quotidienne de la solution de DMSO-eau distillée. Le comportement moteur a été analysé par le test de traversée d'une poutre (**voir matériel et méthodes p72**) avant le début du traitement (baseline), puis après chaque mois de traitement.

Les animaux ont ensuite été euthanasiés par injection létale de pentobarbital sodique ; après perfusion cardiaque de solution saline, une moitié du cerveau a été utilisé pour la partie immunohistochimie (analyse de la dégénérescence des neurones de la SNc et analyse de l'accumulation de l' α -syn) et l'autre pour la partie biochimie (Western Blot de l' α -syn et cAbl).

Le nilotinib n'entraîne pas de modification du comportement moteur

La comparaison entre les groupes par two-way Anova n'est pas significative à un temps donné (baseline, un mois, deux mois, trois mois) ; il n'y a donc pas de différence comportementale, que ce soit entre les groupes ayant reçu le placebo (WT vs PLP-syn) ou entre les groupes ayant reçu le placebo et les groupes PLP-syn ayant reçu le nilotinib pendant 3 mois (**Figure 22**).

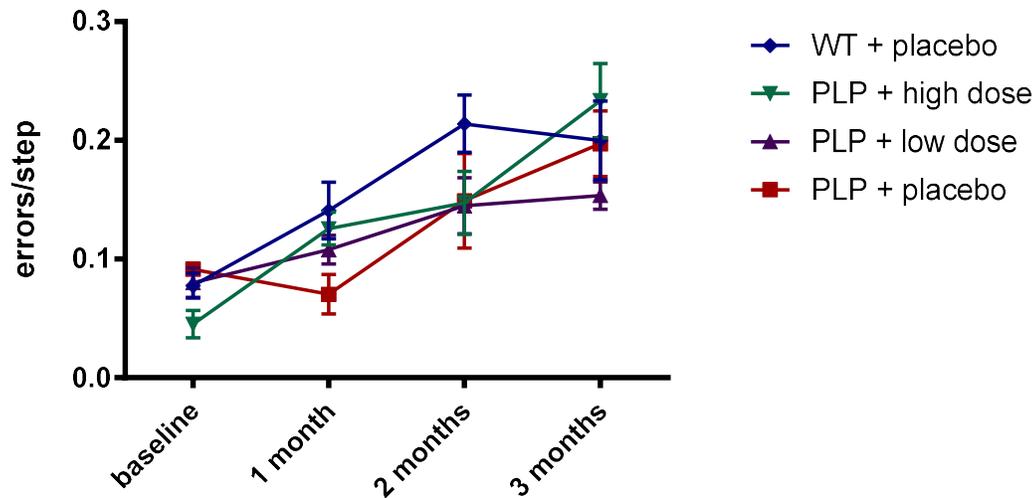


Figure 22 : Analyse du comportement moteur du test d'une traversée d'une poutre des souris PLP-syn et WT traitées ou non avec le nilotinib

Les enregistrements ont été faits avant le début (baseline) et un, deux et trois mois après le début du traitement. L'analyse a été effectuée en two-way Anova.

Le nilotinib n'a pas d'effet sur la dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la SNc

Une one-way Anova pour la comparaison entre les groupes du nombre de neurones dopaminergiques, des neurones n'exprimant pas la TH et la somme des deux a montré une différence significative entre les groupes (respectivement $F(3,30)=7$, $p<0,005$ – $F(3,30)=3$, $p<0,05$ – $F(3,30)=10$, $p=0,0001$).

Nous notons une diminution attendue de 24,6% du nombre de neurones dopaminergiques (TH) chez les souris PLP-syn + placebo (**Figure 23 A**) en comparaison aux souris WT + placebo (**Figure 23 B**) ($p<0,05$ test post-hoc de Bonferroni, **Figure 23 E**). L'administration de nilotinib à la dose 1mg/kg (**Figure 23 C**) ou 10mg/kg (**Figure 23 D**) n'a pas d'effet sur cette dégénérescence (**Figure 23 E**), et ne montre donc pas d'effet neuroprotecteur (**Figure 23 G**).

Le groupe de souris PLP-syn ayant reçu une faible dose de nilotinib a montré une diminution significative de 30,4% du nombre de neurones Nissl positifs en comparaison au groupe WT ayant reçu le placebo ($p<0,05$, test post-hoc de Bonferroni, **Figure 23 F**).

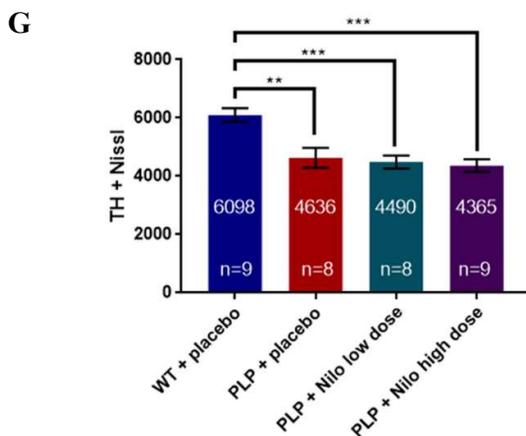
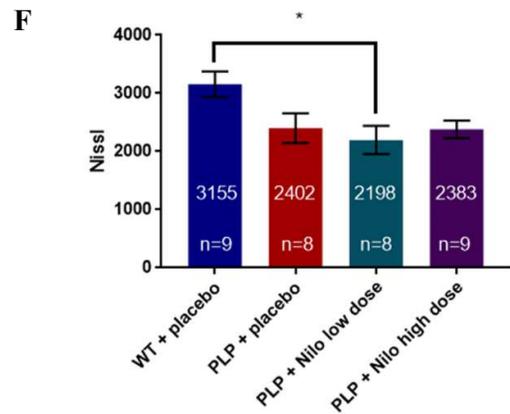
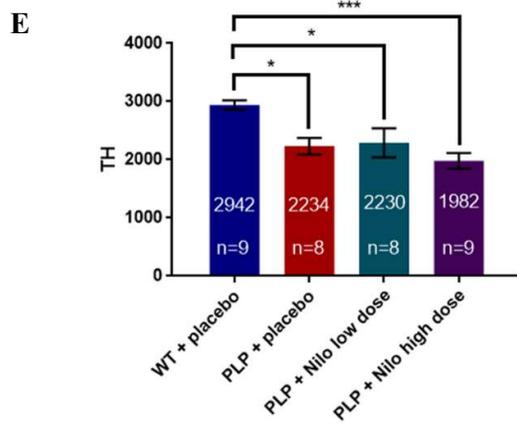
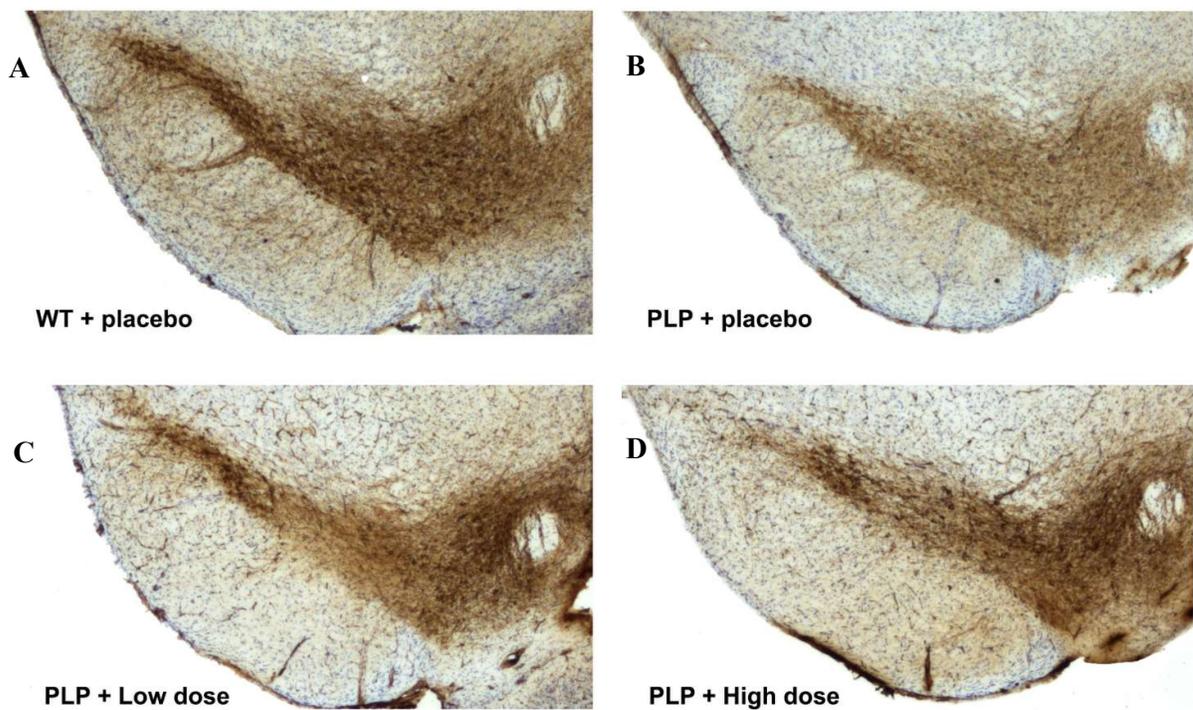


Figure 23 : Illustration et comptage des neurones de la SNc des souris de l'étude nilotinib

Marquage des neurones dopaminergiques TH et contre coloration au crésyl violet des noyaux cellulaires (coupes flottantes de souris 40µm, images prises en zoom x5) chez le groupe WT + placebo (A), PLP-syn + placebo (B), PLP-syn + nilotinib dose 1mg/kg (C) et PLP-syn + nilotinib dose 10mg/kg (D).

Résultats des comptages stéréologiques des neurones TH (D), Nissl (E) et de la somme des deux (F). Les barres d'erreurs sont représentées en SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ One-way Anova.

Le nilotinib ne modifie pas le nombre de cellules présentant des formes agrégées de l' α -syn dans le striatum des souris PLP-syn

Les coupes de striatum des souris PLP-syn ont été traitées de manière à éliminer les formes d' α -syn non résistantes à la protéinase K. Le nombre de cellules positives à l' α -syn a été compté en microscopie à fluorescence.

En comparaison des souris ayant été traitées avec le placebo (**Figure 24 A**), les souris PLP-syn ayant reçu une dose journalière de 1mg/kg (**Figure 24 B**) ou 10mg/kg (**Figure 24 C**) ne présentent pas un nombre différent de cellules positives à l' α -syn après traitement à la protéinase K (one-way Anova, $F(2,22)=2,3$ et $p>0,1$, **Figure 24 D**).

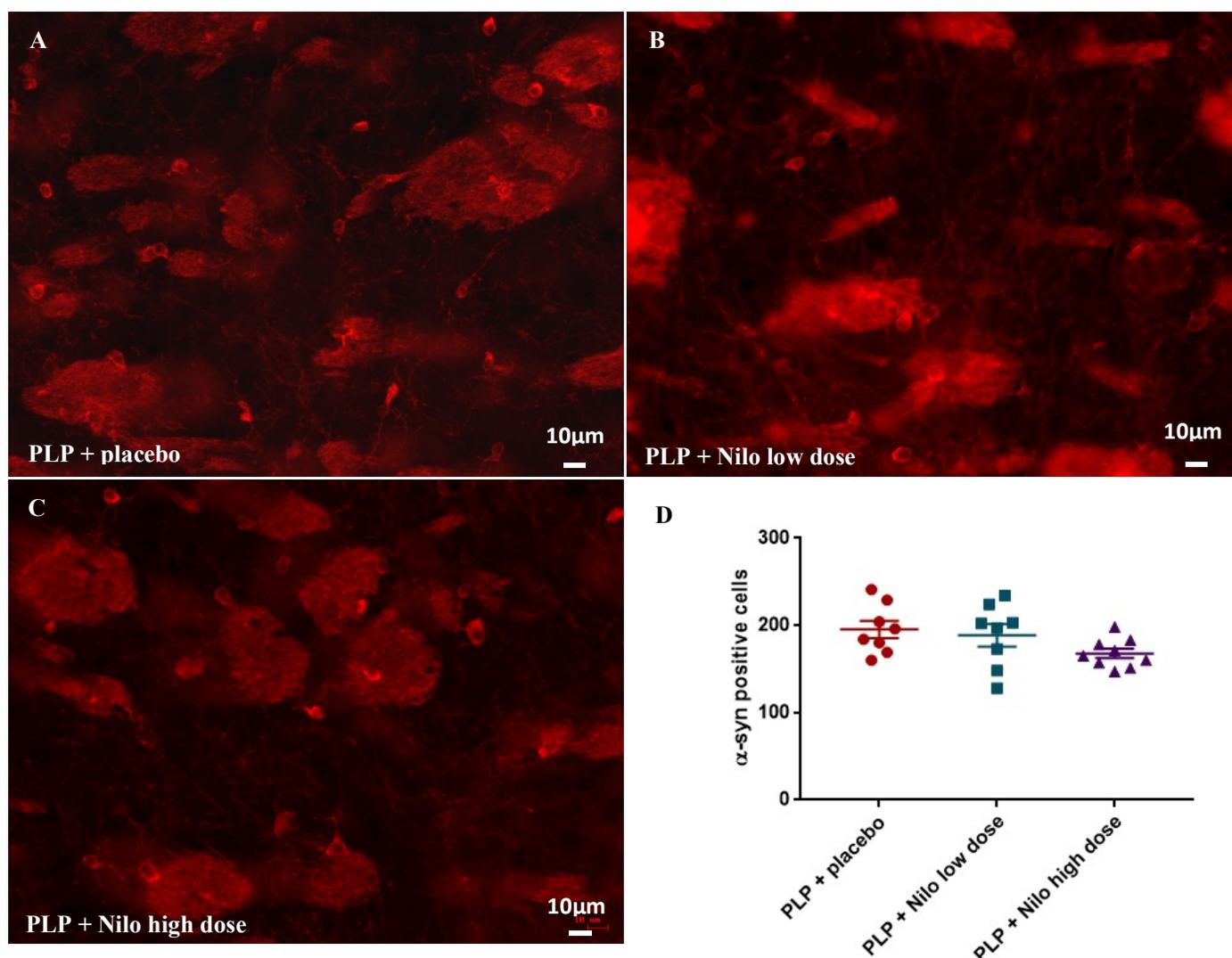


Figure 24 : Illustration et comptage des cellules positives à l' α -syn dans le striatum des souris PLP-syn après traitement à la protéinase K

Marquage en fluorescence de l' α -syn sur des coupes striatales de souris PLP-syn ayant reçu le placebo (A), une dose journalière de 1mg/kg de nilotinib (B) ou une dose journalière de 10mg/kg de nilotinib (C). Coupes flottantes de 40 μ m préalablement traitées à la protéinase K (10 μ g/ml dans du PBS, 10 min à température ambiante), images prise en zoom x20. Résultat des comptages des cellules positives à l' α -syn (D) dans 6 zones d'une coupe de striatum médian/animal en zoom x20. Les barres d'erreurs sont représentées en SEM, PLP + placebo (n=8) et PLP + nilotinib dose 1mg/kg (n=8) et PLP + nilotinib dose 10mg/kg (n=9). One-way Anova.

Analyse des niveaux d'α-syn monomérique et de cAbl dans le striatum des souris de l'étude nilotinib

Les niveaux des protéines ont été mesurés en Western Blot et normalisés avec l'actine. Les unités sont arbitraires (A.U) ; l'intensité des bandes est comparée à un groupe contrôle (le groupe PLP-syn + placebo dans le cas des mesures de l'α-syn et du groupe WT + placebo pour la cAbl).

L'analyse de Kruskal Wallis montre une différence significative entre les groupes en ce qui concerne les niveaux d'α-syn monomérique ($H=1,4$ et $p<0,05$, $df=2$). Les niveaux d'α-syn monomérique (**Figure 25 A**) sont réduits de 24,8% (test post hoc de Bonferroni, $p<0,05$) pour le groupe PLP-syn traité avec la plus forte dose de nilotinib en comparaison au groupe PLP-syn ayant reçu le placebo (**Figure 25 B**). Il n'y a pas de différence significative entre le groupe PLP-syn ayant reçu une faible dose de nilotinib et les autres groupes.

En ce qui concerne les niveaux de cAbl, une comparaison en one way Anova a montré une différence significative entre les trois groupes ($F(3,27)=3$, $p<0,05$, **Figure 25 C**). Il y a une diminution significative de quantité de cAbl totale pour le groupe PLP-syn ayant été traité avec des doses de 10mg/kg/jour de nilotinib en comparaison au groupe PLP-syn ayant reçu le placebo (-52%, $p<0,05$).

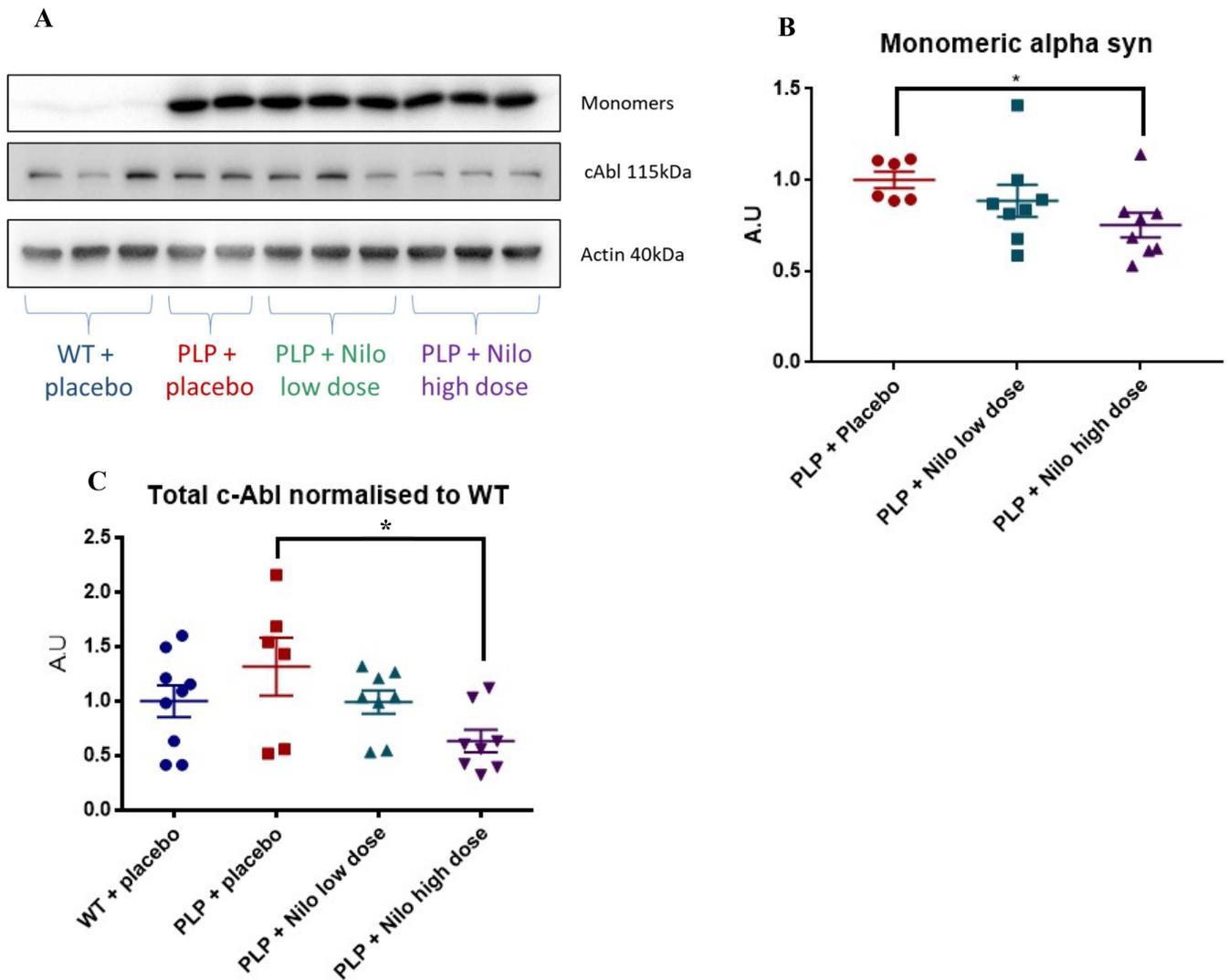


Figure 25 : Mesures par Western Blot des niveaux de la protéine cAbl et l' α -syn monomérique dans l'étude nilotinib

Image représentative des niveaux de protéines striatales des souris PLP-syn et des souris WT (A). Mesures des niveaux de l' α -syn monomérique (B) et de cAbl (C) ; les mesures sont en unités arbitraires (A.U) et les niveaux sont normalisés par rapport au groupe WT + placebo et l'actine. Les barres d'erreurs sont représentées en SEM, WT + placebo (n=9), PLP + placebo (n=6), PLP + nilotinib dose 1mg/kg (n=8) et PLP + nilotinib dose 10mg/kg (n=8). Analyse de Kruskal-Wallis pour l' α -syn monomérique et one-way Anova pour la cAbl, *p<0,05

En résumé : Les souris PLP-syn ne présentent pas de modification du comportement moteur en comparaison aux souris WT durant les trois mois de traitements. L'injection journalière de nilotinib à une dose de 1mg/kg et de 10mg/kg n'a pas d'effet sur le comportement moteur, n'a pas d'effet neuroprotecteur sur la dégénérescence des neurones dopaminergiques retrouvée dans la SNc du modèle PLP-syn et ne modifie pas le nombre de cellules striatales positives à l' α -syn agrégée. Les niveaux d' α -syn monomérique sont diminués de 24% dans le groupe de souris PLP-syn ayant été traitées avec une dose journalière de nilotinib de 10mg/kg en comparaison au groupe PLP-syn ayant reçu le placebo. De plus ce même groupe présente une diminution de la quantité totale de cAbl de 52% en comparaison au groupe PLP-syn ayant reçu le placebo.

3) GRK2

Contexte : L'insuline présente des propriétés neuroprotectrices, et nous retrouvons dans la MP et d'autres maladies neurodégénératives une inhibition de la sensibilité de sa voie de signalisation intracellulaire qualifiée de résistance à l'insuline. Cette résistance à l'insuline est également mesurable dans l'AMS (par la phosphorylation inhibitrice de la protéine IRS-1 en position sérine 312) au niveau des neurones et des oligodendrocytes des patients et du striatum du modèle PLP-syn, où elle peut être diminuée grâce à un traitement activant cette même voie, ce qui préserve les neurones dopaminergiques de la SNc (**voir Introduction, 1.4, f**).

Les GRKs, pour G protein coupled kinases, sont une famille d'enzymes connues pour réguler de multiples récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) qui sont des senseurs membranaires ayant d'importants rôles physiologiques. Lors de l'interaction des GPCRs avec leurs substrats, leur domaine intracellulaire est phosphorylé par les GRKs, provoquant le recrutement de β -arrestines entraînant l'inactivation des récepteurs (**Premont and Gainetdinov, 2007, DeWire et al., 2007**).

En plus de son effet sur les GPCR, GRK2 phosphoryle et inhibe la protéine IRS-1 en Ser307 (équivalent souris de la Ser312 chez l'homme) in-vitro, induisant une résistance à l'insuline (**Ciccarelli et al., 2011**), voir **Figure 26** d'après (**Mayor et al., 2011**).

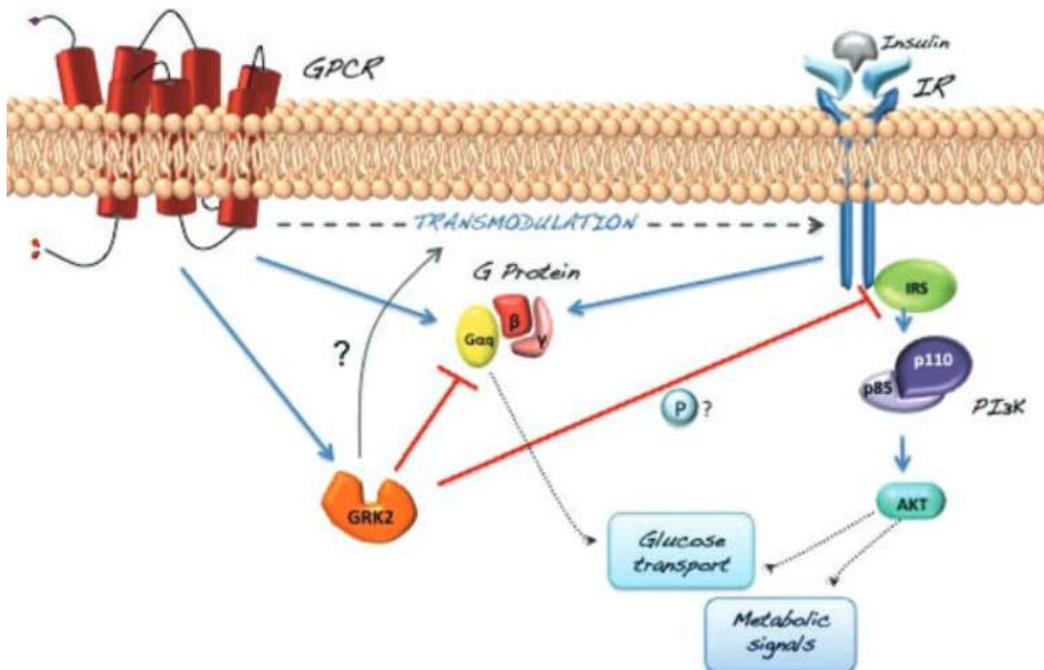


Figure 26 :

G Protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2): A novel modulator of insulin resistance

Mayor et al. 2011

GRK2 est surexprimée dans des conditions pathologiques chez les individus présentant un syndrome métabolique et chez les animaux modèles de diabète. Il a été montré que l'inhibition de la traduction de la protéine GRK2, ou son inhibition par un composé chimique in-vivo, in-vitro et ex-vivo entraîne une sensibilisation de la voie de signalisation de l'insuline (Usui et al., 2004, Taguchi et al., 2012, Vila-Bedmar et al., 2015, Mayor et al., 2018, Rengo et al., 2015).

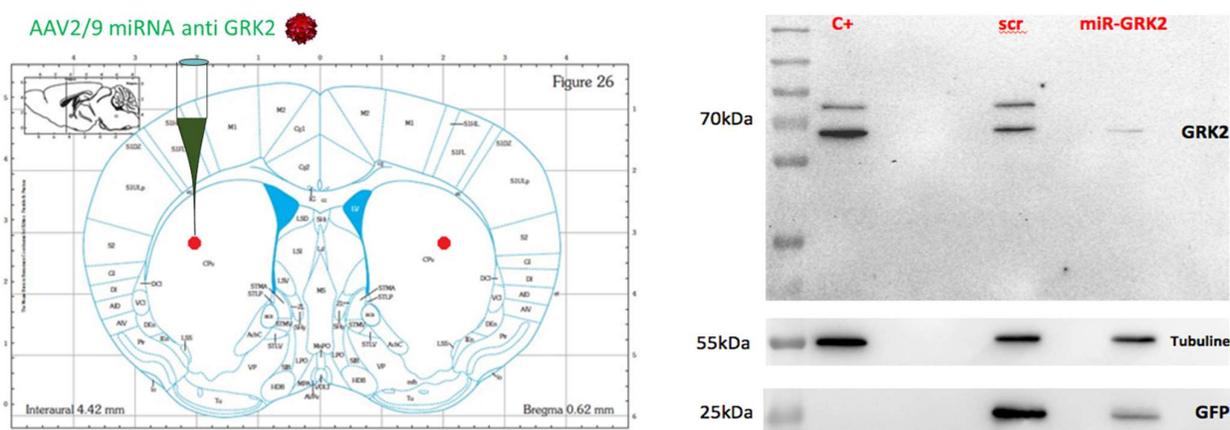
Pour ce projet, nous avons tout d'abord mesuré les niveaux de GRK2 dans diverses structures cérébrales de patients AMS par Western Blot. Dans un second temps, nous avons déterminé l'effet de la suppression génique de GRK2 par un micro ARN dans le modèle de souris PLP-syn sur la résistance à l'insuline cérébrale et sur la dégénérescence des neurones de la SNC.

Plan de l'étude:

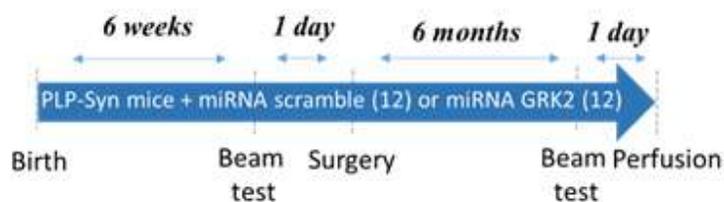
Dans un premier temps, nous avons déterminé par Western Blot s'il y avait une modification des niveaux de GRK2 dans le cortex frontal (en tant que contrôle), dans le putamen et dans le pont des patients AMS en comparaison à des sujets contrôles.

Des souris PLP-syn âgées de 6 semaines ont subi une injection stéréotaxique bilatérale au niveau du striatum dorsal induisant la diffusion d'un adénovirus (AAV2/9) transportant un vecteur permettant la surexpression du micro ARN dirigé contre GRK2 (miARN GRK2, n=12) ou du micro ARN ayant une séquence randomisée comme contrôle (miARN scramble, n=12). Les coordonnées d'injections sont, à partir du bregma et en mm: axe antéro postérieur +0,62, axe dorso ventral -3,25 (depuis l'os crânien), axe médial latéral +2. Le volume d'injection est de 2µL par hémisphère, les titres viraux étant supérieurs à 10¹³ genome containing particles.

Ces deux miARN sont sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire fort CMV et sont couplés à l'expression de la protéine GFP permettant de suivre la diffusion virale. Le miARN GRK2 a été testé in-vitro dans le laboratoire où il inhibe efficacement la synthèse de la protéine GRK2 (voir Western Blot ci-dessous, le C+ étant le groupe de cellules contrôle).



Le comportement moteur a été déterminé avec le test de traversée d'une poutre (voir matériel et méthodes) avant l'injection virale (baseline) puis 2, 3 et 6 mois post injection.



A 6 mois post traitement, les animaux ont été euthanasiés par injection létale de pentobarbital sodique et une moitié du cerveau a été utilisée pour la partie immunohistochimie (analyse de la dégénérescence des neurones de la SNc et analyse de la diffusion virale) et l'autre pour la partie biochimie (Western Blot de l' α -syn, de GRK2 et de IRS-1 p307 cible de la résistance à l'insuline).

Mesure de la protéine GRK2 dans le tissu cérébral de patients AMS

Les niveaux des protéines ont été mesurés en Western Blot et normalisés avec l'actine. Les unités sont arbitraires, les sujets AMS étant comparés aux sujets contrôles.

Dans le cortex frontal, les niveaux de GRK2 (**Figure 27 A**) sont 2,4 fois plus élevés chez les patients AMS que chez les sujets contrôles (test de Mann Whitney, $p < 0,05$, **Figure 27 B**). Nous observons un effet inverse dans le putamen (**Figure 27 C**) où les niveaux de GRK2 sont 84,7% plus faible chez les patients AMS en comparaison aux sujets contrôles (test de Mann Whitney, $p < 0,05$, **Figure 27 D**), tandis qu'il n'y a pas de différences significatives dans le pont (**Figure 27 E** et **Figure 27 F**).

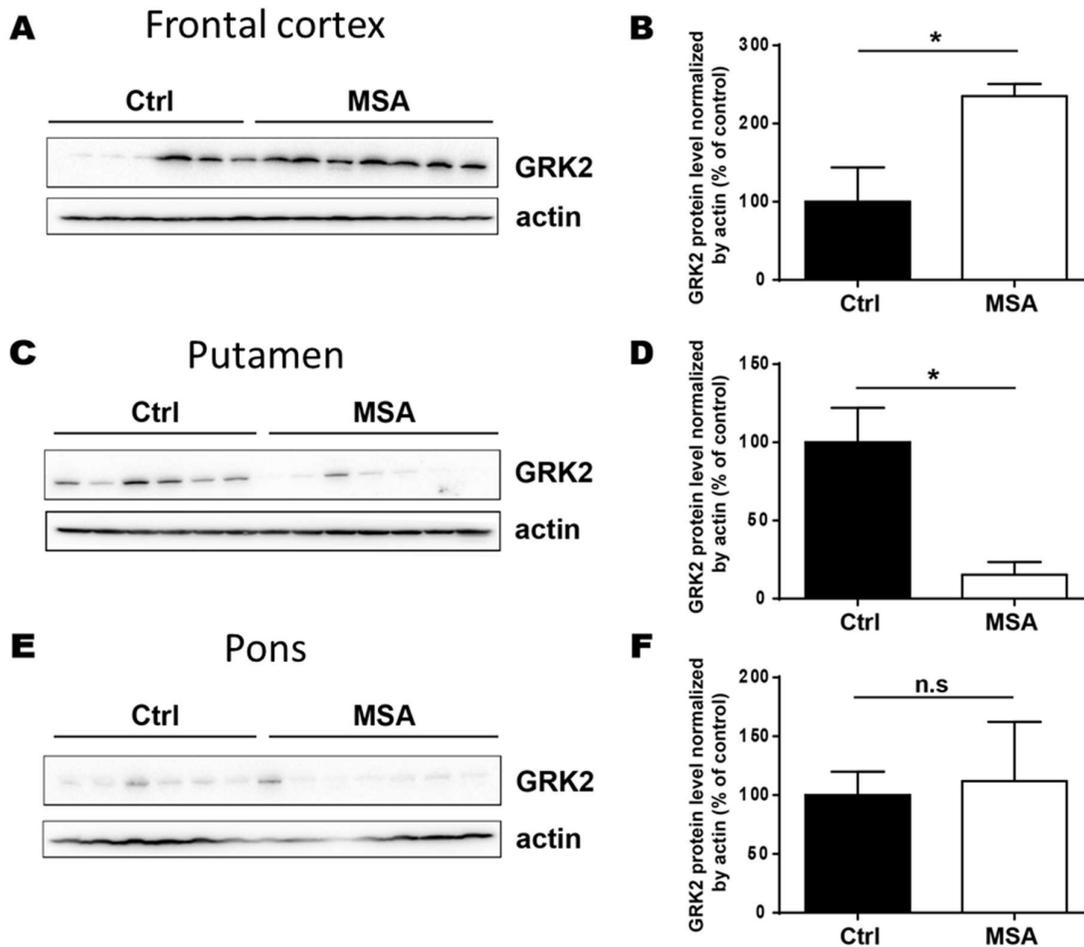


Figure 27 : Mesures par Western Blot des niveaux de la protéine GRK2 dans le tissu cérébral de patients AMS

Images représentatives et mesures des niveaux de GRK2 chez les patients AMS et les sujets contrôles en Western Blot dans le cortex frontal (A et B), le putamen (C et D) et le pont (E et F). Les mesures sont en unités arbitraires, les niveaux sont normalisés avec l'actine et exprimés en pourcentage en comparaison au groupe de sujets contrôles. Les barres d'erreurs sont représentées en SEM, sujets AMS (n=7) et sujets contrôles (n=6). *p<0,05, analyse de Mann Whitney.

Le comportement moteur n'est pas modifié par l'injection stéréotaxique du miARN GRK2

La comparaison entre les groupes par two-way Anova à un temps donné (baseline, 2 mois, 3 mois et 6 mois) n'est pas significative, il n'y a donc pas de différence comportementale entre les groupes de PLP-syn surexprimant le miRNA scramble ou GRK2 (**Figure 28**).

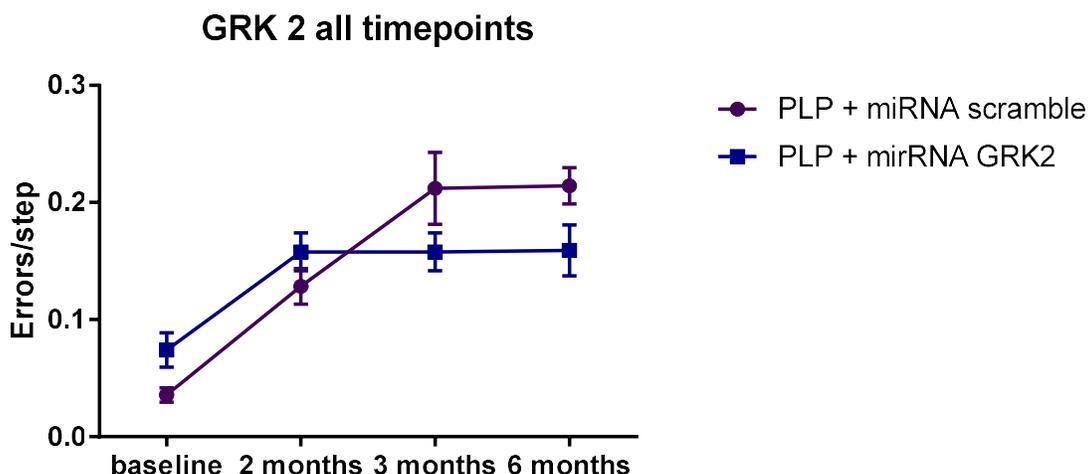


Figure 28 : Analyse du comportement moteur du test d'une traversée d'une poutre des souris PLP-syn ayant reçu le miRNA scramble ou le miARN GRK2

Les enregistrements ont été faits avant (baseline), deux, trois et six mois après l'injection stéréotaxique. L'analyse a été effectuée en two-way Anova.

La surexpression du miARN GRK2 dans le striatum chez la souris adulte PLP-syn entraîne une modification du nombre de neurones dopaminergiques

Le comptage stéréologique montre que les souris surexprimant localement le miARN GRK2 (**Figure 29 A**) présentent une augmentation du nombre de neurones TH positifs et de neurones n'exprimant pas la TH, respectivement +19,5% ($p < 0,05$, unpaired t-test, **Figure 29 B**) et +20,8% ($p < 0,05$ unpaired t-test, **Figure 29 C**), en comparaison avec les souris ayant reçu le miRNA scramble (**Figure 29 A**). La surexpression du miARN GRK2 striatale semble donc avoir un effet neuroprotecteur sur le modèle de souris PLP-syn (**Figure 29 D**).

A

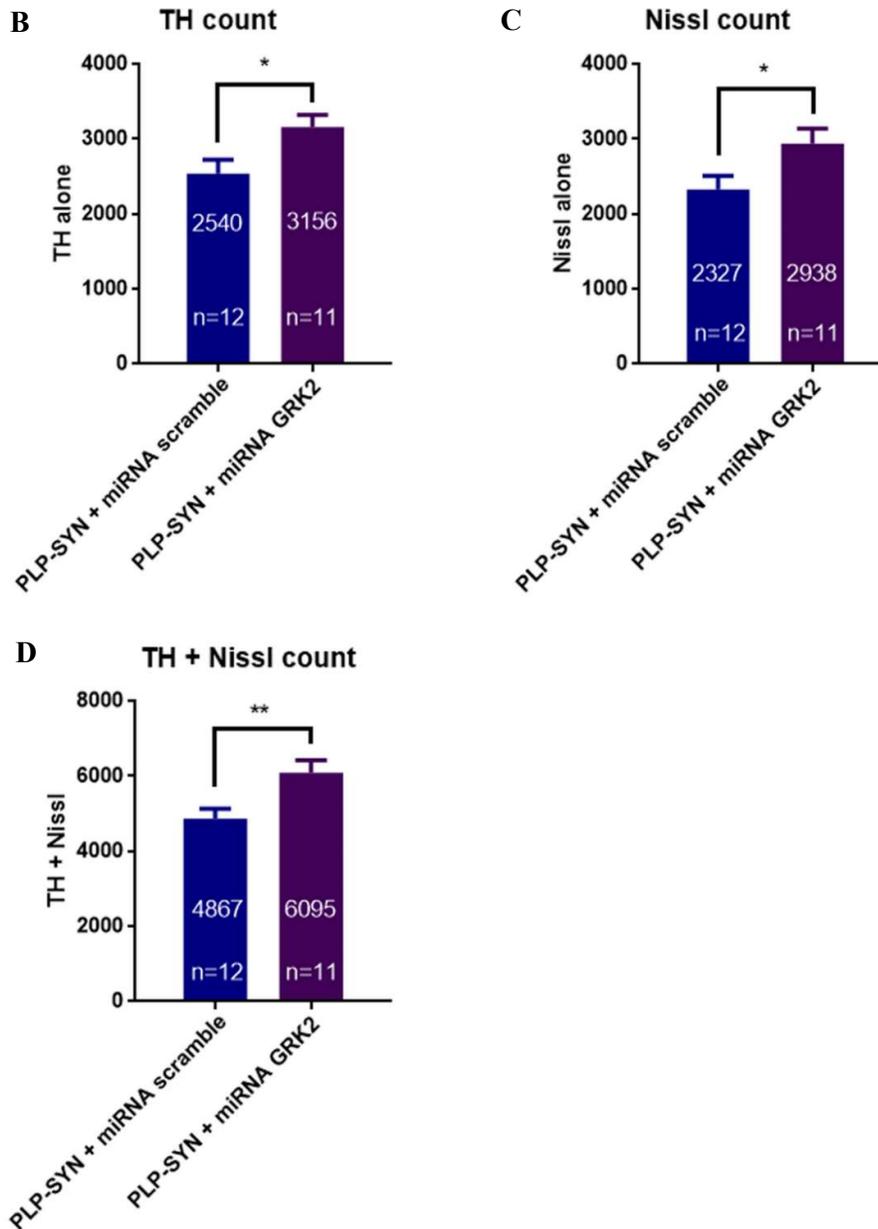
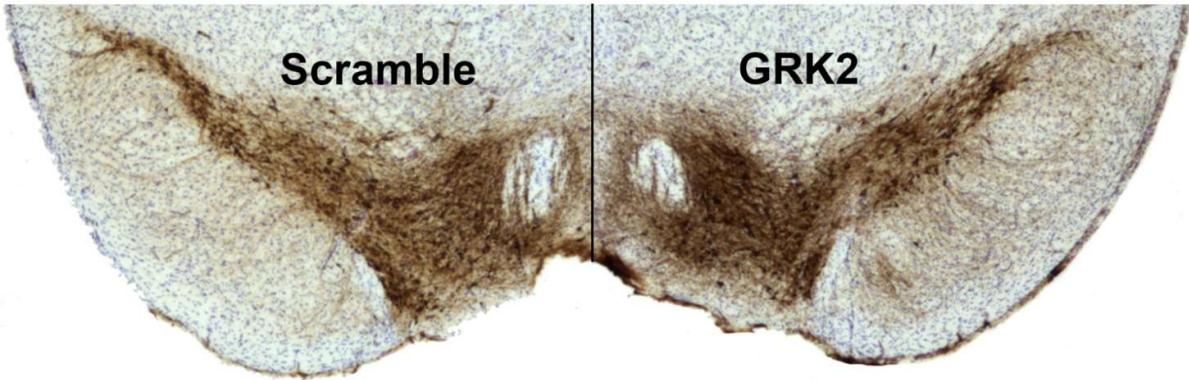


Figure 29 : Illustration et comptage des neurones de la SNc des souris de l'étude GRK2

Marquage des neurones dopaminergiques TH et contre coloration au crésyl violet des noyaux cellulaires (coupes flottantes de souris 40µm, images prises en zoom x5) chez le groupe PLP-syn + miARN scramble et PLP-syn + miARN GRK2 (A).

Résultats des comptages stéréologiques des neurones dopaminergiques (B), non dopaminergiques (C) et de la somme des deux (D). Les barres d'erreurs sont représentées en SEM. *p<0,05, **p<0,01, unpaired t-test.

Mesure de la surface de propagation virale dans le striatum des souris ayant reçu le miARN GRK2

Le vecteur viral coexprime la protéine fluorescente GFP avec les différents miARN, nous permettant de visualiser et mesurer la propagation virale dans le striatum des souris PLP-syn en microscopie par fluorescence. Une série de striatum a été utilisée par animal (7 à 8 coupes, **Figure 30**) et la surface marquée par la GFP dans le striatum a été comparé à la surface totale du striatum donnant un pourcentage de propagation. Le virus est exprimé en moyenne dans 48,4% du striatum.

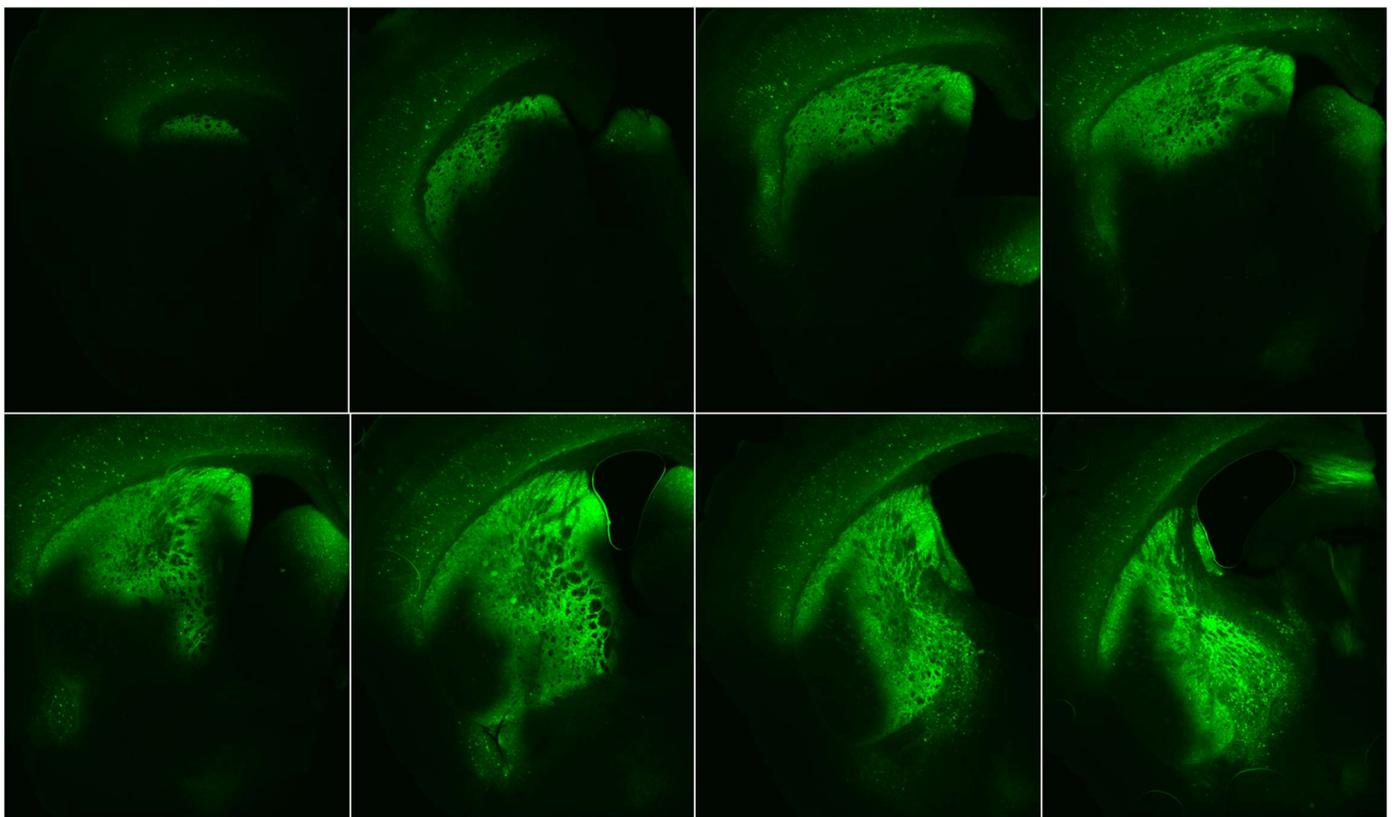


Figure 30 : Illustration de la surface de propagation virale dans le striatum des souris ayant reçu le miARN GRK2

Les images ont été capturés en microscopie à fluorescence en prises multiples (mosaïque) à l'objectif x5 et sont ici arrangées dans le sens caudo-rostral.

Mesure des niveaux de GRK2, IRS-1pS307 et de l' α -syn monomérique des souris PLP-syn du projet GRK2

Les niveaux de protéines mesurés en Western Blot ont été normalisés avec l'actine. Les résultats sont arbitraires (A.U) et l'intensité des bandes est rapportée au groupe contrôle PLP-syn + miARN scramble.

La mesure des niveaux de GRK2 dans le striatum montre une diminution de 21% de la quantité de la protéine pour le groupe PLP-syn + miARN GRK2 en comparaison au groupe PLP-syn + miARN scramble (unpaired t-test, $p < 0,05$, **Figure 31 A et D**). Les niveaux de la forme phosphorylée d'IRS-1pS307 sont également diminués de 37% dans ce groupe (test de Mann Whitney, $p < 0,05$, **Figure 31 B et E**). En ce qui concerne les niveaux d' α -syn monomérique, il n'y a pas de différence entre les groupes (**Figure 31 C et F**).

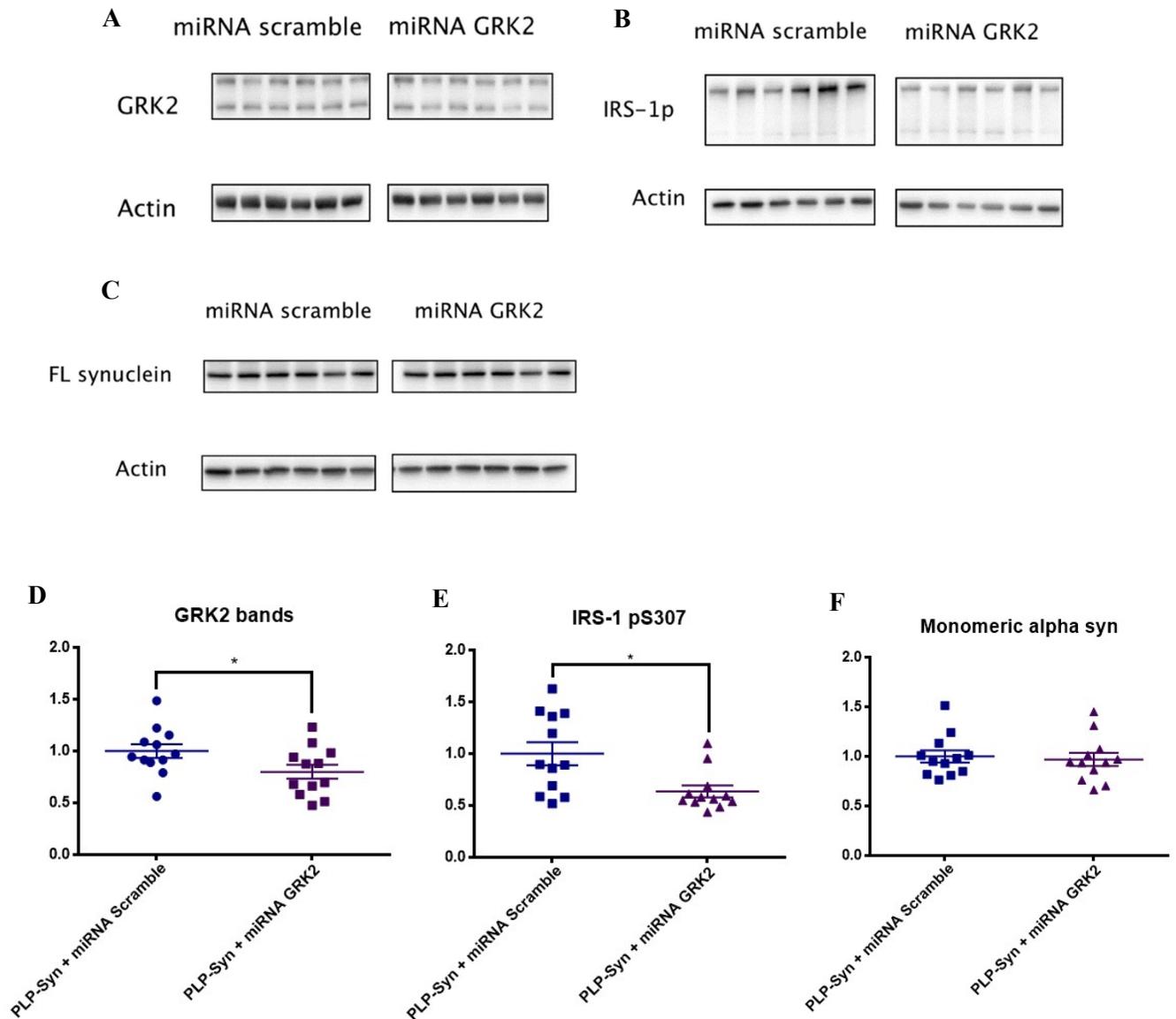


Figure 31 : Mesures par Western Blot de la GRK2, la phosphorylation de la protéine IRS-1 en Ser307 et l' α -syn monomérique dans les

Image représentative des niveaux de GRK2 (A), phospho IRS-1 en serine 307 (B) et de l' α -syn monomérique (C) des souris PLP-Syn ayant reçu le miARN GRK2 ou le miARN scramble. Mesures des niveaux de la protéine GRK2 (D), de la pIRS-1 S307 (E) et de synucléine monomérique (F). Les mesures sont en unités arbitraires (A.U) et les niveaux sont normalisés par rapport à un groupe de référence qui est le groupe PLP-Syn + miARN scramble. Les barres d'erreurs sont représentées en SEM, PLP-Syn + miARN scramble (n=12) et PLP-syn + miARN GRK2 (n=12). *p<0,05, test de Mann Whitney dans le cas d'une distribution ne passant pas le test de normalité (c'est le cas pour IRS-1-pS307) et t-test non paramétrique dans le cas d'une distribution normale.

En résumé : Les niveaux de GRK2 sont augmentés dans le cortex frontal (2,3 fois), fortement diminués dans le putamen (84% de moins) et inchangés dans le pons des patients AMS en comparaison aux sujets contrôles.

Nous n'avons pas montré de dysfonction motrice par le test de traversé d'une poutre entre le groupe PLP-syn ayant reçu le miARN dirigé contre le GRK2 et le groupe ayant reçu le miARN scramble avec un suivi sur 6 mois post-injection. Les animaux PLP-syn injectés avec le miARN GRK2 présentent un nombre de neurones TH et de neurones Nissl positifs significativement plus élevé que le groupe ayant reçu le miARN scramble (respectivement +19% et +20%). Le miARN GRK couplé à l'expression de la GFP est exprimé dans 48% du striatum suite à l'injection et la propagation du virus. Les niveaux de GRK2 sont réduits de 21% suite à l'expression striatale du miARN GRK2 et il n'y a pas de modification de la quantité d' α -syn monomérique dans le striatum entre les groupes.

Partie 3 : Recherche de potentiels biomarqueurs de l'AMS

Contexte : Comme nous avons pu le voir dans la partie dédiée à la présentation clinique, l'AMS est une maladie neurodégénérative rare. Il existe des traitements symptomatiques mais aucun ne permet de ralentir la progression de l'AMS. Son diagnostic repose sur la présence variable d'un syndrome parkinsonien, d'un syndrome cérébelleux et d'une dysautonomie. Le diagnostic, notamment de l'AMS-P par rapport à la MP, peut être un défi dans les stades précoces, sachant que le pronostic des deux pathologies est très différent. A ce jour, aucun biomarqueur n'est validé pour le diagnostic ou le pronostic de l'AMS, limitant également les possibilités de suivi objectif de l'efficacité de possibles traitements neuroprotecteurs dans des essais cliniques.

De par son importance dans l'AMS, l' α -syn a été mesurée dans le plasma et le liquide céphalo-rachidien (LCR) dans plusieurs études. La majorité de ces études ont conclu à une diminution des niveaux d' α -syn dans le LCR chez les patients AMS comparé aux patients contrôle dans le (voir **Tableau 7 A** d'après **(Laurens et al., 2015)**). Des acteurs du système ubiquitine-protéasome, qui est altéré dans l'AMS, ont également été mesurés. A cet égard l'ubiquitine hydrolase carboxy-terminale L1 (UCH-L1) est diminuée dans le LCR des patients AMS **(Mondello et al., 2014)**. Des marqueurs de la dégénérescence cellulaire comme la protéine tau, impliquée dans l'assemblage des microtubules et qui a un rôle important dans le transport axonal et la croissance des neurites, ont donnés des résultats variables (voir **Tableau 7 B**, d'après **(Laurens et al., 2015)**). Le dosage de la chaîne légère du neurofilament (NfL), un élément structurel majeur des neurones et marqueur de la dégénérescence axonale, a montré des résultats prometteurs dans plusieurs études où il est systématiquement augmenté dans le LCR (voir **Tableau 7 C**, d'après **(Laurens et al., 2015)**). Par ailleurs, une étude a montré une augmentation des niveaux d'insuline dans le sérum des patients AMS comparé à un groupe témoin **(Pellecchia et al., 2010)**.

A/ α -Syn

Study	Assay	Subjects (n=)	Concentration in MSA patients in ng/ml	MSA vs. controls / concentration in controls in ng/ml	
Lee et al., 2006	ELISA	Plasma	MSA=38; PD=105; controls=51	0.078±0.004	↑ / 0.076±0.004
Mollenhauer et al., 2011	ELISA	CSF	Discovery cohort: MSA=29; PD=51; controls=76	1.24 (0.69-6.18)	↓ / 1.73 (0.46-7.42)
			Validation cohort: MSA=15; PD=273; controls=23	1.11 (0.23-2.00)	↓ / 2.22 (0.95-6.07)
	ELISA	Plasma	MSA=15; PD=273; controls=23	10.5 (4.4-19.0)	↔ / 12.6 (6.2-36.2)
Wang et al., 2012	BBMA	CSF	Discovery cohort: MSA=16; PD=93; controls=78	0.33±0.12	↓ / 0.52±0.13
			Validation cohort: MSA=25; PD=116; controls=126	0.32±0.12	↓ / 0.49±0.18
Shi et al., 2011	BBMA	CSF	MSA=32 (>50 years=28; >50 years+Hb<200=20) PD=126 (>50 years=117; >50 years+Hb<200=86) controls=137 (>50 years=105; >50 years+Hb<200=92)	0.30±0.09	↓ / age > 50 years=0.49±0.17
Tateno et al., 2012	ELISA	CSF	MSA=11; PD=11; controls=11	0.11±0.07	↔ / 0.14±0.03
Hall et al., 2012	BBMA	CSF	MSA=48; PD=90; controls=107	56.0 (43.0-66.0)	↓ / 67 (51-85)
Aerts et al., 2012	ELISA	CSF	MSA=47 (probable = 20, defined = 2); PD=58; controls=57	25.0 (17.0-32.0)	↔ / 25.0 (18.0-42.0)
Sun et al., 2013	ELISA	Plasma	MSA = 74 (MSA-P=30; MSA-C=44; possible=26, probable=48); controls=90	11.1 (7.1-21.2)	↑ / 6.8 (6.4-8.45)
Herbert et al., 2014	ELISA	CSF	MSA=23; PD=43; controls=57	26.3±8.1	↔ / 30.4±19.1
Mondello et al., 2014	ELISA	CSF	MSA=34; PD=52; controls=22	0.75 (0.69-1.01)	↓ / 1.31 (0.94-1.5)
Foulds et al., 2012	ELISA	CSF	MSA=8; PD=39; controls=20	3800±2400	↔ / 1870±2290
Magdalinou et al., 2015	ELISA	CSF	MSA=31; PD=31; controls=30	1.347 (1.162-1.531)	↓ / 1.782 (1.516-2.048)

B/ Tau

Study	MSA patients (n=)	Assay	Level (ng/ml)	MSA vs. controls
Abdo et al., 2004	30 (probable=26) MSA-P=15, MSA-C=14, both = 1	ELISA	MSA-C = 0.242 (0.210-0.386) MSA-P=0.259 (0.193-0.320)	↔
Mollenhauer et al., 2007	MSA-P=12, MSA-C=6	ELISA	0.353 (0.255-0.450)	↔
Sussmuth et al., 2010	MSA-P = 11, MSA-C = 14	ELISA	MSA-C=0.239 (0.107-0.439) MSA-P=0.220 (0.136-0.488)	↑
Abdo et al., 2007a	19 (probable=16)	ELISA	0.265 (0.207-0.320)	↑
Shi et al., 2011	32 (>50 years + Hb<200=20)	BBMA	0.0467±0.0189	↔
Abdo et al., 2007b	MSA-P=19 (probable=16, definite=1) MSA-C=26 (probable=12, definite=3)	ELISA	MSA-C=0.296±0.103 MSA-P=0.255±0.093	↑
Mollenhauer et al., 2011 (discovery cohort)	MSA-P=21, MSA-C=8	ELISA	0.147 (0.075-0.527)	
Hall et al., 2012	48	BBMA	528 (316-770)	↔
Bech et al., 2012	10	ELISA	?	
Herbert et al., 2014	23 (MSA+Hb<0.1µg/l=18)	ELISA	0.284±0.131	↑?
Magdalinou et al., 2015	31	ELISA	0.275 (0.210-0.341)	↔
Herbert et al., in press (discovery cohort)	27	ELISA	0.335±0.164	↑

C/ NfL

Study	Analyte	MSA patients (n=)	Assay	Level (ng/ml)	MSA vs. Controls
Holmberg et al., 1998	NFL	MSA-P=5, MSA-C=5	ELISA	0.92±0.46	↑
Holmberg et al., 2001		MSA-P = 29, MSA-C = 7	ELISA	0.864±0.737	
Abdo et al., 2007a		19 (probable=16, defined=1)	ELISA	0.0334 (0.0183-0.062)	↑
Abdo et al., 2007b		MSA-P = 19 (Probable=16, defined=1) MSA-C=26 (probable=12, defined=3)	ELISA	MSA-C= 0.04±0.025 MSA-P= 0.039±0.024	↑
Petzold et al., 2009		baseline=42, 6 months=32, 12 months=20	ELISA	baseline=1.4 6 months=1.36 12 months=1.42	
Constantinescu et al., 2010b		MSA-P = 14, MSA-C = 7	ELISA	baseline=1.207 (0.250-6.030) 12 months=1.250 (0.250-3.940)	↑
Bech et al., 2012		10	ELISA	about 0.1	
Hall et al., 2012		48	ELISA	4075 (2270-7105)	↑
Magdalinou et al., 2015		31	ELISA	3.024 (1.984-3.818)	↑
Herbert et al., in press		27	ELISA	4.548±3.206	↑
Herbert et al., in press (validation cohort)		25	ELISA	5.937±4.267	↑
Brettschneider et al., 2006	NFH	MSA-P = 11, MSA-C = 10	ELISA	MSA-C=3.1 MSA-P=0.3	↑
Abdo et al., 2007a		19	ELISA	0.191 (0.123-0.283)	↑
Abdo et al., 2007b		MSA-P=19, MSA-C=26	ELISA	MSA-C= 0.241±0.143 MSA-P= 0.244±0.224	↑
Petzold et al., 2009		baseline=42, 6 months=32, 12 months=20	ELISA	baseline=0.25 6 months=0.36 12 months = 0.41	No comparison

Tableau 7 : Résultat des mesures des niveaux d’α-syn (A), de tau (B) et du NfL (C) dans différentes études comparant des sujets AMS à des sujets contrôles

D’après *Laurens et al. Neurobiol Dis 2015*

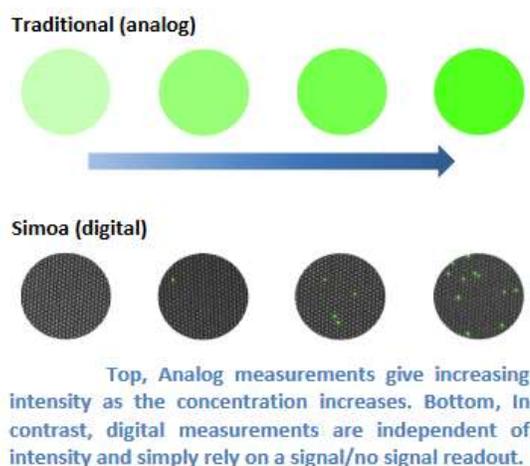
Le travail effectué à Göttingen m’a donné l’opportunité de mesurer les niveaux d’α-syn, d’hémoglobine, de tau, d’UCH-L1, de l’insuline et du NfL dans le LCR et le sérum dans une cohorte de patients AMS et de corrélérer ces résultats avec les données cliniques. Les ressources du laboratoire m’ont également donné l’occasion de mesurer la glial fibrillary protein (GFAP, composant des prolongements des astrocytes) et la protéine membranaire TREM2 (connue pour

être un facteur de risque dans la maladie d'Alzheimer) bien que leurs niveaux n'ont jamais été montrés comme altérés dans l'AMS.

Plan de l'étude:

Des échantillons (LCR et sérum) de 50 patients AMS dont 30 participants de l'étude AFF009 (NCT02270489) et 20 de la cohorte BIOAMS (NCT01485549), ainsi que 9 témoins non atteints de pathologies neurodégénératives de la cohorte BIOAMS ont été utilisés pour l'analyse. Les échantillons ont été prélevés selon les procédures de la cohorte Parkinson's Progression Markers Initiative (PPMI) (<https://www.ppmi-info.org/study-design/research-documents-and-sops/>). Les échantillons de la cohorte BIOAMS ont uniquement contribué au dosage du NfL.

Les différents marqueurs ont été mesurés soit par ELISA classique, soit par la technique Single Molecule Array (SIMOA, entreprise Quanterix) qui est un test ELISA digital amplifiant fortement le signal émis lors de la détection (1000 fois plus précis qu'un ELISA classique). La technique SIMOA est automatisée et utilise des billes paramagnétiques de 2,7µm de diamètre, recouvertes d'immunocomplexes (approximativement 250 000 sites d'attache par billes). Environ 500 000 billes sont ajoutées pour un échantillon de 100µL, de manière à ce que les anticorps de capture sur les billes soient en nombre bien supérieur au nombre de molécules cibles. Après lavage, les billes liées aux molécules cibles ou non liées sont mises en présence d'un anticorps biotinylé puis avec de la streptavidine couplée à la bêta galactosidase. Chaque bille est ensuite logée dans un puit unique sur une plaque de lecture et le substrat fluorescent est ajouté. La détection est repérable même s'il y a qu'une seule molécule liée à une bille. Un ratio des puits émettant de la fluorescence sur le nombre total de puits est ensuite calculé pour déterminer la concentration (voir figure ci-dessous).



Les marqueurs NfL, tau, UCH-L1 et GFAP ont été mesurés par la technique SIMOA tandis que les autres analytes ont été mesurés par des tests ELISA classiques. Les taux sériques de tau et UCH-L1 n'ont pas pu être mesurés par SIMOA car leur concentration étaient trop faible. De la même manière les taux d'insuline n'ont pas pu être mesurés dans le LCR en ELISA classique.

Les données cliniques des patients AMS ont été corrélées avec les mesures des différents biomarqueurs. Ces données cliniques sont l'âge du patient, la durée de la maladie à partir de la manifestation des troubles et les scores des deux premières parties de l'UMSARS (échelle d'évaluation unifiée de l'AMS, mesurant les difficultés avec les activités de la vie courante et les troubles moteurs, voir matériel et méthodes).

Matériel et méthodes

Patients prenant part à l'étude et données cliniques

Nous avons analysé les niveaux de NfL dans le LCR et le sérum de 30 patients AMS de l'étude AFF009 (NCT02270489), 20 patients AMS probables de la cohorte BIOAMS (NCT01485549) et 9 sujets contrôles neurologiques (pas de pathologie neurodégénérative) de la cohorte BIOAMS. Nous avons, en plus du NfL, mesuré plusieurs biomarqueurs d'intérêt dans le LCR (α -syn, tau, GFAP, UCH-L1, TREM2 et l'hémoglobine) et le sérum (α -syn, GFAP, insuline, TREM2 et hémoglobine) des patients de la cohorte AFF009. Ces mesures ont été corrélées avec les données cliniques que sont : l'âge des patients, la durée de la maladie, les parties I et II de l'échelle de notation unifiée de l'atrophie multisystématisée (UMSARS), dont les différents items sont listés ci-dessous (**Tableau 8**, d'après (**Wenning et al., 2004**)).

UMSARS 1	UMSARS 2
1. Speech	1. Facial expression
2. Swallowing	2. Speech
3. Handwriting	3. Ocular motor dysfunction
4. Cutting food and handling utensils	4. Tremor at rest
5. Dressing	5. Action tremor
6. Hygiene	6. Increased tone
7. Walking	7. Rapid alternating movements of hands
8. Falling	8. Fingertapping
9. Orthostatic symptoms	9. Leg agility
10. Urinary function	10. Heel-Shin Test
11. Sexual function	11. Arising from chair
12. Bowel function	12. Posture
	13. Body sway
	14. Gait

Tableau 8 : Liste des différents items de l'UMSARS I et II

D'après *Wenning et al. Mov Disord 2004*

Mesures du NfL, de tau, d'UCH-L1 et de GFAP dans le LCR et le sérum par la technique SIMOA

Brièvement, des billes paramagnétiques carboxylées recouvertes de différents AC (Neurology 4-Plex A NF-light®, Tau, GFAP, UCH-L1 kit, Quanterix Corp, Boston, MA, USA) ont été incubées avec les échantillons dans l'appareil Simoa HD-1 (Quanterix) ; le reste des étapes de l'expérience est automatisé (voir plan de l'étude). Les résultats sont interprétés par le biais de courbes de calibrages provenant du kit.

Mesures par ELISA classiques

Pour l' α -syn et l'hémoglobine, des plaques 96 puits (MSD) ont été incubées avec l'AC de capture respectivement MJFR1 (Abcam, 3 μ g/mL dilution PBS, 30 μ L/puit) et A80-134A (Bethyl laboratories, 1 μ g/mL dilution PBS, 30 μ L/puit), toute une nuit à 4°C. Après trois rinçages PBS + 0,05% tween 20, les plaques ont été bloquées une heure à Tamb sous agitation (300rpm) avec 1% de BSA (dilution PBS-tween) et lavées trois fois à nouveau. Après préparation des différentes courbes d'étalonnage, les échantillons, dilués en conséquence, ont été chargés dans les puits en duplicats (25 μ L/puit), puis la plaque a été placée sous agitation pendant une heure à Tamb. Une fois les rinçages effectués, l'anticorps de détection Sulfo-Tag a été ajouté, respectivement Syn1 (Transduction Labs, 1 μ g/mL dans du PBS-tween-1% BSA) et A80-134A (Bethyl Laboratories, 1 μ g/mL dans du PBS-tween-1% BSA). Après une heure d'incubation sous agitation, la plaque a été rincée et la solution de détection ajoutée (MSD read buffer diluted twice in distilled water). La plaque a ensuite été lue par le Meso Scale Discovery Sector Imager (MSD) et le signal mesuré à 620nm.

Pour l'insuline, un kit MSD K151BZC-1 a été utilisé ; le principe est le même que le protocole décrit ci-dessus, à la différence que les plaques fournies sont pré-recouvertes d'AC de capture et que l'AC de détection est incubé en même temps que les échantillons sur la plaque (pour une incubation de 2h à Tamb).

Pour les expériences TREM2 des plaques 'coatées' à la streptavidine ont été utilisées. L'AC anti TREM2 étant biotinylé, il se lie à la streptavidine après incubation (BAF1828, R&D systems, dilution 0,25 μ g/mL dans du PBS-tween + 0,25% BSA, 1 heure d'incubation à Tamb). Après ajout des échantillons à mesurer (1 heure) et rinçages (x3), les puits ont été incubés avec l'AC de capture B-3 (Santa Cruz Biotechnology, 1 μ g/mL dans du PBS-tween + 0,5% BSA +

1 µg/mL goat anti mouse IgG) pendant une heure et lus en utilisant le tampon de révélation dilué deux fois.

Analyses statistiques

Pour la comparaison entre deux groupes avec une distribution non Gaussienne, un test de Mann Whitney a été utilisé. L'association entre deux variables continues a été déterminée avec des tests de corrélation de Spearman. L'analyse statistique a été faite avec le logiciel Graphpad Prism. Les données sont présentées en SEM ; un seuil de significativité de $p < 0,05$ a été utilisé.

Résultats

Mesures de la concentration du NfL dans le sérum et le LCR des patients AMS et des sujets contrôles

Les niveaux de NfL sont en moyenne 1,7 fois plus élevés dans le plasma des patients AMS en comparaison avec les sujets contrôle (Mann Whitney, $p < 0,01$, **Figure 32 A**) et 3,7 fois plus élevés dans le LCR (Mann Whitney, $p = 0,005$, **Figure 32 B**).

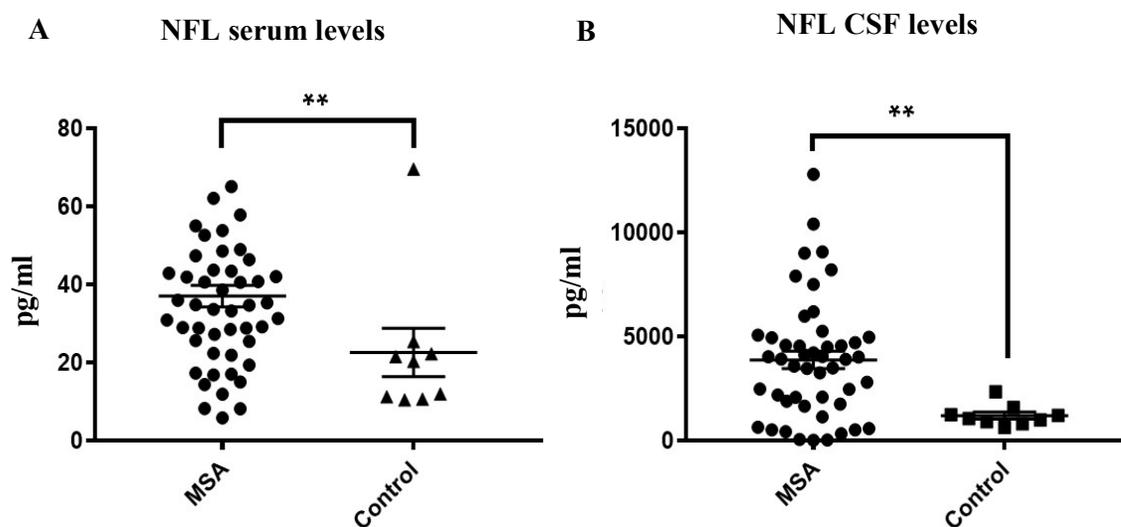


Figure 32 : Mesure de la concentration du NfL dans le sérum et le LCR des patients AMS et des sujets contrôles

Les concentrations dans le plasma (A) et le LCR (B) sont en pg/ml, patients AMS (n=50), sujets contrôle (n=9). Les barres d'erreurs sont représentées en SEM. ** $p < 0,01$, test non paramétrique de Mann Whitney.

Corrélations des données cliniques et des mesures des différents biomarqueurs du LCR et du sérum de l'essai AFF009

Les différents biomarqueurs ont été mesurés par SIMOA ou par ELISA classique et les relations entre les différentes concentrations et les données cliniques ont été analysées par un test non paramétrique de Spearman.

Information que nous retrouvons dans les deux tableaux (**Tableaux 8 A et B**) car il s'agit de deux variables issues des données cliniques ; comme nous nous y attendions, il y a une forte relation positive entre l'UMSARS I et l'UMSARS II ($p=0,01$).

Pour l' α -syn, si nous avons une corrélation négative dans le LCR (**Tableau 8 B**) avec la durée de la maladie ($p<0,05$) et l'UMSARS II ($p<0,05$), ce n'est pas le cas pour le sérum (**Tableau 8 A**). Dans le LCR, l' α -syn corrèle de manière positive avec les marqueurs TREM2 ($p<0,001$), GFAP ($p<0,05$), tau ($p<0,001$) et UCH-L1 ($p<0,05$). Dans le sérum, l' α -syn présente une forte relation positive ($p<0,001$) avec les niveaux d'hémoglobine (Hb), mais pas avec d'autres variables.

Dans le LCR, les concentrations de GFAP, NfL, tau et UCH-L1 sont toutes corrélées positivement ($p<0,001$ dans chaque cas) ; dans le sérum, seuls les niveaux de NfL et de GFAP sont corrélés positivement ($p<0,001$).

Dans le LCR, le NfL ne corrèle pas avec les données cliniques ; en revanche dans le sérum il y a une corrélation positive avec la durée de la maladie ($p<0,05$) et l'UMSARS I ($p<0,05$). L'insuline a une relation inverse avec le NfL et GFAP ($p<0,05$ dans les deux cas) dans le sérum.

GFAP est le seul biomarqueur à présenter une relation significative avec l'âge des patients (relation positive dans le plasma $p=0,001$). TREM2 et tau sont corrélés positivement dans le LCR ($p<0,05$).

Données exprimées en p value

En jaune : corrélations positives

En bleu : corrélations négatives

A

Serum	Age	Duration	UMSARS I	UMSARS II	α -syn	Hb	insulin	TREM2	NfL	GFAP
Age										
Duration	0,581									
UMSARS I	0,451	0,390								
UMSARS II	0,612	0,152	0,001							
α -syn	0,975	0,430	0,407	0,863						
Hb	0,666	0,883	0,746	0,777	0,001>					
insulin	0,449	0,268	0,431	0,895	0,789	0,685				
TREM2	0,373	0,818	0,149	0,595	0,967	0,381	0,060			
NfL	0,277	0,026	0,036	0,321	0,590	0,930	0,002	0,391		
GFAP	0,001	0,748	0,159	0,153	0,984	0,633	0,027	0,236	0,001>	

B

CSF	Age	Duration	UMSARS I	UMSARS II	α -syn	Hb	TREM2	NfL	GFAP	tau	UCHL-1
Age											
Duration	0,581										
UMSARS I	0,451	0,390									
UMSARS II	0,612	0,152	0,001								
α -syn	0,575	0,033	0,395	0,030							
Hb	0,320	0,323	0,505	0,488	0,149						
TREM 2	0,654	0,144	0,907	0,608	0,001>	0,176					
NfL	0,958	0,900	0,409	0,810	0,208	0,429	0,210				
GFAP	0,087	0,398	0,837	0,736	0,014	0,240	0,055	0,001>			
tau	0,468	0,316	0,776	0,300	0,001>	0,236	0,033	0,001>	0,001>		
UCHL-1	0,093	0,780	0,355	0,863	0,025	0,129	0,153	0,001>	0,001>	0,001>	

Tableau 8 : Relations entre les données cliniques et les biomarqueurs mesurés dans le plasma et le LCR des patients AMS

Les valeurs dans les tableaux sont exprimées en valeur p et reflètent la force de la relation entre deux variables. Les cellules colorées ont une valeur p inférieure à 0,05. La couleur jaune correspond à une corrélation positive et la bleu à une corrélation négative. Le tableau A compare les données cliniques avec les concentrations sériques des différents biomarqueurs et le tableau B les concentrations du LCR. Les variables ont été mesurées sur les 30 patients de l'étude AFF009 et corrélées par un test non paramétrique de Spearman. Hb = hémoglobine.

DISCUSSION

Le travail que j'ai effectué en thèse à l'institut des maladies neurodégénératives m'a permis d'explorer différentes facettes de la recherche translationnelle que sont ; la modélisation animale, l'étude de nouvelles voies thérapeutiques en phase pré-clinique et l'analyse de biomarqueurs d'intérêt pour le suivi clinique dans les échantillons biologiques de patients AMS. L'ensemble de ces études s'inscrit dans un projet global visant à l'amélioration thérapeutique.

Dans la première partie de la discussion, nous récapitulerons les différents aspects du modèle murin et de primate non humain générés par inoculation de vecteur viraux permettant la surexpression oligodendrogliale de l' α -syn. Dans un second temps, nous discuterons les modifications apportées par les différentes stratégies thérapeutiques ciblant l'agrégation de l' α -syn et la résistance à l'insuline dans le modèle de souris PLP-syn. En parallèle, seront discutés les résultats obtenus sur les échantillons de tissus cérébraux de patients AMS. En dernier lieu, nous discuterons les corrélations obtenues entre les mesures des niveaux d'un set de biomarqueurs d'intérêt dans le LCR et le sérum de patients AMS avec leurs données cliniques.

Partie I : Effet de la surexpression oligodendrogliale striatale d' α -syn par une approche virale dans un modèle murin et de primate non humain

Comme nous l'avons vu dans l'introduction (**voir introduction p45**), l'inoculation de toxines neuronales dans les modèles murins entraîne une forte neurodégénérescence au niveau de la SNc ou du striatum ainsi qu'une importante dysfonction motrice mais ne reproduit pas les mécanismes pathologiques d'agrégation de l' α -syn dans l'AMS. A l'inverse, les modèles génétiques, comme le modèle PLP-syn, présentent cette agrégation caractéristique mais n'ont qu'une dégénérescence et une dysfonction motrice légère. Dans le cadre de la MP, des approches virales de surexpression d' α -syn ont été menées et ont pour avantage d'induire une plus forte neurodégénérescence tout en reproduisant l'accumulation pathologique de l' α -syn (**voir tableau 9**, d'après (**Van der Perren et al., 2015**)). Cette stratégie a également montré des résultats prometteurs chez le modèle primate non-humain (**Dehay and Fernagut, 2016**).

En se basant sur les résultats obtenus dans le cadre de la modélisation de la MP, nous avons utilisé une approche virale de surexpression de l' α -syn humaine oligodendrogliale dans le striatum des rats et des primates non-humains macaca fascicularis. Les virus adéno associés (AAV) présentent comme avantage d'être sans danger et sont exprimés longtemps dans l'organisme. Nous avons choisi l'AAV 1/2 comme vecteur car une étude a montré sa capacité

à induire une expression de la GFP sous le contrôle du promoteur MBP avec une forte spécificité oligodendrogliale et un volume de transduction important chez la souris (von Jonquieres et al., 2013).

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 et al. 2002)	rAAV2/2	CBA	Rat	30–80 %	8–16 weeks	Yes	–	Mild	–
A30P (Klein et al. 2002)	rAAV2/2	CBA	Rat	53 %	1 year	Yes	–	–	–
WT, A30P, A53T (Lo Bianco et al. 2002)	LV	PGK	Rat	24–35 %	20 weeks	Yes	No	–	–
WT, A30P (Lauwers et al. 2003)	LV	CMV	Mice	10–25 %	40–52 weeks	Yes	Yes	–	–
WT, A53T (Kirik et al. 2003)	rAAV2/2	CBA	Prim.	30–60 %	16 weeks	Yes	–	Mild	–
WT (Yamada et al. 2004)	rAAV2/2	ND	Rat	50 %	13 weeks	Yes	No	Yes	No/mild
A53T (Maingay et al. 2006)	rAAV2/2	CBA	Rat	\pm 40 %	14 weeks	–	–	–	–
A30P (Lauwers et al. 2007)	LV	CMV	Rat	21–52 %	46 weeks	Yes	Yes	–	Mild
WT (St Martin et al. 2007; Theodore et al. 2008)	rAAV2/2	CBA	Mice	25 %	24 weeks	No	–	–	–
A53T (Chung et al. 2009)	rAAV2/2	Syn-1	Rat	35 %	17 weeks	–	–	–	–
Second generation									
WT, A53T (Eslamboli et al. 2007)	rAAV2/5	CBA	Prim.	A53T 40 %	1 year	Yes \ominus	Yes	Yes	Moderate
WT, S129D/A (Gorbatyuk et al. 2008)	rAAV2/5	CBA	Rat	WT 60 % S129A 70 %	26 weeks 4 weeks	Yes	–	–	–
WT, A30P, S129D/A (Azeredo da Silveira et al. 2009)	rAAV2/6	CMV	Rat	WT, A30P 20 % S129A 70 %	8 weeks	Yes \ominus	–	Yes	–
WT, S129D/A (McFarland et al. 2009a)	rAAV2/8	CBA	rat	26 %	6 weeks	yes	yes	–	–
A53T (Koprach et al. 2011)	rAAV1/2	CBA	rat	28 %	6 weeks	yes \ominus	–	–	mild
WT, A53T, A30P (Winner et al. 2011), E46K, E57K*, E35K*	LV	CMV	rat	17–40 %	3 weeks	–	–	–	–
Third generation									
WT (Decressac et al. 2012)	rAAV2/6	Syn-1	rat	80 %	6–16 weeks	yes	–	yes	good
A53T (Van der Perren et al. 2014)	rAAV2/7	CMV/Syn-1	rat	80–90 %	4 weeks	yes	yes	–	good
A53T, WT (Oliveras-Salvá et al. 2013)	rAAV2/7	CMV/Syn-1	mice	82 %	8 weeks	yes	–	yes	–

Ubiq ubiquitination; *posph.S129* S129 α -synuclein phosphorylation; *ND* not described; *prim* primates; – not determined; * oligomeric mutants; \ominus proteinase K-resistant aggregates; *CBA* chicken β -actin promoter; *PGK* phosphoglycerate kinase promoter; *CMV* cytomegalovirus promoter; *Syn-1* synapsin-1 promoter; *CMV/Syn1* CMV enhanced synapsin 1 promoter

Tableau 9 : Modèles murins viraux de surexpression de l' α -syn neuronale dans le cadre de la MP

D'après Van der Perren et al. *Curr Top Behav Neurosci* 2015

Suite à l'inoculation virale dans le striatum du vecteur MBP-h α -syn humaine, nous avons mesuré chez le rat l'apparition d'une dysfonction motrice (détectable à deux mois post-injection par le test de stepping), s'aggravant progressivement (jusqu'à six mois post-injection, dernières

mesures effectuées). A six mois post-injection, le traitement à la L-Dopa n'entraîne pas d'amélioration du comportement moteur.

L' α -syn sous le contrôle du promoteur MBP est exprimé de manière préférentielle au niveau des oligodendrocytes dans le striatum des rats (83%), bien qu'on retrouve une expression neuronale faible de 11% (ce qui correspond aux résultats de l'étude de von Jonquieres et al. 2013) et 59% du volume striatal est concerné par la transduction virale. La présence d'inclusions d' α -syn dans le corps cellulaire des neurones, mais en quantité minime en comparaison aux ICG, est une des caractéristiques de l'AMS (**voir introduction p31**), cette aspécificité d'expression permet donc de recréer cette caractéristique particulière. Dans le putamen du modèle macaque, la spécificité oligodendrogliale n'est que de 60%, 39% des cellules positives à l' α -syn étant des neurones. Cette perte de spécificité est peut-être due à l'origine murine (souris) du promoteur MBP contrôlant l'expression de l' α -syn humaine.

Trois mois après l'injection le nombre de neurones TH positif dans la SNc diminue de 41%, cette diminution étant encore plus importante six mois après l'injection (66%). Une dégénérescence plus tardive et moins importante (23%) des neurones striataux a également été mesurée à six mois post-injection. Cette dégénérescence striatale est possiblement à l'origine de l'inefficacité de l'administration de la L-Dopa sur le comportement moteur à six mois post injection. De l' α -syn agrégée est retrouvée au niveau de la substance noire et du striatum trois et six mois après l'injection virale, bien que dans la substance noire ces niveaux sont extrêmement faibles à six mois, ce qui peut être expliqué par la forte neurodégénérescence mesurée à ce moment-là. La phosphorylation pathologique de l' α -syn en Ser129 (**voir introduction p49**) est également augmentée dans le striatum et la substance noire des rats MBP-h α -syn en comparaison aux rats MBP-GFP à trois mois post-injection et également à six mois post-injection dans le cas du striatum. Encore une fois, la forte neurodégénérescence retrouvée dans la SNc est potentiellement à l'origine de la diminution des formes phosphorylées de l' α -syn à six mois post-injection. La surexpression oligodendrogliale de l' α -syn a déjà démontré des propriétés délétères (**voir introduction p49**), nous montrons ici qu'elle est capable d'engendrer une neurodégénérescence de la voie striatonigrale dans un modèle de rat. Le fait que la neurodégénérescence dans le striatum soit de plus faible amplitude et plus tardive est possiblement lié à la vulnérabilité des neurones dopaminergiques de la SNc. En effet, chez l'homme, la production de dopamine induit un stress oxydatif constant au niveau de ces neurones, les rendant plus vulnérables aux perturbation de l'homéostasie cellulaire (**Sylvie**

Delcambre, 2016). L'hypothèse que pour certains patients AMS-P, la dégénérescence des neurones de la SNc adviendrait avant celle des neurones striataux (**voir introduction p29-30**) est en accord avec les résultats obtenus dans notre modèle. Compte tenu du fait qu'un petit nombre de neurones dopaminergiques (7%) dans la SNc sont positifs à la GFP dans le groupe de souris MBP-GFP, il est probable que le virus ait un tropisme particulier pour les terminaisons des neurones dopaminergiques projetant sur le striatum et soit capable d'infecter les corps cellulaires dans la SNc de manière rétrograde comme cela a été montré pour divers sérotypes d'AAV (**Albert et al., 2017**). La diffusion de l' α -syn pathologique (agrégée et hyperphosphorylée) dans la SN à trois mois est potentiellement due à ce type de transport, mais pourrait aussi être la conséquence d'un transport antérograde des neurones GABAergiques surexprimant l' α -syn (bien qu'en faible nombre) projetant sur la SNr. Compter le nombre de cellules positives à l' α -syn humaine dans la SN avant l'apparition de la neurodégénérescence et le comparer au nombre de cellules positives à la GFP pourrait également nous permettre de déterminer si, dans notre modèle, l' α -syn possède la capacité de se propager.

Le modèle de rat généré par surexpression virale oligodendrogliale au niveau du striatum récapitule plusieurs des caractéristiques retrouvées dans l'AMS-P, à savoir ; une dysfonction motrice progressive, une surexpression et une agrégation pathologique de l' α -syn oligodendrogliale couplée à une dégénérescence des neurones de la voie striatonigrale. Ce modèle semble donc adapté à l'étude de stratégies thérapeutiques symptomatiques, neuroprotectrices ainsi qu'anti agrégatives, bien que des expériences complémentaires, visant à caractériser plus précisément les différents mécanismes pathologiques retrouvés dans l'AMS, doivent encore être menées. Pour ce qui est du modèle de primate, le vecteur viral utilisé n'est pas optimal pour une transduction efficace et sélective des oligodendrocytes, de plus une analyse ultérieure à la publication de l'article n'a pas montré la présence d' α -syn au niveau de la SNc, ni de dégénérescence striatale ou nigrale. Bien que l'homologie du promoteur du gène MBP soit forte entre la souris et l'homme (87%) (**Wei et al., 2003**), il est possible que ce ne soit pas le cas pour le macaque ou que ce ne soit pas suffisant à assurer une transcription spécifique par les oligodendrocytes. D'autres types d'AAV ayant montré un volume de transduction important chez le primate non-humain pourraient également être envisagés. Une étude récente a par exemple utilisé un vecteur AAV infectant de manière très spécifique les oligodendrocytes dans le striatum dans un modèle de rat et de primate et ce bien que l' α -syn humaine soit sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire (**Mandel et al., 2017**), ce qui montre l'importance du virus utilisé. En plus de présenter l'agrégation pathologique de l' α -syn

(phosphorylée en Ser129 et résistante à la protéinase K), ces deux modèles reproduisent également la démyélinisation dans le striatum et une activation microgliale dans la substance noire, deux phénomènes clefs dans l'AMS qu'il pourrait être intéressant d'étudier sur ces modèles animaux.

Partie II : Etude de l'effet de stratégies thérapeutiques sur le modèle de souris PLP-syn

Comportement moteur des souris PLP-syn

Avant de voir plus en détail chacun des trois projets de la partie stratégies thérapeutiques, nous allons revenir sur la mesure du comportement moteur chez les souris PLP-syn par le test de traversée d'une poutre car les résultats sont communs aux trois études. Il est admis que les souris PLP-syn présentent une altération motrice à 12 mois de vie, en revanche les études menées avant cet âge ont montré des résultats variables (**voir présentation du modèle p69**). Dans les différentes stratégies thérapeutiques présentées, nous avons souhaité interférer avec la perte des neurones dopaminergiques de la SNc qui intervient entre 2-4 mois de vie. Les souris traitées ont donc été respectivement sacrifiées à 22, 18 et 30 semaines de vie pour les études rapamycine, nilotinib et GRK2. Nous n'avons pas noté de différences significatives entre les groupes en ce qui concerne le nombre d'erreurs par pas avec ce test moteur avec des enregistrements sur plusieurs mois. Il est possible que les différences dans les études effectuées avant un an de vie viennent du type de test utilisé, le matériel d'enregistrement ou encore la méthode d'analyse statistique. En effet, dans ces études, l'analyse est souvent effectuée en t-test sans que le facteur temps soit pris en compte. En utilisant cette méthode, nous avons une différence significative dans l'étude GRK2 à 6 mois uniquement avec une très faible valeur p ($p=0,048$) mais nous n'avons pas de groupe WT contrôle pour affirmer que le groupe PLP-syn ayant reçu le miARN scramble montre une altération motrice ou si l'inoculation du miARN GRK2 entraîne une amélioration du comportement moteur supérieur au niveau basal. Il serait intéressant de faire des tests moteurs mois après mois sur une durée d'un an pour déterminer plus précisément l'apparition de la dysfonction motrice.

Rapamycine

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, des études montrent que les mécanismes de dégradation protéiques sont modifiés dans l'AMS, et nous allons revenir plus en profondeur sur les altérations de la voie autophagolysosomale. Cette voie est responsable de la dégradation de protéines possédant une demie-vie élevée et même d'organelles entières dans le cas de la macroautophagie. Ce mécanisme passe par la formation de structures lipidiques à doubles membranes, appelées autophagosomes, dans lesquelles les protéines cibles vont être séquestrées et par la suite dégradés via la fusion des autophagosomes avec les lysosomes provoquant l'activation d'hydrolases suite à la baisse de pH (Randall-Demillo et al., 2013). Le complexe protéique mTORC1, qui est un senseur du métabolisme énergétique cellulaire, joue un rôle central dans la régulation de la synthèse protéique, de la synthèse des acides aminés, de la synthèse lipidique mais aussi dans la régulation de l'autophagie (Shimobayashi and Hall, 2014). Ainsi, dès lors que la cellule dispose des nutriments nécessaires à un métabolisme anabolique, la forme active de mTORC1 inhibe l'autophagie. Dans un contexte où les nutriments sont limités, l'inhibition de mTORC1 lève son effet régulateur négatif et entraîne l'initiation de l'autophagie (Kim et al., 2011). La macroautophagie, longtemps considérée comme un mécanisme aspécifique activé par la privation métabolique, englobe en réalité une multitude de voies substrat spécifiques (Frake et al., 2015, Stolz et al., 2014). Des récepteurs peuvent reconnaître des protéines possédant un tag spécifique et sont capables de se lier à différents composants de l'autophagie. C'est le cas de LC3, qui possède une forme cytosolique LC3-I et une forme liée à la membrane des autophagosomes LC3-II, qu'on utilise donc comme marqueur des autophagosomes (Goodall and Thorburn, 2014). L'inhibition de mTORC1 in-vitro par la rapamycine dans les cultures cellulaires surexprimant l' α -syn diminue son accumulation ((Webb et al., 2003), **Figure 33 A**) et l'inhibition de la macroautophagie a l'effet inverse ((Vogiatzi et al., 2008), **Figure 33 B**). La dégradation de l' α -syn est donc en partie médiée par la macroautophagie.

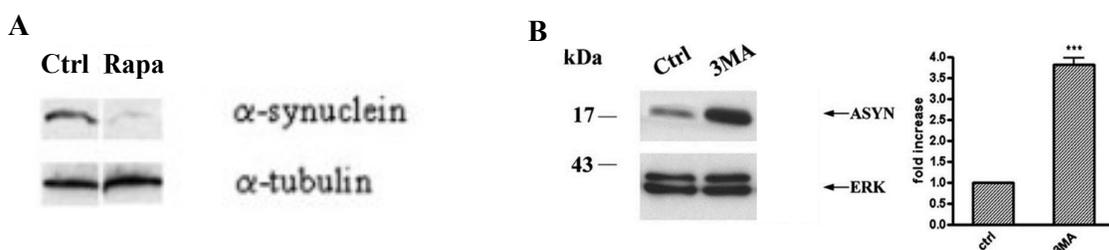


Figure 33 : Effet de la rapamycine et du 3MA sur des cultures cellulaires surexprimant l' α -syn humaine

La rapamycine diminue la quantité d' α -syn humaine (A) et le 3MA (inhibiteur de l'autophagie) induit une augmentation de la quantité d' α -syn humaine (B), dans des lignées cellulaires surexprimant l' α -syn.

D'après, (A) Webb et al. *J Biol Chem* 2003 et (B) Vogiatzi et al. *J Biol Chem* 2008

La rapamycine, a montré des propriétés neuroprotectrices dans des modèles de la maladie de Huntington, d'Alzheimer, de sclérose latérale amyotrophique et de la MP (Bove et al., 2011).

Le but de cette première étude a été, dans un premier temps, de mesurer dans le putamen de patients AMS les niveaux protéiques de certains acteurs de la voie autophagolysosomale que sont ; mTORC1, la kinase p70S6K (phosphorylée en Thr389 par la mTORC1 activée), et LC3. Dans un deuxième temps nous avons déterminé l'effet de la rapamycine sur l'agrégation de l' α -syn et la neurodégénérescence rencontrée dans le modèle de souris PLP-syn.

Les patients AMS montrent une diminution drastique de 95% des niveaux de mTOR dans le putamen en comparaison aux sujets contrôles. Ce résultat est en adéquation avec une étude récente qui suggère que les niveaux d'ARNm de mTOR sont diminués de plus de 50% dans le striatum de patients AMS (Valera et al., 2017). Il semble donc peu probable que les altérations de l'autophagie retrouvées dans l'AMS (voir introduction p36-38) soient la conséquence de l'effet inhibiteur de mTORC1. En revanche, compte tenu de son implication dans de nombreux mécanismes anaboliques, une diminution aussi intense des niveaux de mTOR pourrait être délétère pour la survie cellulaire. La mesure du marqueur LC3 montre une très forte augmentation de sa forme liée à la membrane des autophagosomes LC3-II (11,7 fois plus) chez les patients AMS. Cette augmentation de LC3-II a été observée dans les agrégats isolés du cervelet de patients AMS mais pas dans les lysats totaux de tissus (Tanji et al., 2013). Dans la même étude ou les niveaux de l'ARN mTOR ont été mesurés, le marquage LC3-II n'a pu être détecté dans le striatum des patients AMS (Figure 34 ci-dessous, d'après (Valera et al., 2017)), nous avons nous même dû pousser la détection pour mesurer LC3-II (ce qui explique la surexposition de la bande LC3-I plus facile à détecter, en rouge dans nos Western Blot, Figure 17 p79).

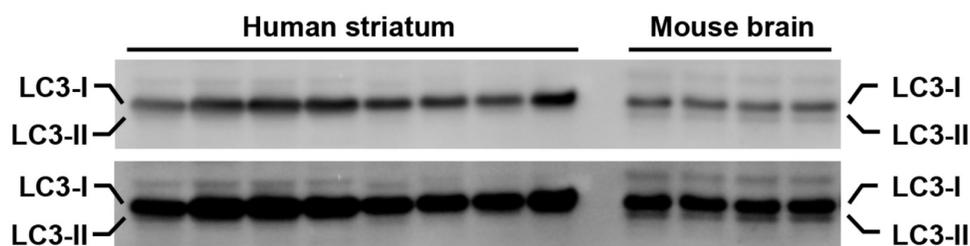


Figure 34 : Mesures par Western Blot de LC3 dans les tissus de striatum de patients AMS et sur du tissu striatal de souris WT

D'après, Valera et al. *Front. Mol. Neurosci.* 2017

Le marquage LC3 colocalise également avec les ICG dans le tissu cérébral des patients AMS (voir figure ci-dessous, d'après (Tanji et al., 2013)).

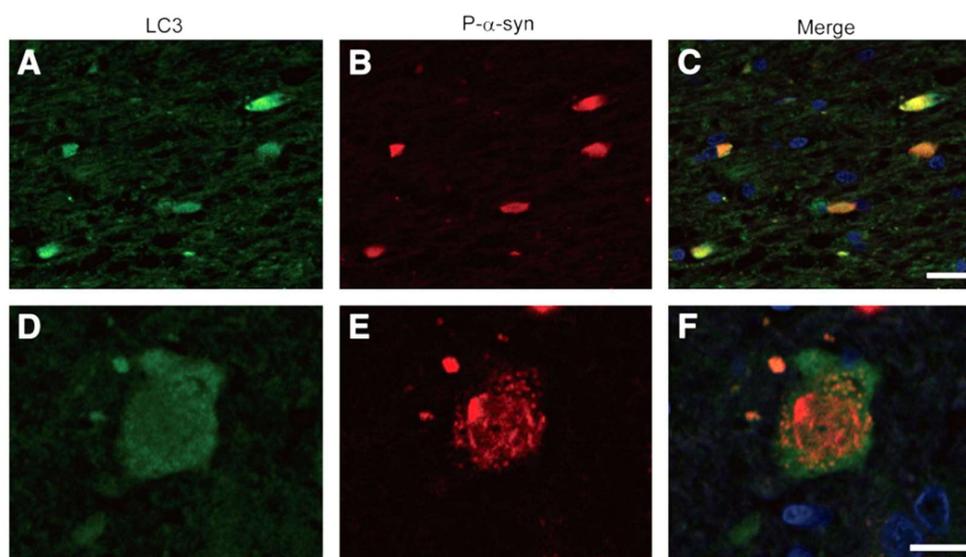


Figure 35 : Marquages immunofluorescents de l' α -syn phosphorylée et du LC3 dans le tissu de patients AMS

Barres = 20 μ m

D'après, Tanji et al. *Neurobiol Dis* 2013

Une augmentation modérée de LC3-II est associée à une activation des processus autophagiques, en revanche une forte augmentation peut aussi indiquer une déficience de la dégradation des autophagosomes par les lysosomes, entraînant l'accumulation des autophagosomes (Mizushima and Yoshimori, 2007). Il est donc possible que, comme dans le cas de la MP, la voie lysosomale soit également altérée dans l'AMS (Dehay et al., 2013, Bourdenx and Dehay, 2016).

La kinase p70S6 est phosphorylée par mTORC1 en Thr389 et devait nous servir de marqueur indirect de l'activité de mTORC1. Cette kinase induit la phosphorylation de la protéine ribosomale S6, composante du ribosome, promouvant la synthèse protéique (Shimobayashi and Hall, 2014). Bien que les niveaux de mTORC1 soient diminués, il y a une augmentation du ratio de la forme phosphorylée de p70S6/p70S6 totale dans le striatum des patients AMS. Le rôle de la kinase p70S6 dans l'autophagie n'est pas certain ; une des hypothèses est que lorsque mTORC1 est activée dans des conditions anaboliques, p70S6 contribue au maintien basal de l'autophagie. Dans des conditions cataboliques, l'inactivation de p70S6 via la

diminution d'activité de mTORC1 contrerait une trop forte induction de la voie autophagique. Cette kinase aurait ainsi un rôle tampon, prévenant des modifications trop drastiques lors des processus cataboliques et anaboliques (**Klionsky et al., 2005**). Il est possible que l'hyperphosphorylation de p70S6, qui n'est probablement pas médiée par mTORC1 au vu de sa forte diminution, participe à la formation d'autophagosomes et explique en partie l'augmentation de LC3-II. Cependant, au vu de la forte variabilité entre les différents patients, il faut interpréter ces résultats avec prudence car un patient AMS de notre étude présente un niveau extrêmement élevé de la phospho p70S6, ce qui a pu biaiser les résultats en ce qui concerne cette kinase.

mTORC1 diminue l'autophagie par la phosphorylation inhibitrice directe de ULK1 qui est critique dans l'initiation de la formation des autophagosomes (**Yoon, 2017**), il serait donc intéressant de déterminer ses niveaux totaux ainsi que de sa forme phosphorylée et voir si ils sont corrélés à la forte augmentation de LC3-II.

Outre l'analyse de la voie de l'autophagie chez les patients AMS, notre second objectif a été de déterminer si la rapamycine était capable de diminuer la neurodégénérescence et l'agrégation retrouvée dans le modèle PLP-syn. Le groupe PLP-syn traité à la rapamycine ne présente pas significativement plus de neurones dopaminergiques que le groupe PLP-syn ayant reçu de la nourriture contrôle. Bien qu'il n'y ait pas non plus de différences significatives entre les groupes WT et PLP-syn ayant reçu la rapamycine, la valeur p est extrêmement proche du seuil qui confirmerait que la rapamycine n'a aucun ou seulement un très faible effet sur la survie des neurones dopaminergiques. En revanche, lorsqu'on prend en compte les neurones Nissl et TH positifs, cet effet qu'il n'y a pas de différence entre les deux groupes est bien plus clair. Avec une dégénérescence de faible ampleur chez le modèle PLP-syn, il nous est difficile de statuer sur l'effet neuroprotecteur de la rapamycine, néanmoins utiliser la même stratégie chez des modèles animaux de l'AMS présentant une forte neurodégénérescence pourrait nous aider à interpréter ce résultat. La rapamycine montre des effets neuroprotecteurs dans les modèles de neurodégénérescences induits par des toxines, mais à ce jour il n'y a pas d'étude montrant son effet sur la dégénérescence induite par la surexpression de l' α -syn (**Bove et al., 2011**). Si son effet neuroprotecteur est discret, la rapamycine induit en revanche une diminution de 32% du nombre de cellules positives aux formes agrégées de l' α -syn dans le striatum des souris PLP-syn. La mesure de la forme monomérique de l' α -syn par Western Blot dans le striatum n'a elle pas montré de différences significatives. Une étude in-vivo sur des souris surexprimant l' α -syn et traitées à la rapamycine avait déjà montré une diminution de son accumulation au niveau du

corps cellulaire et des synapses des neurones (**Crews et al., 2010**). Il est possible que l'effet mesuré sur l' α -syn résistante à la PK dans notre étude soit dû à une dégradation directe des agrégats, mais cela pourrait être un effet de la clairance de l' α -syn monomérique empêchant par la même son agrégation durant les trois mois de traitement. Cet aspect est important pour déterminer s'il est possible de dégrader les agrégats oligodendrogliaux et donc potentiellement reverser la pathologie plutôt que de diminuer la vitesse d'agrégation et freiner le développement de la maladie.

Il semble peu probable que les altérations de la voie autophagolysosomale dans le striatum soient le fait de mTORC1 au vu de sa diminution drastique dans le striatum. Il est néanmoins intéressant de voir que la rapamycine a un effet sur la dégradation de l' α -syn dans le modèle PLP-syn et un potentiel effet neuroprotecteur discret. Les prochaines étapes sont de mesurer, dans notre modèle PLP-syn, les niveaux des protéines de la voie de l'autophagie déjà analysées chez les patients AMS pour déterminer si des altérations semblables sont retrouvées et de définir l'effet de la rapamycine. En plus d'activer la formation des autophagosomes, l'inhibition de mTORC1 régule positivement l'activité et l'acidification des lysosomes (**Puertollano, 2014**). Il serait donc également intéressant de mesurer les marqueurs lysosomaux chez les patients AMS et les souris PLP-syn de manière à mettre en lumière les différents mécanismes d'actions de la rapamycine.

Nous montrons dans cette étude que la rapamycine peut induire une activation de la clairance de l' α -syn et peut potentiellement avoir un très léger effet neuroprotecteur. En fonction des altérations retrouvées dans les différentes voies de la dégradation de l' α -syn chez les patients AMS, de nouvelles stratégies thérapeutiques plus spécifiques stimulant la voie autophagolysosomale pourraient être étudiées dans différents modèles in-vitro et in-vivo.

Nilotinib

La tyrosine kinase cAbl est activée de manière constitutive dans les cas de leucémie myéloïde chronique provoquant une division cellulaire incontrôlée des cellules souches de la lignée hématopoïétique possédant la mutation. Pour traiter cette pathologie, des inhibiteurs de la kinase cAbl, dont le nilotinib fait partie, sont utilisés, ce qui promeut la mort des cellules mutées (**Deremer et al., 2008**). Un des effets de ces inhibiteurs est l'activation de l'autophagie au niveau de ces cellules, un mécanisme qui serait potentiellement responsable de rechutes après

arrêt du traitement car il induirait un phénotype pro-survie de certaines cellules mutées après inhibition de l'oncogène (Salomoni and Calabretta, 2009). Cet effet sur l'autophagie serait en partie lié à la régulation positive de la synthèse de mTORC1 par la forme constitutivement activée de cAbl (Sheng et al., 2011). Le nilotinib est capable d'augmenter la dégradation protéique via l'activation de la voie de l'autophagie in-vitro dans des cellules cancéreuses (Yu et al., 2013, Shaker et al., 2013).

Une augmentation de la forme activée de la kinase cAbl (phosphorylée en Tyr245 et Tyr412) a été mesurée dans le striatum chez les patients atteints de la MP (Imam et al., 2011, Hebron et al., 2013). Une étude montre que la surexpression virale de la forme mutée A53T de l' α -syn dans la substance noire chez la souris est responsable d'une activation accrue de cAbl, et inversement, la surexpression de cAbl est capable d'augmenter les niveaux d' α -syn. Dans cette même étude le nilotinib (10mg/kg/j pendant 3 semaines) diminue les niveaux d' α -syn dans le tissu cérébral des souris surexprimant l' α -syn A53T ou WT et diminue les niveaux de LC3-II (Figure 36, ci-dessous, d'après (Hebron et al., 2013)). Une étude du même groupe reprenant les conditions de la surexpression de l' α -syn mutée explique que cette augmentation de LC3-II, suite à l'injection de nilotinib, serait due à l'induction du flux autophagique, car la fraction d' α -syn présente dans les autophagosomes est diminuée tandis que celle présente dans les lysosomes est augmentée (Lonskaya et al., 2013).

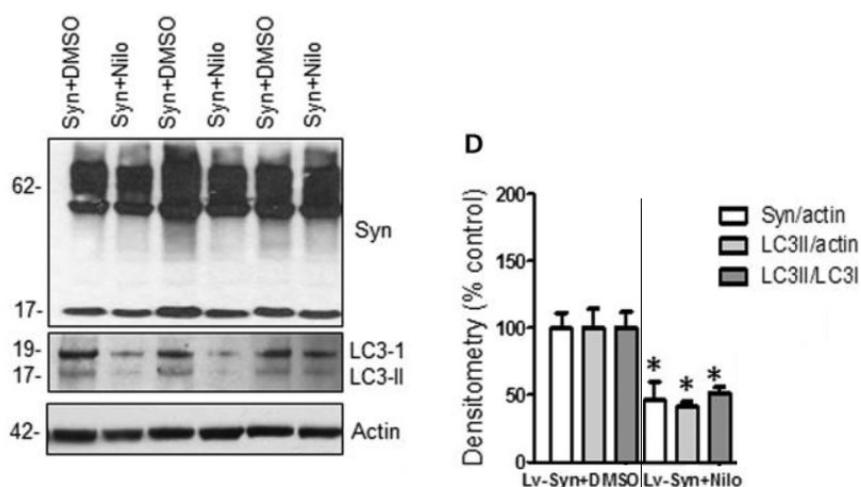


Figure 36 : Effets du nilotinib sur les niveaux d' α -syn et de LC3 dans le tissu cérébral de souris surexprimant l' α -syn humaine

D'après, Hebron et al. *Hum Mol Genet* 2013

Le nilotinib a montré un effet neuroprotecteur important sur les neurones dopaminergiques de la SNc dans un modèle murin de toxine (MPTP, **introduction p45**) de la MP (**Karuppagounder et al., 2014**), ainsi que dans le modèle murin surexprimant l' α -syn humaine (**Hebron et al., 2013**). Pour cette dernière étude, les comptages stéréologiques ont montré une diminution de 84% des cellules marquées à l' α -syn suite au traitement par le nilotinib et une restauration de 82% de la perte des neurones dopaminergiques qui normalement dégénèrent suite à la surexpression lentivirale de l' α -syn.

Au vu des effets du nilotinib sur l'autophagie, l'accumulation de l' α -syn et la neuroprotection dans différents modèles de la MP, nous avons voulu déterminer si ce traitement pouvait atténuer les phénomènes pathologiques retrouvés dans le modèle PLP-syn.

L'injection de nilotinib de manière intrapéritonéale à une dose de 1mg/kg ou de 10mg/kg chez les souris PLP-syn pendant trois mois n'a pas montré d'effet neuroprotecteur sur la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc. Si le nilotinib ne diminue pas le nombre de cellules positives à l' α -syn agrégée dans le striatum des souris PLP-syn en immunofluorescence, les niveaux de l' α -syn monomérique sont eux diminués de 24% en Western Blot avec une dose de 10mg/kg/jour. La diminution de l' α -syn monomérique n'est peut-être pas suffisante pour empêcher la formation de nouveaux agrégats cellulaires, il serait intéressant de comparer les intensités de fluorescence des cellules positives à l' α -syn agrégée pour déterminer de manière indirecte la densité de ces agrégats. La diminution des niveaux d' α -syn in-vitro par le nilotinib a pu être contrecarré par des inhibiteurs de l'autophagie, mais aussi par un inhibiteur du protéasome (**Mahul-Mellier et al., 2014**). Une possible hypothèse est que l'effet du nilotinib sur notre modèle de souris PLP-syn pourrait être lié à l'activation de la voie du protéasome, privilégiant la dégradation des formes monomériques d' α -syn, mais n'induisant pas la dégradation des formes agrégées. L'effet de la rapamycine pourrait, lui, potentiellement être lié à une activation préférentielle de la macroautophagie, ciblant les formes agrégées de l' α -syn. L'analyse de marqueurs des différentes voies de dégradation de l' α -syn sont à prévoir dans notre modèle PLP-syn pour déterminer le mode d'action de ces deux stratégies thérapeutiques.

La surexpression de l' α -syn humaine dans notre modèle PLP-syn n'induit pas d'augmentation de la forme totale de cAbl dans le striatum des souris PLP-syn, à l'inverse des résultats obtenus par (**Hebron et al., 2013**) in-vivo, bien que la même stratégie lentivirale in-vitro par (**Mahul-Mellier et al., 2014**) n'a pas montré de modification des niveaux de cAbl. Cette même étude a

montré une diminution des niveaux de l'ARNm de cAbl suite au traitement par le nilotinib (**Mahul-Mellier et al., 2014**), ce qui est en accord avec la diminution de la quantité de cAbl par Western Blot que nous avons observé dans le groupe PLP-syn traitées avec une dose de 10mg/kg/jour en comparaison au groupe PLP-syn ayant reçu le placebo. Il semble que les effets du nilotinib en plus d'inhiber la cAbl passent aussi par une régulation de sa synthèse. Il nous reste encore à déterminer si l'activation de cAbl est également diminuée dans le modèle PLP-syn. Une des prochaines étapes est également de mesurer les niveaux de cAbl totaux et de cAbl activée (forme phosphorylée) chez les patients AMS pour déterminer si comme dans la MP il y a une dérégulation de son activité.

Caractériser les différentes formes d' α -syn, leur toxicité et les voies par lesquelles elles sont dégradées peut nous aider à découvrir des stratégies plus ciblées pour combattre la neurodégénérescence dans l'AMS. Déterminer si les modèles murins que nous utilisons présentent des altérations comparables à celles retrouvées chez les patients AMS est également important pour augmenter la valeur prédictive de nos différentes stratégies thérapeutiques. Le nilotinib a été évalué dans une petite étude ouverte chez 12 patients atteints de MP ou de DCL, mais bien qu'il y ait un potentiel effet sur l'inactivation de la cAbl dans le LCR (**Pagan et al., 2016**), les limitations méthodologiques de cette étude ne permettent pas encore de statuer sur un potentiel effet clinique du traitement (**Wyse et al., 2016**).

Dans notre étude, le nilotinib n'a pas montré d'effet neuroprotecteur sur la dégénérescence des cellules dopaminergiques de la SNc dans le modèle de souris PLP-syn, mais a diminué les niveaux protéiques de sa cible, la kinase cAbl, et de l' α -syn monomérique dans le striatum.

GRK2

L'insuline est connue pour ses propriétés neurotrophiques in-vitro et in-vivo. Une diminution de l'activation de sa voie de signalisation intracellulaire est nommée résistance à l'insuline (**voir introduction p38-39**). Des altérations centrales et périphériques de la signalisation de l'insuline/IGF-1 (**voir Figure 11 p39**), ont été mise en évidence chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, de l'AMS et de la MP. De plus, des activateurs de cette voie comme l'insuline, IGF-1 ou encore GLP-1 ont montrés des effets neuroprotecteurs dans divers modèles in-vitro et murins de ces pathologies (**voir (Bassil et al., 2014)** pour une revue détaillée sur le sujet).

La phosphorylation de l'IRS-1 en Ser312, effecteur majeur de la voie de signalisation de l'insuline situé en aval du récepteur à l'insuline, entraîne son inactivation et reflète la résistance à l'insuline. L'hyperphosphorylation de ce site a été montrée dans le tissu cérébral des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (**Moloney et al., 2010**) et récemment dans l'AMS (**Bassil et al., 2017**). Dans le putamen des patients AMS, la présence d'agrégats d' α -syn est corrélée à une augmentation de la phosphorylation Ser312 dans les oligodendrocytes, montrant un possible lien entre l'agrégation de l' α -syn et la résistance à l'insuline en immunofluorescence. Ceci est appuyé par le fait que, dans le striatum des souris PLP-syn, les niveaux de pIRS-1 Ser307 (qui correspond à la pIRS-1 Ser312 humaine) sont environ deux fois plus élevés en comparaison au groupe contrôle. De plus l'activation indirecte de la voie de l'insuline par l'exénatide (un antidiabétique, analogue de GLP-1) diminue cette phosphorylation ainsi que l'accumulation de la forme monomérique de l' α -syn et la neurodégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc (**Bassil et al., 2017**).

Le but de cette troisième stratégie thérapeutique a été d'étudier l'effet d'un acteur connu pour prendre part à la résistance à l'insuline et nous avons dans cette optique modulé l'inhibition de la kinase GRK2. Il a été montré que cette kinase peut phosphoryler IRS-1 in-vitro en Ser307 et que ses niveaux sont augmentés chez les individus présentant un syndrome métabolique et les modèles animaux de diabète. Son inhibition est, de plus, responsable d'une sensibilisation de la voie de signalisation de l'insuline (**voir partie résultats p94-95**).

Dans un premier temps, nous avons mesurés les niveaux de GRK2 dans le tissu cérébral de patients AMS, puis analysé l'effet de son inhibition par une stratégie virale dans le striatum des souris PLP-syn (**voir partie résultats p95-96**).

Les niveaux de GRK2 sont fortement diminués (-84%) dans le putamen des patients AMS, augmentés dans le cortex frontal (2,3 fois plus) et inchangés dans le pont. Tous ces patients ont été diagnostiqués comme présentant un phénotype AMS-P (**voir matériel et méthodes p72**) ; nous nous attendions donc à voir des altérations dans le putamen et potentiellement moins d'effet dans le pont et le cortex frontal. La résistance à l'insuline dans le putamen des patients AMS n'est vraisemblablement pas médiée par GRK2 au vu de sa diminution. Des expériences complémentaires en Western Blot seront effectuées pour déterminer les niveaux de pIRS-1 Ser312 dans le putamen, le cortex frontal et le pont des échantillons des patients AMS de cette étude. De cette manière, nous pourrons les comparer aux résultats obtenus par immunofluorescence dans l'étude de (**Bassil et al., 2017**).

ses niveaux sont diminués dans cette structure. Néanmoins, l'inhibition de GRK2 via la surexpression virale d'un miARN dans le striatum des souris PLP-syn induit une diminution de la résistance à l'insuline striatale et montre un effet neuroprotecteur sur les neurones dopaminergiques de la SNc.

A six semaines de vie, moment où nous débutons les traitements dans les trois projets, la neurodégénérescence des neurones de la SNc n'est pas encore détectable dans le modèle PLP-syn. Sachant que les patients AMS présentent déjà une neurodégénérescence avancée au moment du diagnostic, le plan expérimental que nous utilisons n'est pas parfait pour modéliser la pathologie retrouvée chez ces patients mais se donne les plus grandes chances de montrer un effet. Le modèle PLP-syn ne permet pas d'analyser l'effet d'un traitement une fois la neurodégénérescence amorcée car elle est trop faible pour distinguer un effet progressif. C'est pourquoi la génération de modèles animaux présentant une neurodégénérescence importante et progressive est un point crucial dans la modélisation de l'AMS. Le modèle de rat MBP-syn généré dans notre étude présente ces caractéristiques au niveau des neurones dopaminergiques de la SNc ; il serait donc intéressant de déterminer l'effet des différentes stratégies thérapeutiques sur ce modèle.

Jusqu'ici une seule stratégie thérapeutique utilisée en phase clinique a pu modifier le cours de la maladie (MSC, voir introduction **Tableau 4 p44**) ; il est possible que la pathologie soit déjà trop avancée pour induire un véritable effet curatif. Il serait crucial de découvrir des biomarqueurs qui pourraient potentiellement être utilisés pour diagnostiquer la maladie de manière précoce, à des stades où les traitements potentiels seraient plus adaptés pour infléchir le cours de la maladie.

Partie III : Etude de biomarqueurs d'intérêt dans le LCR et le plasma des patients AMS

Dans cette troisième partie, nous avons cherché à caractériser des biomarqueurs d'intérêt dans le sérum et le LCR de patients AMS et à corréler ces résultats avec les données cliniques reflétant l'avancement de la pathologie. Ces biomarqueurs comprennent : l' α -syn, des marqueurs de la dégénérescence neuronale (NfL, tau), de l'inflammation (GFAP), de la voie de dégradation protéique (UCH-L1), l'insuline et l'hémoglobine (servant de contrôle pour les

mesures d' α -syn), et TREM2. Pour plus de détails sur l'intérêt spécifique de ces marqueurs, voir **partie résultats p104-107**.

Les niveaux de NfL dans le sérum et le LCR sont respectivement 1,7 fois et 3,7 fois plus élevés chez les patients AMS de l'étude AFF009 et BIOAMS en comparaison aux sujets contrôles. Ces résultats sont cohérents avec les différentes études analysant le NfL dans le LCR et le sérum des patients AMS, montrant une nouvelle fois la robustesse de ce marqueur (voir **Tableau 7 C partie résultats p107** et plus récemment (**Wilke et al., 2018, Hansson et al., 2017, Bacioglu et al., 2016**)).

A ce jour, aucune étude n'a rapporté de corrélation entre les concentrations du NfL dans le LCR et les données cliniques ou la durée de maladie de l'AMS (**Hall et al., 2012, Constantinescu et al., 2010, Petzold et al., 2009**), ce qui est cohérent avec nos résultats. En revanche, nous avons observé une corrélation positive entre les niveaux de NfL dans le sérum et le score de l'UMSARS I, ainsi qu'avec l'âge des patients. Ce résultat est en contradiction avec une étude qui n'a pas retrouvé d'effet de l'âge sur les concentrations sanguines de NfL chez les patients AMS de la cohorte de Lund, bien que cet effet apparaisse en prenant en compte tous les groupes étudiés (sujets contrôles, patients MP, AMS et autres MP atypiques) (**Hansson et al., 2017**). Chez les souris transgéniques surexprimant la forme mutée de l' α -syn A53T, les niveaux de NfL augmentent au cours du temps dans le LCR et le plasma avec une forte augmentation déjà visible à 2-4 mois de vie pour le LCR et à 6-8 mois pour le plasma (**Bacioglu et al., 2016**). Ces résultats sont encourageant pour considérer le NfL comme potentiel marqueur précoce des synucléinopathies ; de plus l'étude de (**Hansson et al., 2017**) sur des patients AMS récemment diagnostiqués (0 à 3 ans après le diagnostic), confirme l'élévation du niveau de NfL dans le sang.

Dans le LCR, les niveaux de NfL sont corrélés positivement avec tau, GFAP et UCH-L1. Plusieurs études montrent des niveaux élevés de tau dans le LCR des patients AMS en comparaison aux sujets contrôles (voir **Tableau 7 B** partie résultats p105), le NfL et tau étant tout deux des marqueurs de la dégénérescence neuronale, il n'est pas étonnant de retrouver une corrélation positive entre les deux dans le LCR. La corrélation entre l'astroglie et la neurodégénérescence dans l'AMS a déjà été montrée (**Ozawa et al., 2004**), ce qui est cohérent avec la corrélation positive dans le LCR des niveaux de NfL et GFAP, dont la concentration dans le LCR est connue pour refléter l'activation de l'astroglie (**Dotevall et al., 1996**). A ce jour aucune étude n'a montré de modification des niveaux de GFAP dans le LCR des patients

AMS en comparaison aux sujets contrôles (**Constantinescu et al., 2010**) ; ici nous montrons une possible corrélation entre les marqueurs de la dégénérescence neuronale et astrogliaux, les niveaux de tau étant également corrélés positivement à ceux de GFAP. Les niveaux de UCH-L1 dans le LCR sont également corrélés positivement avec ces trois autres marqueurs ; la seule étude qui a déterminé les niveaux d'UCH-L1 dans le LCR des patients AMS ayant montré une diminution de ces derniers en comparaison à un groupe contrôle, (**Mondello et al., 2014**), il reste difficile de statuer sur son potentiel intérêt.

Les niveaux de NfL dans le sérum sont corrélés négativement avec les niveaux d'insuline chez les patients AMS. La source primaire d'insuline cérébrale étant celle synthétisée par le pancréas (**Bassil et al., 2014**), des niveaux diminués d'insuline périphérique pourraient être liés à une possible diminution de son effet neurotrophique, ce qui pourrait expliquer sa corrélation négative avec un marqueur de la neurodégénérescence. Les niveaux d'insuline sont aussi corrélés négativement avec le marqueur GFAP, ce qui montre un possible lien entre la voie de l'insuline et la régulation de la neuroinflammation dans l'AMS. Dans le LCR, le GFAP étant le seul marqueur qui soit corrélé positivement avec l'âge des patients dans notre étude, il est possible que le vieillissement ait un impact sur l'activité astrogliale dans l'AMS, bien que l'étude de (**Constantinescu et al., 2010**) n'ait pas montré cet effet dans une autre cohorte de patients AMS ; des expériences complémentaires seraient nécessaires pour confirmer ou infirmer cet effet.

L' α -syn dans le sérum des patients AMS ne corrèle positivement qu'avec les niveaux d'hémoglobine. L' α -syn étant fortement exprimée dans les érythrocytes (**Barbour et al., 2008**), il semble que la contamination de ces derniers ne permette pas d'analyser les niveaux d' α -syn sériques sans biais. Dans le LCR, les niveaux d' α -syn sont négativement corrélés à la durée de la maladie et l'UMSARS II. La plupart des études ayant analysé la durée et la sévérité de la maladie ne permettent pas de penser que les niveaux d' α -syn du LCR sont corrélés avec ces données cliniques (**Hall et al., 2012, Mollenhauer et al., 2011, Mondello et al., 2014**) ; une seule a montré une corrélation positive avec le score Hoehn et Yahr (**Aerts et al., 2012**). Trop peu d'études ont été menées en prenant en compte les données cliniques et en les corrélant aux différents biomarqueurs potentiels de l'AMS, ce qui est explicable par la très faible prévalence de cette maladie. La majorité des études montrant une diminution de l' α -syn dans le LCR des patients AMS en comparaison à des sujets contrôles, notre résultat suggère que les niveaux d' α -syn du LCR diminuent possiblement au cours du développement de la maladie, mais de

nouvelles études longitudinales sont nécessaires pour confirmer ou non ce résultat. Le mécanisme de cette possible diminution étant inconnu, il nous est difficile d'interpréter les corrélations positives que nous avons mesurés entre les niveaux d' α -syn et des protéines GFAP, tau, UCH-L1 et TREM2 dans le LCR.

Une étude enrôlant de nombreux patients AMS sera nécessaire pour évaluer plus en profondeur la relation entre le Nfl, ainsi que les autres biomarqueurs d'intérêts, et les données cliniques.

CONCLUSION

Un des projets auquel j'ai participé pendant mon doctorat a permis la génération et la caractérisation d'un nouveau modèle murin prometteur pour l'étude des mécanismes pathologiques de l'AMS. Suite à une injection stéréotaxique adénovirale dans le striatum, ce modèle de rat surexprime l' α -syn de manière préférentielle au niveau des oligodendrocytes ce qui induit :

- Une dysfonction motrice progressive qui n'est pas sensible à l'administration de L-Dopa,
- Une agrégation pathologique de l' α -syn dans le striatum et la SNc,
- Une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la SNc et plus tardivement des neurones striataux.

Cette stratégie a été reproduite dans un modèle de primate non humain. Cependant, elle présente une expression moins spécifique de l' α -syn dans les oligodendrocytes qui n'induit pas de neurodégénérescence des neurones striataux ou de la SNc. Ceci démontre l'importance du choix du virus et du promoteur selon les différentes espèces animales.

Le second objectif principal de ma thèse a été d'étudier l'effet de stratégies thérapeutiques ciblant l'agrégation de l' α -syn et la résistance à l'insuline, caractéristiques pathologiques de l'AMS, sur l'accumulation de l' α -syn oligodendrogliale et la neurodégénérescence que présente le modèle de souris transgénique PLP-syn.

- La rapamycine, inhibiteur de mTORC1, lui-même connu pour sa régulation négative de l'autophagie, a montré un discret effet neuroprotecteur sur la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc qui est possiblement lié à la diminution de la forme agrégée de l' α -syn dans le striatum.
- Le nilotinib, composé qui a montré un effet sur la dégradation de l' α -syn in-vitro et in-vivo dans des modèles de la MP, induit une diminution de la forme monomérique de l' α -syn dans le striatum. En revanche, il n'a pas d'effet sur la forme agrégée de l' α -syn ni sur la perte des neurones dopaminergiques de la SNc.
- L'inhibition de la kinase GRK2, impliquée dans la résistance à l'insuline protège les neurones dopaminergiques de la SNc.
- L'analyse de tissu putaminal de patients AMS a montré une diminution majeure des niveaux protéiques de mTOR et de GRK2 en comparaison aux sujets sains. Il est donc peu probable que ces protéines soient impliquées, respectivement, dans l'agrégation pathologique de l' α -syn et la résistance à l'insuline au niveau du putamen dans les stades avancés de la maladie. Néanmoins, ces études montrent que la modulation de la dégradation protéique et l'inhibition de la résistance à l'insuline sont potentiellement responsables d'un effet neuroprotecteur ; il est maintenant important de découvrir des acteurs spécifiques de ces voies qui pourraient être ciblés dans l'AMS.

L'analyse du NfL dans le LCR et le sérum de patients AMS a confirmé sa robustesse en tant que potentiel biomarqueur dans l'AMS. Nous avons montré qu'il corrélait positivement avec les données cliniques (UMSARS I et durée de maladie), ainsi qu'avec des marqueurs de la neurodégénérescence (tau) et de l'astrogliose (GFAP), ce qui est cohérent avec les phénomènes pathologiques mesurés dans le tissu cérébral des patients AMS.

Nous avons également mis en évidence une possible relation entre la dégénérescence neuronale et la diminution des niveaux d'insuline sérique, renforçant l'idée d'une dérégulation de la voie de l'insuline.

RÉFÉRENCES

- ABATI, E., DI FONZO, A. & CORTI, S. 2018. In vitro models of multiple system atrophy from primary cells to induced pluripotent stem cells. *J Cell Mol Med*, 22, 2536-2546.
- ADAMS R, V. B. L., VAN DER ECKEN H 1961. Dégénérescences nigro-striées et cerebello-nigro-striées. *Psychiat Neurol*.
- AERTS, M. B., ESSELINK, R. A., ABDO, W. F., BLOEM, B. R. & VERBEEK, M. M. 2012. CSF alpha-synuclein does not differentiate between parkinsonian disorders. *Neurobiol Aging*, 33, 430 e1-3.
- 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. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 38, 4-24.
- AHN, B. H., RHIM, H., KIM, S. Y., SUNG, Y. M., LEE, M. Y., CHOI, J. Y., WOLOZIN, B., CHANG, J. S., LEE, Y. H., KWON, T. K., CHUNG, K. C., YOON, S. H., HAHN, S. J., KIM, M. S., JO, Y. H. & MIN, D. S. 2002. alpha-Synuclein interacts with phospholipase D isozymes and inhibits pervanadate-induced phospholipase D activation in human embryonic kidney-293 cells. *J Biol Chem*, 277, 12334-42.
- ALBERT, K., VOUTILAINEN, M. H., DOMANSKYI, A. & AIRAVAARA, M. 2017. AAV Vector-Mediated Gene Delivery to Substantia Nigra Dopamine Neurons: Implications for Gene Therapy and Disease Models. *Genes (Basel)*, 8.
- AMARAL, A. I., TAVARES, J. M., SONNEWALD, U. & KOTTER, M. R. 2016. Oligodendrocytes: Development, Physiology and Glucose Metabolism. *Adv Neurobiol*, 13, 275-294.
- ARAI, K., KATO, N., KASHIWADO, K. & HATTORI, T. 2000. Pure autonomic failure in association with human alpha-synucleinopathy. *Neurosci Lett*, 296, 171-3.
- ARMSTRONG, R. A., CAIRNS, N. J. & LANTOS, P. L. 2006. Multiple system atrophy (MSA): topographic distribution of the alpha-synuclein-associated pathological changes. *Parkinsonism Relat Disord*, 12, 356-62.
- ASHOUR, R., TINTNER, R. & JANKOVIC, J. 2005. Striatal deformities of the hand and foot in Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, 4, 423-31.
- ASI, Y. T., SIMPSON, J. E., HEATH, P. R., WHARTON, S. B., LEES, A. J., REVESZ, T., HOULDEN, H. & HOLTON, J. L. 2014. Alpha-synuclein mRNA expression in oligodendrocytes in MSA. *Glia*, 62, 964-70.
- AUZOU, N., DUJARDIN, K., BIUNDO, R., FOUBERT-SAMIER, A., BARTH, C., DUVAL, F., TISON, F., DEFEBVRE, L., ANTONINI, A. & MEISSNER, W. G. 2015. Diagnosing dementia in multiple system atrophy by applying Movement Disorder Society diagnostic criteria for Parkinson's disease dementia. *Parkinsonism Relat Disord*, 21, 1273-7.
- BACIOGLU, M., MAIA, L. F., PREISCHE, O., SCHELLE, J., APEL, A., KAESER, S. A., SCHWEIGHAUSER, M., ENINGER, T., LAMBERT, M., PILOTTO, A., SHIMSHEK, D. R., NEUMANN, U., KAHLE, P. J., STAUFENBIEL, M., NEUMANN, M., MAETZLER, W., KUHLE, J. & JUCKER, M. 2016. Neurofilament Light Chain in Blood and CSF as Marker of Disease Progression in Mouse Models and in Neurodegenerative Diseases. *Neuron*, 91, 56-66.
- BANKS, W. A., JASPAN, J. B., HUANG, W. & KASTIN, A. J. 1997. Transport of insulin across the blood-brain barrier: saturability at euglycemic doses of insulin. *Peptides*, 18, 1423-9.
- BAPTISTA, M. J., O'FARRELL, C., DAYA, S., AHMAD, R., MILLER, D. W., HARDY, J., FARRER, M. J. & COOKSON, M. R. 2003. Co-ordinate transcriptional regulation of dopamine synthesis genes by alpha-synuclein in human neuroblastoma cell lines. *J Neurochem*, 85, 957-68.

- BARBOUR, R., KLING, K., ANDERSON, J. P., BANDUCCI, K., COLE, T., DIEP, L., FOX, M., GOLDSTEIN, J. M., SORIANO, F., SEUBERT, P. & CHILCOTE, T. J. 2008. Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood. *Neurodegener Dis*, 5, 55-9.
- BASSIL, F., CANRON, M. H., VITAL, A., BEZARD, E., LI, Y., GREIG, N. H., GULYANI, S., KAPOGIANNIS, D., FERNAGUT, P. O. & MEISSNER, W. G. 2017. Insulin resistance and exendin-4 treatment for multiple system atrophy. *Brain*, 140, 1420-1436.
- 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? *Prog Neurobiol*, 118, 1-18.
- BASSIL, F., FERNAGUT, P. O., BEZARD, E., PRUVOST, A., LESTE-LASSERRE, T., HOANG, Q. Q., RINGE, D., PETSKO, G. A. & MEISSNER, W. G. 2016. Reducing C-terminal truncation mitigates synucleinopathy and neurodegeneration in a transgenic model of multiple system atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 9593-8.
- BENARROCH, E. E., SCHMEICHEL, A. M., LOW, P. A. & PARISI, J. E. 2010. Differential involvement of the periaqueductal gray in multiple system atrophy. *Auton Neurosci*, 158, 111-7.
- BENARROCH, E. E., SCHMEICHEL, A. M., SANDRONI, P., LOW, P. A. & PARISI, J. E. 2006a. Differential involvement of hypothalamic vasopressin neurons in multiple system atrophy. *Brain*, 129, 2688-96.
- BENARROCH, E. E., SCHMEICHEL, A. M., SANDRONI, P., LOW, P. A. & PARISI, J. E. 2006b. Involvement of vagal autonomic nuclei in multiple system atrophy and Lewy body disease. *Neurology*, 66, 378-83.
- BENARROCH, E. E., SMITHSON, I. L., LOW, P. A. & PARISI, J. E. 1998. Depletion of catecholaminergic neurons of the rostral ventrolateral medulla in multiple systems atrophy with autonomic failure. *Ann Neurol*, 43, 156-63.
- BENATRU, I., VAUGOYEAU, M. & AZULAY, J. P. 2008. Postural disorders in Parkinson's disease. *Neurophysiol Clin*, 38, 459-65.
- BERARDELLI, A., ROTHWELL, J. C., THOMPSON, P. D. & HALLETT, M. 2001. Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease. *Brain*, 124, 2131-46.
- BJORNSDOTTIR, A., GUDMUNDSSON, G., BLONDAL, H. & OLAFSSON, E. 2013. Incidence and prevalence of multiple system atrophy: a nationwide study in Iceland. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 84, 136-40.
- BLEASEL, J. M., WONG, J. H., HALLIDAY, G. M. & KIM, W. S. 2014. Lipid dysfunction and pathogenesis of multiple system atrophy. *Acta Neuropathol Commun*, 2, 15.
- BOUDES, M., UVIN, P., PINTO, S., VOETS, T., FOWLER, C. J., WENNING, G. K., DE RIDDER, D. & STEFANOVA, N. 2013. Bladder dysfunction in a transgenic mouse model of multiple system atrophy. *Mov Disord*, 28, 347-55.
- BOURDENX, M. & DEHAY, B. 2016. What lysosomes actually tell us about Parkinson's disease? *Ageing Res Rev*, 32, 140-149.
- BOVE, J., MARTINEZ-VICENTE, M. & VILA, M. 2011. Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights. *Nat Rev Neurosci*, 12, 437-52.
- BOWER, J. H., MARAGANORE, D. M., MCDONNELL, S. K. & ROCCA, W. A. 1997. Incidence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy in Olmsted County, Minnesota, 1976 to 1990. *Neurology*, 49, 1284-8.
- BRAHMACHARI, S., GE, P., LEE, S. H., KIM, D., KARUPPAGOUNDER, S. S., KUMAR, M., MAO, X., SHIN, J. H., LEE, Y., PLETNIKOVA, O., TRONCOSO, J. C., DAWSON, V. L., DAWSON, T. M. & KO, H. S. 2016. Activation of tyrosine kinase c-Abl contributes to alpha-synuclein-induced neurodegeneration. *J Clin Invest*, 126, 2970-88.
- BRENNEIS, C., BOESCH, S. M., EGGER, K. E., SEPPI, K., SCHERFLER, C., SCHOCKE, M., WENNING, G. K. & POEWE, W. 2006. Cortical atrophy in the cerebellar variant of multiple system atrophy: a voxel-based morphometry study. *Mov Disord*, 21, 159-65.
- BRUDEK, T., WINGE, K., RASMUSSEN, N. B., BAHL, J. M., TANASSI, J., AGANDER, T. K., HYDE, T. M. & PAKKENBERG, B. 2016. Altered alpha-synuclein, parkin, and synphilin isoform levels in multiple system atrophy brains. *J Neurochem*, 136, 172-85.

- BUKHATWA, S., ZENG, B. Y., ROSE, S. & JENNER, P. 2010. A comparison of changes in proteasomal subunit expression in the substantia nigra in Parkinson's disease, multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy. *Brain Res*, 1326, 174-83.
- BURRE, J. 2015. The Synaptic Function of alpha-Synuclein. *J Parkinsons Dis*, 5, 699-713.
- BURRE, J., SHARMA, M., TSETSENIS, T., BUCHMAN, V., ETHERTON, M. R. & SUDHOF, T. C. 2010. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science*, 329, 1663-7.
- BUTLER, B., GOODWIN, S., SAHA, K., BECKER, J., SAMBO, D., DAVARI, P. & KHOSHBOUEI, H. 2015. Dopamine Transporter Activity Is Modulated by alpha-synuclein. *J Biol Chem*.
- CHANDRA, S., FORNAI, F., KWON, H. B., YAZDANI, U., ATASOY, D., LIU, X., HAMMER, R. E., BATTAGLIA, G., GERMAN, D. C., CASTILLO, P. E. & SUDHOF, T. C. 2004. Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 14966-71.
- CHEN, R. H., WISLET-GENDEBIEN, S., SAMUEL, F., VISANJI, N. P., ZHANG, G., MARSILIO, D., LANGMAN, T., FRASER, P. E. & TANDON, A. 2013. alpha-Synuclein membrane association is regulated by the Rab3a recycling machinery and presynaptic activity. *J Biol Chem*, 288, 7438-49.
- CHIU, S. L. & CLINE, H. T. 2010. Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. *Neural Dev*, 5, 7.
- CHRYSOSTOME, V., TISON, F., YEKHLEF, F., SOURGEN, C., BALDI, I. & DARTIGUES, J. F. 2004. Epidemiology of multiple system atrophy: a prevalence and pilot risk factor study in Aquitaine, France. *Neuroepidemiology*, 23, 201-8.
- CICCARELLI, M., CHUPRUN, J. K., RENGO, G., GAO, E., WEI, Z., PEROUTKA, R. J., GOLD, J. I., GUMPERT, A., CHEN, M., OTIS, N. J., DORN, G. W., 2ND, TRIMARCO, B., IACCARINO, G. & KOCH, W. J. 2011. G protein-coupled receptor kinase 2 activity impairs cardiac glucose uptake and promotes insulin resistance after myocardial ischemia. *Circulation*, 123, 1953-62.
- COLOSIMO, C. 2011. Nonmotor presentations of multiple system atrophy. *Nat Rev Neurol*, 7, 295-8.
- CONSTANTINESCU, R., ROSENGREN, L., JOHNELS, B., ZETTERBERG, H. & HOLMBERG, B. 2010. Consecutive analyses of cerebrospinal fluid axonal and glial markers in Parkinson's disease and atypical Parkinsonian disorders. *Parkinsonism Relat Disord*, 16, 142-5.
- COON, E. A., FEALEY, R. D., SLETTEN, D. M., MANDREKAR, J. N., BENARROCH, E. E., SANDRONI, P., LOW, P. A. & SINGER, W. 2017. Anhidrosis in multiple system atrophy involves pre- and postganglionic sudomotor dysfunction. *Mov Disord*, 32, 397-404.
- 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, 1048-59.
- CREWS, L., SPENCER, B., DESPLATS, P., PATRICK, C., PAULINO, A., ROCKENSTEIN, E., HANSEN, L., ADAME, A., GALASKO, D. & MASLIAH, E. 2010. Selective molecular alterations in the autophagy pathway in patients with Lewy body disease and in models of alpha-synucleinopathy. *PLoS One*, 5, e9313.
- DA ROCHA, A. J., MAIA, A. C., JR., DA SILVA, C. J., BRAGA, F. T., FERREIRA, N. P., BARSOTTINI, O. G. & FERRAZ, H. B. 2007. Pyramidal tract degeneration in multiple system atrophy: the relevance of magnetization transfer imaging. *Mov Disord*, 22, 238-44.
- DAUER, W. & PRZEDBORSKI, S. 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39, 889-909.
- DEHAY, B., BOURDENX, M., GORRY, P., PRZEDBORSKI, S., VILA, M., HUNOT, S., SINGLETON, A., OLANOW, C. W., MERCHANT, K. M., BEZARD, E., PETSKO, G. A. & MEISSNER, W. G. 2015. Targeting alpha-synuclein for treatment of Parkinson's disease: mechanistic and therapeutic considerations. *Lancet Neurol*, 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. *J Neurosci*, 30, 12535-44.
- DEHAY, B. & FERNAGUT, P. O. 2016. Alpha-synuclein-based models of Parkinson's disease. *Rev Neurol (Paris)*, 172, 371-8.

- 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. *Mov Disord*, 28, 725-32.
- DEJERINE J, T. A. 1900. L'atrophie olivo-ponto-cérébelleuse. *Nouvelle Iconographie de la Salpêtrière*, 424-427.
- DEREMER, D. L., USTUN, C. & NATARAJAN, K. 2008. Nilotinib: a second-generation tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin Ther*, 30, 1956-75.
- DESPLATS, P., LEE, H. J., BAE, E. J., PATRICK, C., ROCKENSTEIN, E., CREWS, L., SPENCER, B., MASLIAH, E. & LEE, S. J. 2009. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 13010-5.
- DEWIRE, S. M., AHN, S., LEFKOWITZ, R. J. & SHENOY, S. K. 2007. Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol*, 69, 483-510.
- DJELLOUL, M., HOLMQVIST, S., BOZA-SERRANO, A., AZEVEDO, C., YEUNG, M. S., GOLDWURM, S., FRISEN, J., DEIERBORG, T. & ROYBON, L. 2015. Alpha-Synuclein Expression in the Oligodendrocyte Lineage: an In Vitro and In Vivo Study Using Rodent and Human Models. *Stem Cell Reports*, 5, 174-84.
- DON, A. S., HSIAO, J. H., BLEASEL, J. M., COUTTAS, T. A., HALLIDAY, G. M. & KIM, W. S. 2014. Altered lipid levels provide evidence for myelin dysfunction in multiple system atrophy. *Acta Neuropathol Commun*, 2, 150.
- DOTEVALL, L., ROSENGREN, L. E. & HAGBERG, L. 1996. Increased cerebrospinal fluid levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in Lyme neuroborreliosis. *Infection*, 24, 125-9.
- DOU, J. T., CHEN, M., DUFOUR, F., ALKON, D. L. & ZHAO, W. Q. 2005. Insulin receptor signaling in long-term memory consolidation following spatial learning. *Learn Mem*, 12, 646-55.
- EBRAHIMI-FAKHARI, D., WAHLSTER, L. & MCLEAN, P. J. 2012. Protein degradation pathways in Parkinson's disease: curse or blessing. *Acta Neuropathol*, 124, 153-72.
- EMAMZADEH, F. N. 2016. Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. *J Res Med Sci*, 21, 29.
- ETTLE, B., REIPRICH, S., DEUSSER, J., SCHLACHETZKI, J. C., XIANG, W., PROTS, I., MASLIAH, E., WINNER, B., WEGNER, M. & WINKLER, J. 2014. Intracellular alpha-synuclein affects early maturation of primary oligodendrocyte progenitor cells. *Mol Cell Neurosci*, 62, 68-78.
- FANCIULLI, A. & WENNING, G. K. 2015. Multiple-system atrophy. *N Engl J Med*, 372, 1375-6.
- FELLNER, L., JELLINGER, K. A., WENNING, G. K. & STEFANOVA, N. 2011. Glial dysfunction in the pathogenesis of alpha-synucleinopathies: emerging concepts. *Acta Neuropathol*, 121, 675-93.
- FERINI-STRAMBI, L. & MARELLI, S. 2012. Sleep dysfunction in multiple system atrophy. *Curr Treat Options Neurol*, 14, 464-73.
- FERNAGUT, P. O., MEISSNER, W. G., BIRAN, M., FANTIN, M., BASSIL, F., FRANCONI, J. M. & TISON, F. 2014. Age-related motor dysfunction and neuropathology in a transgenic mouse model of multiple system atrophy. *Synapse*, 68, 98-106.
- FERNAGUT, P. O. & TISON, F. 2012. Animal models of multiple system atrophy. *Neuroscience*, 211, 77-82.
- FLABEAU, O., MEISSNER, W. G., OZIER, A., BERGER, P., TISON, F. & FERNAGUT, P. O. 2014. Breathing variability and brainstem serotonergic loss in a genetic model of multiple system atrophy. *Mov Disord*, 29, 388-95.
- FLEMING, S. M., EKHATOR, O. R. & GHISAYS, V. 2013. Assessment of sensorimotor function in mouse models of Parkinson's disease. *J Vis Exp*.
- FOK, W. C., CHEN, Y., BOKOV, A., ZHANG, Y., SALMON, A. B., DIAZ, V., JAVORS, M., WOOD, W. H., 3RD, ZHANG, Y., BECKER, K. G., PEREZ, V. I. & RICHARDSON, A. 2014. Mice fed rapamycin have an increase in lifespan associated with major changes in the liver transcriptome. *PLoS One*, 9, e83988.
- FRAKE, R. A., RICKETTS, T., MENZIES, F. M. & RUBINSZTEIN, D. C. 2015. Autophagy and neurodegeneration. *J Clin Invest*, 125, 65-74.

- FUJISHIRO, H., AHN, T. B., FRIGERIO, R., DELLEDONNE, A., JOSEPHS, K. A., PARISI, J. E., ERIC AHLKOG, J. & DICKSON, D. W. 2008. Glial cytoplasmic inclusions in neurologically normal elderly: prodromal multiple system atrophy? *Acta Neuropathol*, 116, 269-75.
- 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. *Nat Cell Biol*, 4, 160-4.
- FURUKAWA, Y., VIGOUROUX, S., WONG, H., GUTTMAN, M., RAJPUT, A. H., ANG, L., BRIAND, M., KISH, S. J. & BRIAND, Y. 2002. Brain proteasomal function in sporadic Parkinson's disease and related disorders. *Ann Neurol*, 51, 779-82.
- GAI, W. P., POUNTNEY, D. L., POWER, J. H., LI, Q. X., CULVENOR, J. G., MCLEAN, C. A., JENSEN, P. H. & BLUMBERGS, P. C. 2003. alpha-Synuclein fibrils constitute the central core of oligodendroglial inclusion filaments in multiple system atrophy. *Exp Neurol*, 181, 68-78.
- GALVIN, J. E., LEE, V. M. & TROJANOWSKI, J. Q. 2001. Synucleinopathies: clinical and pathological implications. *Arch Neurol*, 58, 186-90.
- GILMAN, S., MAY, S. J., SHULTS, C. W., TANNER, C. M., KUKULL, W., LEE, V. M., MASLIAH, E., LOW, P., SANDRONI, P., TROJANOWSKI, J. Q., OZELIUS, L., FOROUD, T. & NORTH AMERICAN MULTIPLE SYSTEM ATROPHY STUDY, G. 2005. The North American Multiple System Atrophy Study Group. *J Neural Transm (Vienna)*, 112, 1687-94.
- GILMAN, S., WENNING, G. K., LOW, P. A., BROOKS, D. J., MATHIAS, C. J., TROJANOWSKI, J. Q., WOOD, N. W., COLOSIMO, C., DURR, A., FOWLER, C. J., KAUFMANN, H., KLOCKGETHER, T., LEES, A., POEWE, W., QUINN, N., REVESZ, T., ROBERTSON, D., SANDRONI, P., SEPPI, K. & VIDAILHET, M. 2008. Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology*, 71, 670-6.
- GOLDSTEIN, D. S., HOLMES, C., KOPIN, I. J. & SHARABI, Y. 2011. Intra-neuronal vesicular uptake of catecholamines is decreased in patients with Lewy body diseases. *J Clin Invest*, 121, 3320-30.
- GOODALL, M. & THORBURN, A. 2014. Identifying specific receptors for cargo-mediated autophagy. *Cell Res*, 24, 783-4.
- GOVIND, S., KOZMA, R., MONFRIES, C., LIM, L. & AHMED, S. 2001. Cdc42Hs facilitates cytoskeletal reorganization and neurite outgrowth by localizing the 58-kD insulin receptor substrate to filamentous actin. *J Cell Biol*, 152, 579-94.
- GRAHAM, J. G. & OPPENHEIMER, D. R. 1969. Orthostatic hypotension and nicotine sensitivity in a case of multiple system atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 32, 28-34.
- GUO, J. T., CHEN, A. Q., KONG, Q., ZHU, H., MA, C. M. & QIN, C. 2008. Inhibition of vesicular monoamine transporter-2 activity in alpha-synuclein stably transfected SH-SY5Y cells. *Cell Mol Neurobiol*, 28, 35-47.
- HALL, S., OHRFELT, A., CONSTANTINESCU, R., ANDREASSON, U., SUROVA, Y., BOSTROM, F., NILSSON, C., HAKAN, W., DECRAEMER, H., NAGGA, K., MINTHON, L., LONDOS, E., VANMECHELEN, E., HOLMBERG, B., ZETTERBERG, H., BLENNOW, K. & HANSSON, O. 2012. Accuracy of a panel of 5 cerebrospinal fluid biomarkers in the differential diagnosis of patients with dementia and/or parkinsonian disorders. *Arch Neurol*, 69, 1445-52.
- HANSSON, O., JANELIDZE, S., HALL, S., MAGDALINO, N., LEES, A. J., ANDREASSON, U., NORGRÉN, N., LINDER, J., FORSGREN, L., CONSTANTINESCU, R., ZETTERBERG, H., BLENNOW, K. & SWEDISH BIO, F. S. 2017. Blood-based NfL: A biomarker for differential diagnosis of parkinsonian disorder. *Neurology*, 88, 930-937.
- HANTSCH, O. 2012. Structure, regulation, signaling, and targeting of abl kinases in cancer. *Genes Cancer*, 3, 436-46.
- HARADA, H., ANDERSEN, J. S., MANN, M., TERADA, N. & KORSMEYER, S. J. 2001. p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 9666-70.
- HARRISON, D. E., STRONG, R., SHARP, Z. D., NELSON, J. F., ASTLE, C. M., FLURKEY, K., NADON, N. L., WILKINSON, J. E., FRENKEL, K., CARTER, C. S., PAHOR, M., JAVORS, M. A., FERNANDEZ, E. &

- MILLER, R. A. 2009. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, 460, 392-5.
- HARTNER, L., KEIL, T. W., KREUZER, M., FRITZ, E. M., WENNING, G. K., STEFANOVA, N. & FENZL, T. 2016. Distinct Parameters in the EEG of the PLP alpha-SYN Mouse Model for Multiple System Atrophy Reinforce Face Validity. *Front Behav Neurosci*, 10, 252.
- HEBRON, M. L., LONSKAYA, I. & MOUSSA, C. E. 2013. Nilotinib reverses loss of dopamine neurons and improves motor behavior via autophagic degradation of alpha-synuclein in Parkinson's disease models. *Hum Mol Genet*, 22, 3315-28.
- IMAM, S. Z., ZHOU, Q., YAMAMOTO, A., VALENTE, A. J., ALI, S. F., BAINS, M., ROBERTS, J. L., KAHLE, P. J., CLARK, R. A. & LI, S. 2011. Novel regulation of parkin function through c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation: implications for Parkinson's disease. *J Neurosci*, 31, 157-63.
- INGELSSON, M. 2016. Alpha-Synuclein Oligomers-Neurotoxic Molecules in Parkinson's Disease and Other Lewy Body Disorders. *Front Neurosci*, 10, 408.
- INOUE, M., YAGISHITA, S., RYO, M., HASEGAWA, K., AMANO, N. & MATSUSHITA, M. 1997. The distribution and dynamic density of oligodendroglial cytoplasmic inclusions (GCI) in multiple system atrophy: a correlation between the density of GCIs and the degree of involvement of striatonigral and olivopontocerebellar systems. *Acta Neuropathol*, 93, 585-91.
- ISHIZAWA, K., KOMORI, T., ARAI, N., MIZUTANI, T. & HIROSE, T. 2008. Glial cytoplasmic inclusions and tissue injury in multiple system atrophy: A quantitative study in white matter (olivopontocerebellar system) and gray matter (nigrostriatal system). *Neuropathology*, 28, 249-57.
- ISHIZAWA, K., KOMORI, T., SASAKI, S., ARAI, N., MIZUTANI, T. & HIROSE, T. 2004. Microglial activation parallels system degeneration in multiple system atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol*, 63, 43-52.
- JAKEL, S. & DIMOU, L. 2017. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Front Cell Neurosci*, 11, 24.
- JAKES, R., SPILLANTINI, M. G. & GOEDERT, M. 1994. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett*, 345, 27-32.
- JANKOVIC, J. 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79, 368-76.
- JECMENICA-LUKIC, M., POEWE, W., TOLOSA, E. & WENNING, G. K. 2012. Premotor signs and symptoms of multiple system atrophy. *Lancet Neurol*, 11, 361-8.
- JIN, H., ISHIKAWA, K., TSUNEMI, T., ISHIGURO, T., AMINO, T. & MIZUSAWA, H. 2008. Analyses of copy number and mRNA expression level of the alpha-synuclein gene in multiple system atrophy. *J Med Dent Sci*, 55, 145-53.
- JUNG, C. H., RO, S. H., CAO, J., OTTO, N. M. & KIM, D. H. 2010. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett*, 584, 1287-95.
- KAHLE, P. J., NEUMANN, M., OZMEN, L., MULLER, V., JACOBSEN, H., SPOOREN, W., FUSS, B., MALLON, B., MACKLIN, W. B., FUJIWARA, H., HASEGAWA, M., IWATSUBO, T., KRETZSCHMAR, H. A. & HAASS, C. 2002. Hyperphosphorylation and insolubility of alpha-synuclein in transgenic mouse oligodendrocytes. *EMBO Rep*, 3, 583-8.
- KARUPPAGOUNDER, S. S., BRAHMACHARI, S., LEE, Y., DAWSON, V. L., DAWSON, T. M. & KO, H. S. 2014. The c-Abl inhibitor, nilotinib, protects dopaminergic neurons in a preclinical animal model of Parkinson's disease. *Sci Rep*, 4, 4874.
- KAUFMANN, H., NORCLIFFE-KAUFMANN, L., PALMA, J. A., BIAGGIONI, I., LOW, P. A., SINGER, W., GOLDSTEIN, D. S., PELTIER, A. C., SHIBAO, C. A., GIBBONS, C. H., FREEMAN, R., ROBERTSON, D. & AUTONOMIC DISORDERS, C. 2017. Natural history of pure autonomic failure: A United States prospective cohort. *Ann Neurol*, 81, 287-297.
- KAWAMOTO, Y., KOBAYASHI, Y., SUZUKI, Y., INOUE, H., TOMIMOTO, H., AKIGUCHI, I., BUDKA, H., MARTINS, L. M., DOWNWARD, J. & TAKAHASHI, R. 2008. Accumulation of HtrA2/Omi in neuronal and glial inclusions in brains with alpha-synucleinopathies. *J Neuropathol Exp Neurol*, 67, 984-93.

- KIM, J., KUNDU, M., VIOLLET, B. & GUAN, K. L. 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 13, 132-41.
- KLEGERIS, A., PELECH, S., GIASSON, B. I., MAGUIRE, J., ZHANG, H., MCGEER, E. G. & MCGEER, P. L. 2008. Alpha-synuclein activates stress signaling protein kinases in THP-1 cells and microglia. *Neurobiol Aging*, 29, 739-52.
- KLIONSKY, D. J., MEIJER, A. J. & CODOGNO, P. 2005. Autophagy and p70S6 kinase. *Autophagy*, 1, 59-60; discussion 60-1.
- KLUCKEN, J., POEHLER, A. M., EBRAHIMI-FAKHARI, D., SCHNEIDER, J., NUBER, S., ROCKENSTEIN, E., SCHLOTZER-SCHREHARDT, U., HYMAN, B. T., MCLEAN, P. J., MASLIAH, E. & WINKLER, J. 2012. Alpha-synuclein aggregation involves a bafilomycin A 1-sensitive autophagy pathway. *Autophagy*, 8, 754-66.
- KO, H. S., LEE, Y., SHIN, J. H., KARUPPAGOUNDER, S. S., GADAD, B. S., KOLESKE, A. J., PLETNIKOVA, O., TRONCOSO, J. C., DAWSON, V. L. & DAWSON, T. M. 2010. Phosphorylation by the c-Abl protein tyrosine kinase inhibits parkin's ubiquitination and protective function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 16691-6.
- KOLLENSPERGER, M., GESER, F., NDAYISABA, J. P., BOESCH, S., SEPPI, K., OSTERGAARD, K., DUPONT, E., CARDOZO, A., TOLOSA, E., ABELE, M., KLOCKGETHER, T., YEKHLEF, F., TISON, F., DANIELS, C., DEUSCHL, G., COELHO, M., SAMPAIO, C., BOZI, M., QUINN, N., SCHRAG, A., MATHIAS, C. J., FOWLER, C., NILSSON, C. F., WIDNER, H., SCHIMKE, N., OERTEL, W., DEL SORBO, F., ALBANESE, A., PELLECCIA, M. T., BARONE, P., DJALDETTI, R., COLOSIMO, C., MECO, G., GONZALEZ-MANDLY, A., BERCIANO, J., GUREVICH, T., GILADI, N., GALITZKY, M., RASCOL, O., KAMM, C., GASSER, T., SIEBERT, U., POEWE, W., WENNING, G. K. & EMSA, S. G. 2010. Presentation, diagnosis, and management of multiple system atrophy in Europe: final analysis of the European multiple system atrophy registry. *Mov Disord*, 25, 2604-12.
- 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. *Nat Med*, 14, 504-6.
- KRAGH, C. L., FILLON, G., GYSBERS, A., HANSEN, H. D., NEUMANN, M., RICHTER-LANDSBERG, C., HAASS, C., ZALC, B., LUBETZKI, C., GAI, W. P., HALLIDAY, G. M., KAHLE, P. J. & JENSEN, P. H. 2013. FAS-dependent cell death in alpha-synuclein transgenic oligodendrocyte models of multiple system atrophy. *PLoS One*, 8, e55243.
- KRAUS, P. H., LEMKE, M. R. & REICHMANN, H. 2006. Kinetic tremor in Parkinson's disease--an underrated symptom. *J Neural Transm (Vienna)*, 113, 845-53.
- KRISMER, F. & WENNING, G. K. 2017. Multiple system atrophy: insights into a rare and debilitating movement disorder. *Nat Rev Neurol*, 13, 232-243.
- KUZDAS-WOOD, D., STEFANOVA, N., JELLINGER, K. A., SEPPI, K., SCHLOSSMACHER, M. G., POEWE, W. & WENNING, G. K. 2014. Towards translational therapies for multiple system atrophy. *Prog Neurobiol*, 118, 19-35.
- KUZDAS, D., STEMBERGER, S., GABURRO, S., STEFANOVA, N., SINGEWALD, N. & WENNING, G. K. 2013. Oligodendroglial alpha-synucleinopathy and MSA-like cardiovascular autonomic failure: experimental evidence. *Exp Neurol*, 247, 531-6.
- LASHUEL, H. A., OVERK, C. R., OUESLATI, A. & MASLIAH, E. 2013. The many faces of alpha-synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nat Rev Neurosci*, 14, 38-48.
- LAURENS, B., CONSTANTINESCU, R., FREEMAN, R., GERHARD, A., JELLINGER, K., JEROMIN, A., KRISMER, F., MOLLENHAUER, B., SCHLOSSMACHER, M. G., SHAW, L. M., VERBEEK, M. M., WENNING, G. K., WINGE, K., ZHANG, J. & MEISSNER, W. G. 2015. Fluid biomarkers in multiple system atrophy: A review of the MSA Biomarker Initiative. *Neurobiol Dis*, 80, 29-41.
- LEE, H. J., PATEL, S. & LEE, S. J. 2005. Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J Neurosci*, 25, 6016-24.
- LEE, H. J., SUK, J. E., BAE, E. J., LEE, J. H., PAIK, S. R. & LEE, S. J. 2008. Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 1835-49.

- LEE, H. J., SUK, J. E., PATRICK, C., BAE, E. J., CHO, J. H., RHO, S., HWANG, D., MASLIAH, E. & LEE, S. J. 2010. Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. *J Biol Chem*, 285, 9262-72.
- LEE, S. J., DESPLATS, P., LEE, H. J., SPENCER, B. & MASLIAH, E. 2012. Cell-to-cell transmission of alpha-synuclein aggregates. *Methods Mol Biol*, 849, 347-59.
- 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. *Nat Med*, 14, 501-3.
- LING, H., ASI, Y. T., PETROVIC, I. N., AHMED, Z., PRASHANTH, L. K., HAZRATI, L. N., NISHIZAWA, M., OZAWA, T., LANG, A., LEES, A. J., REVESZ, T. & HOLTON, J. L. 2015. Minimal change multiple system atrophy: an aggressive variant? *Mov Disord*, 30, 960-7.
- LONSKAYA, I., DESFORGES, N. M., HEBRON, M. L. & MOUSSA, C. E. 2013. Ubiquitination increases parkin activity to promote autophagic alpha-synuclein clearance. *PLoS One*, 8, e83914.
- MAASS, S., LEVIN, J. & HOGLINGER, G. 2016. Current Treatment of Multiple System Atrophy. *Curr Treat Options Neurol*, 18, 51.
- MADINE, J., DOIG, A. J. & MIDDLETON, D. A. 2006. A study of the regional effects of alpha-synuclein on the organization and stability of phospholipid bilayers. *Biochemistry*, 45, 5783-92.
- MAGRINELLI, F., PICELLI, A., TOCCO, P., FEDERICO, A., RONCARI, L., SMANIA, N., ZANETTE, G. & TAMBURIN, S. 2016. Pathophysiology of Motor Dysfunction in Parkinson's Disease as the Rationale for Drug Treatment and Rehabilitation. *Parkinsons Dis*, 2016, 9832839.
- MAHUL-MELLIER, A. L., FAUVET, B., GYSBERS, A., DIKIY, I., OUESLATI, A., GEORGEON, S., LAMONTANARA, A. J., BISQUERTT, A., ELIEZER, D., MASLIAH, E., HALLIDAY, G., HANTSCH, O. & LASHUEL, H. A. 2014. c-Abl phosphorylates alpha-synuclein and regulates its degradation: implication for alpha-synuclein clearance and contribution to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, 23, 2858-79.
- MAILANKODY, P., NETRAVATHI, M. & PAL, P. K. 2017. Review of tremor in Parkinson's disease and atypical parkinsonian disorders. *Neurol India*, 65, 1083-1090.
- MALAGELADA, C., JIN, Z. H., JACKSON-LEWIS, V., PRZEDBORSKI, S. & GREENE, L. A. 2010. Rapamycin protects against neuron death in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 30, 1166-75.
- MAN, H. Y., LIN, J. W., JU, W. H., AHMADIAN, G., LIU, L., BECKER, L. E., SHENG, M. & WANG, Y. T. 2000. Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. *Neuron*, 25, 649-62.
- MANDEL, R. J., MARMION, D. J., KIRIK, D., CHU, Y., HEINDEL, C., MCCOWN, T., GRAY, S. J. & KORDOWER, J. H. 2017. Novel oligodendroglial alpha synuclein viral vector models of multiple system atrophy: studies in rodents and nonhuman primates. *Acta Neuropathol Commun*, 5, 47.
- MARKS, D. R., TUCKER, K., CAVALLIN, M. A., MAST, T. G. & FADOOL, D. A. 2009. Awake intranasal insulin delivery modifies protein complexes and alters memory, anxiety, and olfactory behaviors. *J Neurosci*, 29, 6734-51.
- MARTI, M. J., TOLOSA, E. & CAMPDELACREU, J. 2003. Clinical overview of the synucleinopathies. *Mov Disord*, 18 Suppl 6, S21-7.
- MATHIAS, C. J. 1996. Gastrointestinal dysfunction in multiple system atrophy. *Semin Neurol*, 16, 251-8.
- MATSUO, A., AKIGUCHI, I., LEE, G. C., MCGEER, E. G., MCGEER, P. L. & KIMURA, J. 1998. Myelin degeneration in multiple system atrophy detected by unique antibodies. *Am J Pathol*, 153, 735-44.
- MAY, V. E., ETTLE, B., POEHLER, A. M., NUBER, S., UBHI, K., ROCKENSTEIN, E., WINNER, B., WEGNER, M., MASLIAH, E. & WINKLER, J. 2014. alpha-Synuclein impairs oligodendrocyte progenitor maturation in multiple system atrophy. *Neurobiol Aging*, 35, 2357-68.

- MAYOR, F., JR., CRUCES-SANDE, M., ARCONES, A. C., VILA-BEDMAR, R., BRIONES, A. M., SALAICES, M. & MURGA, C. 2018. G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) as an integrative signalling node in the regulation of cardiovascular function and metabolic homeostasis. *Cell Signal*, 41, 25-32.
- MAYOR, F., JR., LUCAS, E., JURADO-PUEYO, M., GARCIA-GUERRA, L., NIETO-VAZQUEZ, I., VILA-BEDMAR, R., FERNANDEZ-VELEDO, S. & MURGA, C. 2011. G Protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2): A novel modulator of insulin resistance. *Arch Physiol Biochem*, 117, 125-30.
- MCCANN, H., STEVENS, C. H., CARTWRIGHT, H. & HALLIDAY, G. M. 2014. alpha-Synucleinopathy phenotypes. *Parkinsonism Relat Disord*, 20 Suppl 1, S62-7.
- MCKAY, J. H. & CHESHIRE, W. P. 2018. First symptoms in multiple system atrophy. *Clin Auton Res*, 28, 215-221.
- MEISSNER, W. G., FLABEAU, O., PEREZ, P., TAILLARD, J., MARQUANT, F., DUPOUY, S., TISON, F., PHILIP, P. & GHORAYEB, I. 2014. Accuracy of portable polygraphy for the diagnosis of sleep apnea in multiple system atrophy. *Sleep Med*, 15, 476-9.
- MIELKE, J. G., TAGHIBIGLOU, C. & WANG, Y. T. 2006. Endogenous insulin signaling protects cultured neurons from oxygen-glucose deprivation-induced cell death. *Neuroscience*, 143, 165-73.
- MIKI, Y., TANJI, K., MORI, F., TATARA, Y., UTSUMI, J., SASAKI, H., KAKITA, A., TAKAHASHI, H., FIMIA, G. M. & WAKABAYASHI, K. 2018. AMBRA1, a novel alpha-synuclein-binding protein, is implicated in the pathogenesis of multiple system atrophy. *Brain Pathol*, 28, 28-42.
- MILLER, D. W., JOHNSON, J. M., SOLANO, S. M., HOLLINGSWORTH, Z. R., STANDAERT, D. G. & YOUNG, A. B. 2005. Absence of alpha-synuclein mRNA expression in normal and multiple system atrophy oligodendroglia. *J Neural Transm (Vienna)*, 112, 1613-24.
- MIZUSHIMA, N. & YOSHIMORI, T. 2007. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 3, 542-5.
- MOLLENHAUER, B., LOCASCIO, J. J., SCHULZ-SCHAEFFER, W., SIXEL-DORING, F., TRENKWALDER, C. & SCHLOSSMACHER, M. G. 2011. alpha-Synuclein and tau concentrations in cerebrospinal fluid of patients presenting with parkinsonism: a cohort study. *Lancet Neurol*, 10, 230-40.
- MOLONEY, A. M., GRIFFIN, R. J., TIMMONS, S., O'CONNOR, R., RAVID, R. & O'NEILL, C. 2010. Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiol Aging*, 31, 224-43.
- MONDELLO, S., CONSTANTINESCU, R., ZETTERBERG, H., ANDREASSON, U., HOLMBERG, B. & JEROMIN, A. 2014. CSF alpha-synuclein and UCH-L1 levels in Parkinson's disease and atypical parkinsonian disorders. *Parkinsonism Relat Disord*, 20, 382-7.
- MOUSSAUD, S., JONES, D. R., MOUSSAUD-LAMODIERE, E. L., DELENCLOS, M., ROSS, O. A. & MCLEAN, P. J. 2014. Alpha-synuclein and tau: teammates in neurodegeneration? *Mol Neurodegener*, 9, 43.
- NISHIE, M., MORI, F., YOSHIMOTO, M., TAKAHASHI, H. & WAKABAYASHI, K. 2004. A quantitative investigation of neuronal cytoplasmic and intranuclear inclusions in the pontine and inferior olivary nuclei in multiple system atrophy. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 30, 546-54.
- OERTEL, W. H., WACHTER, T., QUINN, N. P., ULM, G. & BRANDSTADTER, D. 2003. Reduced genital sensitivity in female patients with multiple system atrophy of parkinsonian type. *Mov Disord*, 18, 430-2.
- OTA, K., OBAYASHI, M., OZAKI, K., ICHINOSE, S., KAKITA, A., TADA, M., TAKAHASHI, H., ANDO, N., EISHI, Y., MIZUSAWA, H. & ISHIKAWA, K. 2014. Relocation of p25alpha/tubulin polymerization promoting protein from the nucleus to the perinuclear cytoplasm in the oligodendroglia of sporadic and COQ2 mutant multiple system atrophy. *Acta Neuropathol Commun*, 2, 136.
- OZAWA, T., OKUIZUMI, K., IKEUCHI, T., WAKABAYASHI, K., TAKAHASHI, H. & TSUJI, S. 2001. Analysis of the expression level of alpha-synuclein mRNA using postmortem brain samples from pathologically confirmed cases of multiple system atrophy. *Acta Neuropathol*, 102, 188-90.
- OZAWA, T., OYANAGI, K., TANAKA, H., HORIKAWA, Y., TAKAHASHI, H., MORITA, T. & TSUJI, S. 1998. Suprachiasmatic nucleus in a patient with multiple system atrophy with abnormal circadian rhythm of arginine-vasopressin secretion into plasma. *J Neurol Sci*, 154, 116-21.

- OZAWA, T., PAVIOUR, D., QUINN, N. P., JOSEPHS, K. A., SANGHA, H., KILFORD, L., HEALY, D. G., WOOD, N. W., LEES, A. J., HOLTON, J. L. & REVESZ, T. 2004. The spectrum of pathological involvement of the striatonigral and olivopontocerebellar systems in multiple system atrophy: clinicopathological correlations. *Brain*, 127, 2657-71.
- OZAWA, T., SEKIYA, K., AIZAWA, N., TERAJIMA, K. & NISHIZAWA, M. 2016. Laryngeal stridor in multiple system atrophy: Clinicopathological features and causal hypotheses. *J Neurol Sci*, 361, 243-9.
- PAGAN, F., HEBRON, M., VALADEZ, E. H., TORRES-YAGHI, Y., HUANG, X., MILLS, R. R., WILMARTH, B. M., HOWARD, H., DUNN, C., CARLSON, A., LAWLER, A., ROGERS, S. L., FALCONER, R. A., AHN, J., LI, Z. & MOUSSA, C. 2016. Nilotinib Effects in Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. *J Parkinsons Dis*, 6, 503-17.
- PALMA, J. A., NORCLIFFE-KAUFMANN, L. & KAUFMANN, H. 2018. Diagnosis of multiple system atrophy. *Auton Neurosci*, 211, 15-25.
- 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). *J Neurol Sci*, 94, 79-100.
- PARK, J. Y., PAIK, S. R., JOU, I. & PARK, S. M. 2008. Microglial phagocytosis is enhanced by monomeric alpha-synuclein, not aggregated alpha-synuclein: implications for Parkinson's disease. *Glia*, 56, 1215-23.
- PELLECCHIA, M. T., PIVONELLO, R., LONGO, K., MANFREDI, M., TESSITORE, A., AMBONI, M., PIVONELLO, C., ROCCO, M., COZZOLINO, A., COLAO, A. & BARONE, P. 2010. Multiple system atrophy is associated with changes in peripheral insulin-like growth factor system. *Mov Disord*, 25, 2621-6.
- PEREZ, R. G., WAYMIRE, J. C., LIN, E., LIU, J. J., GUO, F. & ZIGMOND, M. J. 2002. A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci*, 22, 3090-9.
- PETZOLD, A., THOMPSON, E. J., KEIR, G., QUINN, N., HOLMBERG, B., DIZDAR, N., WENNING, G. K., RASCOL, O., TOLOSA, E. & ROSENGREN, L. 2009. Longitudinal one-year study of levels and stoichiometry of neurofilament heavy and light chain concentrations in CSF in patients with multiple system atrophy. *J Neurol Sci*, 279, 76-9.
- POLYMEPOULOS, 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, 2045-7.
- POUNTNEY, D. L., CHEGINI, F., SHEN, X., BLUMBERGS, P. C. & GAI, W. P. 2005. SUMO-1 marks subdomains within glial cytoplasmic inclusions of multiple system atrophy. *Neurosci Lett*, 381, 74-9.
- PREMONT, R. T. & GAINETDINOV, R. R. 2007. Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol*, 69, 511-34.
- PROBST-COUSIN, S., BERGMANN, M., KUCHELMEISTER, K., SCHRODER, R. & SCHMID, K. W. 1996. Ubiquitin-positive inclusions in different types of multiple system atrophy: distribution and specificity. *Pathol Res Pract*, 192, 453-61.
- PROBST-COUSIN, S., RICKERT, C. H., SCHMID, K. W. & GULLOTTA, F. 1998. Cell death mechanisms in multiple system atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol*, 57, 814-21.
- PUERTOLLANO, R. 2014. mTOR and lysosome regulation. *F1000Prime Rep*, 6, 52.
- QUINN, N. 2015. A short clinical history of multiple system atrophy. *Clin Auton Res*, 25, 3-7.
- RADFORD, R., RCOM-H'CHEO-GAUTHIER, A., WONG, M. B., EATON, E. D., QUILTY, M., BLIZZARD, C., NORAZIT, A., MEEDENIYA, A., VICKERS, J. C., GAI, W. P., GUILLEMIN, G. J., WEST, A. K., DICKSON, T. C., CHUNG, R. & POUNTNEY, D. L. 2015. The degree of astrocyte activation in multiple system atrophy is inversely proportional to the distance to alpha-synuclein inclusions. *Mol Cell Neurosci*, 65, 68-81.

- RANDALL-DEMLLO, S., CHIEPPA, M. & ERI, R. 2013. Intestinal epithelium and autophagy: partners in gut homeostasis. *Front Immunol*, 4, 301.
- REDGRAVE, P., RODRIGUEZ, M., SMITH, Y., RODRIGUEZ-OROZ, M. C., LEHERICY, S., BERGMAN, H., AGID, Y., DELONG, M. R. & OBESO, J. A. 2010. Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*, 11, 760-72.
- REFOLO, V., BEZ, F., POLISSIDIS, A., KUZDAS-WOOD, D., STURM, E., KAMARATOU, M., POEWE, W., STEFANIS, L., ANGELA CENCI, M., ROMERO-RAMOS, M., WENNING, G. K. & STEFANOVA, N. 2018. Progressive striatonigral degeneration in a transgenic mouse model of multiple system atrophy: translational implications for interventional therapies. *Acta Neuropathol Commun*, 6, 2.
- RENGO, G., PAGANO, G., PAOLILLO, S., DE LUCIA, C., FEMMINELLA, G. D., LICCARDO, D., CANNAVO, A., FORMISANO, R., PETRAGLIA, L., KOMICI, K., RENGU, F., TRIMARCO, B., FERRARA, N., LEOSCO, D. & PERRONE-FILARDI, P. 2015. Impact of diabetes mellitus on lymphocyte GRK2 protein levels in patients with heart failure. *Eur J Clin Invest*, 45, 187-95.
- REYES, J. F., REY, N. L., BOUSSET, L., MELKI, R., BRUNDIN, P. & ANGOT, E. 2014. Alpha-synuclein transfers from neurons to oligodendrocytes. *Glia*, 62, 387-98.
- REYNOLDS, A. D., GLANZER, J. G., KADIU, I., RICARDO-DUKELow, M., CHAUDHURI, A., CIBOROWSKI, P., CERNY, R., GELMAN, B., THOMAS, M. P., MOSLEY, R. L. & GENDELMAN, H. E. 2008. Nitrated alpha-synuclein-activated microglial profiling for Parkinson's disease. *J Neurochem*, 104, 1504-25.
- RIDEOUT, H. J. & STEFANIS, L. 2002. Proteasomal inhibition-induced inclusion formation and death in cortical neurons require transcription and ubiquitination. *Mol Cell Neurosci*, 21, 223-38.
- RONCEVIC, D., PALMA, J. A., MARTINEZ, J., GOULDING, N., NORCLIFFE-KAUFMANN, L. & KAUFMANN, H. 2014. Cerebellar and parkinsonian phenotypes in multiple system atrophy: similarities, differences and survival. *J Neural Transm (Vienna)*, 121, 507-12.
- SAKURAI, A., OKAMOTO, K., YAGUCHI, M., FUJITA, Y., MIZUNO, Y., NAKAZATO, Y. & GONATAS, N. K. 2002. Pathology of the inferior olivary nucleus in patients with multiple system atrophy. *Acta Neuropathol*, 103, 550-4.
- SAKUSHIMA, K., NISHIMOTO, N., NOJIMA, M., MATSUSHIMA, M., YABE, I., SATO, N., MORI, M. & SASAKI, H. 2015. Epidemiology of Multiple System Atrophy in Hokkaido, the Northernmost Island of Japan. *Cerebellum*, 14, 682-7.
- SALOMONI, P. & CALABRETTA, B. 2009. Targeted therapies and autophagy: new insights from chronic myeloid leukemia. *Autophagy*, 5, 1050-1.
- SANTINI, E., HEIMAN, M., GREENGARD, P., VALJENT, E. & FISONE, G. 2009. Inhibition of mTOR signaling in Parkinson's disease prevents L-DOPA-induced dyskinesia. *Sci Signal*, 2, ra36.
- SCHMEICHEL, A. M., BUCHHALTER, L. C., LOW, P. A., PARISI, J. E., BOEVE, B. W., SANDRONI, P. & BENARROCH, E. E. 2008. Mesopontine cholinergic neuron involvement in Lewy body dementia and multiple system atrophy. *Neurology*, 70, 368-73.
- SCHRAG, A., BEN-SHLOMO, Y. & QUINN, N. P. 1999. Prevalence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy: a cross-sectional study. *Lancet*, 354, 1771-5.
- SCHWARTZ, M. W., BERGMAN, R. N., KAHN, S. E., TABORSKY, G. J., JR., FISHER, L. D., SIPOLS, A. J., WOODS, S. C., STEIL, G. M. & PORTE, D., JR. 1991. Evidence for entry of plasma insulin into cerebrospinal fluid through an intermediate compartment in dogs. Quantitative aspects and implications for transport. *J Clin Invest*, 88, 1272-81.
- SCHWARZ, L., GOLDBAUM, O., BERGMANN, M., PROBST-COUSIN, S. & RICHTER-LANDSBERG, C. 2012. Involvement of macroautophagy in multiple system atrophy and protein aggregate formation in oligodendrocytes. *J Mol Neurosci*, 47, 256-66.
- SHAKER, M. E., GHANI, A., SHIHA, G. E., IBRAHIM, T. M. & MEHAL, W. Z. 2013. Nilotinib induces apoptosis and autophagic cell death of activated hepatic stellate cells via inhibition of histone deacetylases. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 1992-2003.
- SHENG, Z., MA, L., SUN, J. E., ZHU, L. J. & GREEN, M. R. 2011. BCR-ABL suppresses autophagy through ATF5-mediated regulation of mTOR transcription. *Blood*, 118, 2840-8.

- SHIMOBAYASHI, M. & HALL, M. N. 2014. Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 155-62.
- SHY, G. M. & DRAGER, G. A. 1960. A neurological syndrome associated with orthostatic hypotension: a clinical-pathologic study. *Arch Neurol*, 2, 511-27.
- SIMONS, M. & NAVE, K. A. 2015. Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8, a020479.
- SONG, Y. J., LUNDEVIG, D. M., HUANG, Y., GAI, W. P., BLUMBERGS, P. C., HOJRUP, P., OTZEN, D., HALLIDAY, G. M. & JENSEN, P. H. 2007. p25alpha relocalizes in oligodendroglia from myelin to cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Am J Pathol*, 171, 1291-303.
- SPELLANTINI, M. G., CROWTHER, R. A., JAKES, R., CAIRNS, N. J., LANTOS, P. L. & GOEDERT, M. 1998a. Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett*, 251, 205-8.
- SPELLANTINI, M. G., CROWTHER, R. A., JAKES, R., HASEGAWA, M. & GOEDERT, M. 1998b. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6469-73.
- SPELLANTINI, M. G., DIVANE, A. & GOEDERT, M. 1995. Assignment of human alpha-synuclein (SNCA) and beta-synuclein (SNCB) genes to chromosomes 4q21 and 5q35. *Genomics*, 27, 379-81.
- SPELLANTINI, M. G., SCHMIDT, M. L., LEE, V. M., TROJANOWSKI, J. Q., JAKES, R. & GOEDERT, M. 1997. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388, 839-40.
- STANKOVIC, I., KRISMER, F., JESIC, A., ANTONINI, A., BENKE, T., BROWN, R. G., BURN, D. J., HOLTON, J. L., KAUFMANN, H., KOSTIC, V. S., LING, H., MEISSNER, W. G., POEWE, W., SEMNIC, M., SEPI, K., TAKEDA, A., WEINTRAUB, D., WENNING, G. K. & MOVEMENT DISORDERS SOCIETY, M. S. A. S. G. 2014. Cognitive impairment in multiple system atrophy: a position statement by the Neuropsychology Task Force of the MDS Multiple System Atrophy (MODIMSA) study group. *Mov Disord*, 29, 857-67.
- STEFANOVA, N., REINDL, M., NEUMANN, M., KAHLE, P. J., POEWE, W. & WENNING, G. K. 2007. Microglial activation mediates neurodegeneration related to oligodendroglial alpha-synucleinopathy: implications for multiple system atrophy. *Mov Disord*, 22, 2196-203.
- STEFANOVA, N. & WENNING, G. K. 2015. Animal models of multiple system atrophy. *Clin Auton Res*, 25, 9-17.
- STEFANOVA, N. & WENNING, G. K. 2016. Review: Multiple system atrophy: emerging targets for interventional therapies. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 42, 20-32.
- STEMBERGER, S., POEWE, W., WENNING, G. K. & STEFANOVA, N. 2010. Targeted overexpression of human alpha-synuclein in oligodendroglia induces lesions linked to MSA-like progressive autonomic failure. *Exp Neurol*, 224, 459-64.
- STOLZ, A., ERNST, A. & DIKIC, I. 2014. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat Cell Biol*, 16, 495-501.
- SU, X., MAGUIRE-ZEISS, K. A., GIULIANO, R., PRIFTI, L., VENKATESH, K. & FEDEROFF, H. J. 2008. Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 29, 1690-701.
- SWANT, J., GOODWIN, J. S., NORTH, A., ALI, A. A., GAMBLE-GEORGE, J., CHIRWA, S. & KHOSHBOUEI, H. 2011. alpha-Synuclein stimulates a dopamine transporter-dependent chloride current and modulates the activity of the transporter. *J Biol Chem*, 286, 43933-43.
- SYLVIE DELCAMBRE, Y. N., AND KARSTEN HILLER 2016. Dopamine metabolism and reactive oxygen species production. In: SWITZERLAND, S. I. P. (ed.) *Mitochondrial Mechanisms of Degeneration and Repair in Parkinson's Disease*.
- TAGUCHI, K., MATSUMOTO, T., KAMATA, K. & KOBAYASHI, T. 2012. G protein-coupled receptor kinase 2, with beta-arrestin 2, impairs insulin-induced Akt/endothelial nitric oxide synthase signaling in ob/ob mouse aorta. *Diabetes*, 61, 1978-85.
- 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. *J Biol Chem*, 279, 4625-31.

- TANAKA, Y., KATO, T., NISHIDA, H., YAMADA, M., KOUMURA, A., SAKURAI, T., HAYASHI, Y., KIMURA, A., HOZUMI, I., ARAKI, H., MURASE, M., NAGAKI, M., MORIWAKI, H. & INUZUKA, T. 2012. Is there delayed gastric emptying in patients with multiple system atrophy? An analysis using the (13)C-acetate breath test. *J Neurol*, 259, 1448-52.
- 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. *J Biol Chem*, 288, 15194-210.
- TANJI, K., ODAGIRI, S., MARUYAMA, A., MORI, F., KAKITA, A., TAKAHASHI, H. & WAKABAYASHI, K. 2013. Alteration of autophagosomal proteins in the brain of multiple system atrophy. *Neurobiol Dis*, 49, 190-8.
- THEODORE, S., CAO, S., MCLEAN, P. J. & STANDAERT, D. G. 2008. Targeted overexpression of human alpha-synuclein triggers microglial activation and an adaptive immune response in a mouse model of Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 67, 1149-58.
- TISON, F., YEKHELF, F., CHRYSOSTOME, V., BALESTRE, E., QUINN, N. P., POEWE, W. & WENNING, G. K. 2002. Parkinsonism in multiple system atrophy: natural history, severity (UPDRS-III), and disability assessment compared with Parkinson's disease. *Mov Disord*, 17, 701-9.
- TONG, J., WONG, H., GUTTMAN, M., ANG, L. C., FORNO, L. S., SHIMADZU, M., RAJPUT, A. H., MUENTER, M. D., KISH, S. J., HORNYKIEWICZ, O. & FURUKAWA, Y. 2010. Brain alpha-synuclein accumulation in multiple system atrophy, Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy: a comparative investigation. *Brain*, 133, 172-88.
- TU, Y., CHEN, C., PAN, J., XU, J., ZHOU, Z. G. & WANG, C. Y. 2012. The Ubiquitin Proteasome Pathway (UPP) in the regulation of cell cycle control and DNA damage repair and its implication in tumorigenesis. *Int J Clin Exp Pathol*, 5, 726-38.
- UBHI, K., ROCKENSTEIN, E., MANTE, M., INGLIS, C., ADAME, A., PATRICK, C., WHITNEY, K. & MASLIAH, E. 2010. Neurodegeneration in a transgenic mouse model of multiple system atrophy is associated with altered expression of oligodendroglial-derived neurotrophic factors. *J Neurosci*, 30, 6236-46.
- UEDA, K., FUKUSHIMA, H., MASLIAH, E., XIA, Y., IWAI, A., YOSHIMOTO, M., OTERO, D. A., KONDO, J., IHARA, Y. & SAITOH, T. 1993. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 11282-6.
- USUI, I., IMAMURA, T., SATOH, H., HUANG, J., BABENDURE, J. L., HUPFELD, C. J. & OLEFSKY, J. M. 2004. GRK2 is an endogenous protein inhibitor of the insulin signaling pathway for glucose transport stimulation. *EMBO J*, 23, 2821-9.
- VALERA, E. & MASLIAH, E. 2018. The neuropathology of multiple system atrophy and its therapeutic implications. *Auton Neurosci*, 211, 1-6.
- VALERA, E., SPENCER, B., MOTT, J., TREJO, M., ADAME, A., MANTE, M., ROCKENSTEIN, E., TRONCOSO, J. C., BEACH, T. G., MASLIAH, E. & DESPLATS, P. 2017. MicroRNA-101 Modulates Autophagy and Oligodendroglial Alpha-Synuclein Accumulation in Multiple System Atrophy. *Front Mol Neurosci*, 10, 329.
- VALERA, E., UBHI, K., MANTE, M., ROCKENSTEIN, E. & MASLIAH, E. 2014. Antidepressants reduce neuroinflammatory responses and astroglial alpha-synuclein accumulation in a transgenic mouse model of multiple system atrophy. *Glia*, 62, 317-37.
- VAN DER PERREN, A., VAN DEN HAUTE, C. & BAEKELANDT, V. 2015. Viral vector-based models of Parkinson's disease. *Curr Top Behav Neurosci*, 22, 271-301.
- VARKEY, J., ISAS, J. M., MIZUNO, N., JENSEN, M. B., BHATIA, V. K., JAO, C. C., PETRLOVA, J., VOSS, J. C., STAMOU, D. G., STEVEN, A. C. & LANGEN, R. 2010. Membrane curvature induction and tubulation are common features of synucleins and apolipoproteins. *J Biol Chem*, 285, 32486-93.
- VILA-BEDMAR, R., CRUCES-SANDE, M., LUCAS, E., WILLEMEN, H. L., HEIJNEN, C. J., KAVELAARS, A., MAYOR, F., JR. & MURGA, C. 2015. Reversal of diet-induced obesity and insulin resistance by inducible genetic ablation of GRK2. *Sci Signal*, 8, ra73.

- VOGIATZI, T., XILOURI, M., VEKRELLIS, K. & STEFANIS, L. 2008. Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J Biol Chem*, 283, 23542-56.
- VOLPICELLI-DALEY, L. A., LUK, K. C., PATEL, T. P., TANIK, S. A., RIDDLE, D. M., STIEBER, A., MEANEY, D. F., TROJANOWSKI, J. Q. & LEE, V. M. 2011. Exogenous alpha-synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron*, 72, 57-71.
- VON JONQUIERES, G., MERSMANN, N., KLUGMANN, C. B., HARASTA, A. E., LUTZ, B., TEAHAN, O., HOUSLEY, G. D., FROHLICH, D., KRAMER-ALBERS, E. M. & KLUGMANN, M. 2013. Glial promoter selectivity following AAV-delivery to the immature brain. *PLoS One*, 8, e65646.
- WALSH, D. M. & SELKOE, D. J. 2016. A critical appraisal of the pathogenic protein spread hypothesis of neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*, 17, 251-60.
- WANG, G. F., LI, C. & PIELAK, G. J. 2010. 19F NMR studies of alpha-synuclein-membrane interactions. *Protein Sci*, 19, 1686-91.
- WATANABE, H., SAITO, Y., TERAO, S., ANDO, T., KACHI, T., MUKAI, E., AIBA, I., ABE, Y., TAMAKOSHI, A., DOYU, M., HIRAYAMA, M. & SOBUE, G. 2002. Progression and prognosis in multiple system atrophy: an analysis of 230 Japanese patients. *Brain*, 125, 1070-83.
- WEBB, J. L., RAVIKUMAR, B., ATKINS, J., SKEPPER, J. N. & RUBINSZTEIN, D. C. 2003. Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem*, 278, 25009-13.
- WEI, Q., MISKIMINS, W. K. & MISKIMINS, R. 2003. Cloning and characterization of the rat myelin basic protein gene promoter. *Gene*, 313, 161-7.
- WENNING, G. K., BEN-SHLOMO, Y., MAGALHAES, M., DANIEL, S. E. & QUINN, N. P. 1995. Clinicopathological study of 35 cases of multiple system atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 58, 160-6.
- WENNING, G. K., GESER, F., KRISMER, F., SEPPI, K., DUERR, S., BOESCH, S., KOLLENSPERGER, M., GOEBEL, G., PFEIFFER, K. P., BARONE, P., PELLECCIA, M. T., QUINN, N. P., KOUKOUNI, V., FOWLER, C. J., SCHRAG, A., MATHIAS, C. J., GILADI, N., GUREVICH, T., DUPONT, E., OSTERGAARD, K., NILSSON, C. F., WIDNER, H., OERTEL, W., EGGERT, K. M., ALBANESE, A., DEL SORBO, F., TOLOSA, E., CARDOZO, A., DEUSCHL, G., HELLRIEGEL, H., KLOCKGETHER, T., DODEL, R., SAMPAIO, C., COELHO, M., DJALDETTI, R., MELAMED, E., GASSER, T., KAMM, C., MECO, G., COLOSIMO, C., RASCOL, O., MEISSNER, W. G., TISON, F., POEWE, W. & EUROPEAN MULTIPLE SYSTEM ATROPHY STUDY, G. 2013. The natural history of multiple system atrophy: a prospective European cohort study. *Lancet Neurol*, 12, 264-74.
- WENNING, G. K., GRANATA, R., KRISMER, F., DURR, S., SEPPI, K., POEWE, W., BLEASDALE-BARR, K. & MATHIAS, C. J. 2012. Orthostatic hypotension is differentially associated with the cerebellar versus the parkinsonian variant of multiple system atrophy: a comparative study. *Cerebellum*, 11, 223-6.
- WENNING, G. K., SEPPI, K., TISON, F. & JELLINGER, K. 2002. A novel grading scale for striatonigral degeneration (multiple system atrophy). *J Neural Transm (Vienna)*, 109, 307-20.
- WENNING, G. K., STEFANOVA, N., JELLINGER, K. A., POEWE, W. & SCHLOSSMACHER, M. G. 2008. Multiple system atrophy: a primary oligodendrogliaopathy. *Ann Neurol*, 64, 239-46.
- WENNING, G. K., TISON, F., SEPPI, K., SAMPAIO, C., DIEM, A., YEKHLEF, F., GHORAYEB, I., ORY, F., GALITZKY, M., SCARAVILLI, T., BOZI, M., COLOSIMO, C., GILMAN, S., SHULTS, C. W., QUINN, N. P., RASCOL, O., POEWE, W. & MULTIPLE SYSTEM ATROPHY STUDY, G. 2004. Development and validation of the Unified Multiple System Atrophy Rating Scale (UMSARS). *Mov Disord*, 19, 1391-402.
- WERSINGER, C., RUSNAK, M. & SIDHU, A. 2006. Modulation of the trafficking of the human serotonin transporter by human alpha-synuclein. *Eur J Neurosci*, 24, 55-64.
- WILKE, C., BENDER, F., HAYER, S. N., BROCKMANN, K., SCHOLS, L., KUHLE, J. & SYNOFZIK, M. 2018. Serum neurofilament light is increased in multiple system atrophy of cerebellar type and in repeat-expansion spinocerebellar ataxias: a pilot study. *J Neurol*, 265, 1618-1624.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 4194-9.
- WINSLOW, A. R., CHEN, C. W., CORROCHANO, S., ACEVEDO-ARZENA, A., GORDON, D. E., PEDEN, A. A., LICHTENBERG, M., MENZIES, F. M., RAVIKUMAR, B., IMARISIO, S., BROWN, S., O'KANE, C. J. & RUBINSZTEIN, D. C. 2010. alpha-Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *J Cell Biol*, 190, 1023-37.
- WINSLOW, A. R. & RUBINSZTEIN, D. C. 2011. The Parkinson disease protein alpha-synuclein inhibits autophagy. *Autophagy*, 7, 429-31.
- WINTER, Y., BEZDOLNYY, Y., KATUNINA, E., AVAKJAN, G., REESE, J. P., KLOTSCHKE, J., OERTEL, W. H., DODEL, R. & GUSEV, E. 2010. Incidence of Parkinson's disease and atypical parkinsonism: Russian population-based study. *Mov Disord*, 25, 349-56.
- WYSE, R. K., BRUNDIN, P. & SHERER, T. B. 2016. Nilotinib - Differentiating the Hope from the Hype. *J Parkinsons Dis*, 6, 519-22.
- XILOURI, M., BREKK, O. R. & STEFANIS, L. 2016. Autophagy and Alpha-Synuclein: Relevance to Parkinson's Disease and Related Synucleopathies. *Mov Disord*, 31, 178-92.
- YANG, W. & YU, S. 2017. Synucleinopathies: common features and hippocampal manifestations. *Cell Mol Life Sci*, 74, 1485-1501.
- YOKOYAMA, T., KUSUNOKI, J. I., HASEGAWA, K., SAKAI, H. & YAGISHITA, S. 2001. Distribution and dynamic process of neuronal cytoplasmic inclusion (NCI) in MSA: correlation of the density of NCI and the degree of involvement of the pontine nuclei. *Neuropathology*, 21, 145-54.
- YOON, M. S. 2017. The Role of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in Insulin Signaling. *Nutrients*, 9.
- YU, H. C., LIN, C. S., TAI, W. T., LIU, C. Y., SHIAU, C. W. & CHEN, K. F. 2013. Nilotinib induces autophagy in hepatocellular carcinoma through AMPK activation. *J Biol Chem*, 288, 18249-59.
- ZALTIERI, M., GRIGOLETTO, J., LONGHENA, F., NAVARRIA, L., FAVERO, G., CASTREZZATI, S., COLIVICCHI, M. A., DELLA CORTE, L., REZZANI, R., PIZZI, M., BENFENATI, F., SPILLANTINI, M. G., MISSALE, C., SPANO, P. & BELLUCCI, A. 2015. alpha-synuclein and synapsin III cooperatively regulate synaptic function in dopamine neurons. *J Cell Sci*, 128, 2231-43.
- ZHANG, L., CAO, B., OU, R., WEI, Q. Q., ZHAO, B., YANG, J., WU, Y. & SHANG, H. 2017. Non-motor symptoms and the quality of life in multiple system atrophy with different subtypes. *Parkinsonism Relat Disord*, 35, 63-68.
- ZHANG, L., CAO, B., ZOU, Y., WEI, Q. Q., OU, R., LIU, W., ZHAO, B., YANG, J., WU, Y. & SHANG, H. 2018. Causes of Death in Chinese Patients with Multiple System Atrophy. *Aging Dis*, 9, 102-108.
- ZHANG, W., WANG, T., PEI, Z., MILLER, D. S., WU, X., BLOCK, M. L., WILSON, B., ZHANG, W., ZHOU, Y., HONG, J. S. & ZHANG, J. 2005. Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J*, 19, 533-42.