



HAL
open science

Etude de l'impact d'une exposition chronique au paraquat dans un modèle de Drosophile exprimant l'alpha-synucléine humaine

Marianne Sedru

► **To cite this version:**

Marianne Sedru. Etude de l'impact d'une exposition chronique au paraquat dans un modèle de Drosophile exprimant l'alpha-synucléine humaine. Immunologie. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSEN083 . tel-02918218

HAL Id: tel-02918218

<https://theses.hal.science/tel-02918218v1>

Submitted on 20 Aug 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.



Numéro National de Thèse : 2019LYSEN083

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE
LYON**

opérée par
l'Ecole Normale Supérieure de Lyon

**Ecole Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire Intégrative Et Cellulaire**

Spécialité de doctorat : Neurobiologie

Discipline : Science de la Vie et de la Santé

Soutenue publiquement le 18/12/2019, par :

Marianne SEDRU

**Etude de l'impact d'une exposition
chronique au paraquat dans un modèle
de Drosophile exprimant l'alpha-
synucléine humaine**

Devant le jury composé de :

Bertrand MOLLEREAU	Professeur des Universités	Directeur de thèse
Laure GARRIGUE-ANTAR	Professeure des Universités	Rapportrice
Emmanuel TAILLEBOURG	Chargé de recherche	Rapporteur
Serge BIRMAN	Directeur de recherche	Examineur
Bénédicte DURAND	Professeure des Universités	Examinatrice

RESUME DE THESE

La maladie de Parkinson (MP) est caractérisée par l'agrégation de l' α -synucléine (α -syn) et la dégénérescence sélective des neurones dopaminergiques associée à des défauts locomoteurs. L'étiologie de la MP reste incomplète à ce jour mais ses origines multifactorielles impliquent à la fois des facteurs génétiques et environnementaux. La caractérisation de modèles d'induction mixte de la MP permettrait d'élucider les effets toxiques d'une exposition chronique à un agent chimique sur les mécanismes favorisant l'agrégation de l' α -syn. Dans cette étude, notre objectif était de caractériser les effets d'une exposition chronique au paraquat (PQ) de Drosophiles exprimant une des formes, WT ou mutée [A53T], de l' α -syn humaine dans l'ensemble des neurones.

Nous avons mis en évidence que les Drosophiles exprimant l' α -syn [A53T] sont plus sensibles à une exposition chronique au PQ et que cette sensibilité accrue reposerait sur une accumulation d' α -syn et notamment de sa forme pathologique, phosphorylée en sérine 129. La détection de vacuoles d'autophagie et l'accumulation de la protéine Ref(2)-P/p62 reflèteraient un blocage du flux de l'autophagie chez les Drosophiles exprimant l' α -syn [A53T] en condition d'exposition chronique au PQ.

La prise en compte des aspects génétiques et environnementaux impliqués dans le développement de la maladie de Parkinson permet de modéliser les cas sporadiques qui représentent près de 90% des patients. Des études plus approfondies utilisant ce modèle mixte permettraient de décrire les mécanismes cellulaires mis en jeu lors d'une exposition chronique à un contaminant de l'environnement et donc d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour lutter contre la maladie de Parkinson.

Mots-clés : maladie de Parkinson, Drosophiles, α -synucléine WT, α -synucléine [A53T], paraquat, exposition chronique, induction mixte, α -synucléine Pser129.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is mainly characterized by the aggregation of α -synuclein (α -syn) into Lewy bodies and the selective degeneration of dopaminergic neurons associated with locomotor defects. The etiology of PD is still incomplete, but its multifactorial origins involve genetic and environmental stress factors. The characterization of animal models expressing human α -syn exposed to pesticides is essential for the identification of the mechanisms underlying the aggregation of α -syn upon chemical exposure. In this study, our goal was to characterize the effects of chronic paraquat (PQ) exposure on *Drosophila* expressing the WT or mutated [A53T] form of α -syn in all neurons.

We showed that the expression of α -syn [A53T] increased the sensitivity to chronic exposure to PQ. In addition, PQ induced α -syn accumulation, especially the pathological form, phosphorylated on serine 129. We also found autophagic vacuoles associated with Ref(2)-P/p62 protein accumulation suggesting an impaired autophagic flux in *Drosophila* expressing α -syn [A53T] under chronic PQ exposure.

By taking into account the genetic and environmental aspects, our approach will allow to identify the main factors responsible for the development of PD in the sporadic cases that represent nearly 90% of patients. Further studies based on this model will allow to explore potential therapies for PD treatment.

Keywords: Parkinson's disease, *Drosophila*, α -synuclein WT, α -synuclein [A53T], paraquat, chronic exposure, mixed induction, α -synuclein Pser129.

REMERCIEMENTS

Pour ces quatre années de thèse très intenses et encore plus enrichissantes, je remercie l'ensemble de l'équipe *Apoptosis & Neurogenetics* de Mr Bertrand Mollereau pour leur accueil et leur accompagnement :

- Bertrand, je te remercie de m'avoir sélectionnée et de m'avoir confié ce beau projet qui me tient à cœur. Je te suis très reconnaissante pour ta grande patience que je sais avoir mis à rude épreuve, malgré moi. Je te remercie également pour les conseils scientifiques et professionnels que tu m'as donnés et surtout pour ta bienveillance.
- Je remercie les membres de l'équipe, présents et passés, d'avoir partagé avec moi ces quatre années d'expériences, scientifiques et humaines, et d'avoir participé activement à ma formation, tant au laboratoire qu'au cours de nos réunions d'équipe.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à mes collaborateurs de l'équipe de Mr Thierry Baron de l'Anses Lyon :

- J'ai eu la chance de mener à bien mon projet de thèse avec Mr Jean-Noël Arzac. Tu m'as aidée tout au long de ma thèse à conserver un sens critique et à prendre du recul sur mes résultats. J'ai appris la rigueur scientifique à tes côtés et je te remercie pour ton implication et ton soutien auxquels je ne m'attendais pas mais qui se sont révélés très précieux.
- Je te remercie Mireille pour le nombre impressionnant de Drosophiles que tu as décapitées et pour le travail que tu as abattu. Tu as été d'un grand soutien sur ce projet mais également sur le plan personnel lors de mes premiers mois sur Lyon.
- Je remercie l'ensemble des membres présents et les anciens doctorants de l'unité MND pour nos échanges réguliers lors de ma venue dans les locaux de l'Anses et qui ont toujours été très agréables et chaleureux

Je remercie les membres de mon CST, Mme Durand et Mr Birman, pour avoir suivi l'évolution de ma thèse et pour avoir accepté de continuer à me faire profiter de vos conseils en participant à mon jury de thèse. Je remercie également mes rapporteurs, Mme Garrigue-Antar et Mr Taillebourg, pour avoir accepté d'évaluer mon travail et de prendre le temps de lire l'intégralité de mon manuscrit.

Je remercie les organismes financeurs, l'ARC2 pour la région Auvergne-Rhône-Alpes et l'association France Parkinson, qui m'ont permis de réaliser cette thèse et de la poursuivre pour une année supplémentaire qui a été décisive.

Je remercie mon système de soutien interne au LBMC sans qui je n'aurais très probablement pas tenu le coup. Je ne retiendrai pas seulement nos délires Beatlesiens distillés de manière plus ou moins subtile ou nos parties de baby-foot, de plus en plus adroites, mais toujours aussi bruyantes. Je retiendrai le soutien et l'empathie des supers humains que j'ai eu la chance de croiser. Merci Lamy, Laurie-Anne, Sophie, JB, Fabien, Seb, Kyrilo [...].

Je remercie mon système de soutien externe, mes parents et mon chéri, pour m'avoir poussée à m'écouter et à me faire confiance. Avec toujours beaucoup d'amour, et un peu de maladresse parfois, vous n'avez cessé de m'épauler et de me relever quand c'était nécessaire. Pendant ma thèse j'ai eu la chance de rencontrer mon super chéri que je remercie pour toutes ses attentions et petits plats pendant ces trois années ensemble. Tu n'as pas souvent compris pourquoi je m'accrochais autant à cette thèse et je n'étais pas toujours en mesure de te l'expliquer mais tu as toujours été à mes côtés, à t'assurer que j'allais bien. Je te remercie aussi d'avoir accepté d'ajouter une boule d'amour et de poils dans notre vie car elle participe à mon équilibre. Merci.

Laure et Christophe, vous m'avez embarquée avec vous dans une sacrée aventure. Je ne sais pas si l'année 2019/2020 sera l'occasion de « boucler la boucle » ou de commencer un nouveau cycle, mais on va le faire ensemble !

SOMMAIRE

INTRODUCTION	12
I. La maladie de Parkinson.....	13
1) Etiologie de la maladie de Parkinson.....	16
A. Marqueurs de la phase « pré-symptomatique » : symptômes non moteurs.....	16
i. Troubles autonomes	17
ii. Troubles sensoriels	17
iii. Troubles neuropsychiatriques.....	18
iv. Biomarqueurs et diagnostic précoce de la MP.....	18
B. Marqueurs de la phase « symptomatique » : symptômes moteurs.....	18
i. Bradykinésie	19
ii. Akinésie.....	19
iii. Hypertonie.....	19
iv. Tremblement de repos.....	19
2) Implication de l'α-synucléine dans la maladie de Parkinson	20
A. Expression, localisation et rôle.....	20
B. Séquence et mutations génétiques.....	22
C. Modifications post-traductionnelles	24
i. La phosphorylation en Tyr 125 ou en Ser129	25
ii. Ubiquitination.....	25
D. Equilibre dynamique entre les formes mono- et oligomériques.....	26
3) Autres mutations génétiques impliquées dans la maladie de Parkinson	27
4) Facteurs de risques environnementaux de la maladie de Parkinson : les agents phytosanitaires	28
A. Pesticide : la roténone.....	29

B. Herbicide : le paraquat.....	30
II. Mécanismes cellulaires impliqués dans la réponse aux stress liés à la maladie de Parkinson	32
1) Fonctions physiologiques de la voie UPR et implications dans la maladie de Parkinson	32
2) Fonctions physiologiques de la voie ubiquitine-protéasome et implications dans la maladie de Parkinson.....	35
3) Fonctions physiologiques de l'autophagie et implications dans la maladie de Parkinson	39
III. Utilisation de la Drosophile pour modéliser la maladie de Parkinson	46
1) La Drosophile, modèle de maladies humaines	46
2) Le système nerveux de la Drosophile pour modéliser la MP.....	47
3) Les modèles d'induction de la maladie de Parkinson chez la Drosophile	49
A. Les modèles d'induction génétique de la MP chez la Drosophile.....	49
B. Les modèles d'induction chimique de la MP chez la Drosophile.....	52
C. Les modèles d'induction mixte de la MP chez la Drosophile	52
IV. Problématique de la thèse.....	53
RESULTATS	54
Bibliographie	100

LISTE DES ABREVIATIONS

ASK1 = apoptosis signal kinase 1
ATG = autophagy-related genes
CMA = autophagie médiée par les chaperonnes
CMH = complexe majeur d'histo-compatibilité
DAMB = D1-like dopamine receptor
DUB = déubiquitine-ligase
ELAV = embryonic lethal abnormal visual system
eMI = endosomal microautophagy
ESCRT = endosomal sorting complexes required for transport
ERAD = endoplasmic reticulum associated degradation
GADD153 = growth arrest and DNA damage-inducible protein
GFP = green fluorescent protein
HDAC6 = histone déacétylase 6
HRP = horseradish peroxydase
IF = immunofluorescence
IHC = immunohistochimie
iPSC = cellule souche pluripotente induites
IRE 1 = inositol-requiring enzyme 1
JNK = jun amino-terminal kinases
mCD8 = mouse CD8
DTT = dithiothreitol
LAMP2A = lysosome-associated membrane protein 2A
LB = corps de Lewy
LN = neurite de Lewy
MET = microscopie électronique à transmission
MP = maladie de Parkinson
MPP+ = 1-methyl-4-phenylpyridine
MPTP = 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
NAC = non-amyloid component
NADPH = nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
Pser129 = α -synucléine phosphorylée en sérine 129
PVDF = polyvinylidène difluorid
qPCR = quantitative Polymerase Chain Reaction

RE = reticulum endoplasmique

RT-qPCR = retro-transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction

sGMR = short glass multiple reporter

SN = système nerveux

SNARE = Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor

TH = tyrosine hydroxylase

UAS = upstream activation sequence

UPR = unfolded protein response

UPS = ubiquitine-proteasome system

WT = wild type

α -syn = α -synucléine

TABLE DES ILLUSTRATIONS

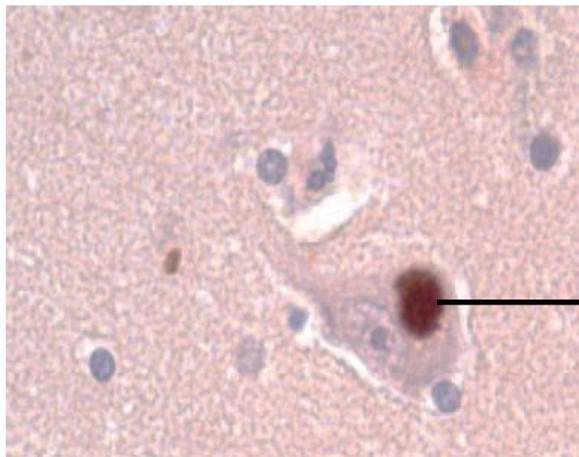
Figure 1 : Inclusion cytoplasmique dans un neurone de patient parkinsonien	10
Figure 2 : Apparence de la substance noire de patient parkinsonien comparé à un individu sain	10
Tableau 1 : Gènes PARK associées à des formes familiales de la maladie de Parkinson.....	11
Figure 3 : Membranes, cibles et voies cellulaires, avec lesquelles l'α-synucléine interagit potentiellement en conditions physiologiques.....	17
Figure 4 : Schéma de la séquence protéique de l'α-synucléine.....	21
Figure 5 : Les mutations de l'α-synucléine associées à des formes familiales de la maladie de Parkinson modifient l'agrégation induite par les lipides et le taux d'amplification des fibrilles d'α-synucléine.....	27
Figure 6 : Formation des fibrilles d'α-synucléine	23
Figure 7 : Fréquences et causalités de variants génétiques impliqués dans la maladie de Parkinson	24
Figure 8 : Structure chimique du paraquat.....	31
Figure 9 : Cycle redox du paraquat	34
Figure 10 : Schéma récapitulatif des voies de stress du réticulum endoplasmique	30
Figure 11 : Structure du protéasome	32
Figure 12 : Schéma de la dégradation de l'α-synucléine par le protéasome et la voie de l'autophagie.....	33
Figure 13 : Dégradation des protéines mal conformées par les systèmes du protéasome et de l'autophagie.....	35
Figure 14 : Schéma de la voie de l'autophagie	37
Figure 15 : Schéma des interactions entre les défauts cellulaires associés à des facteurs environnementaux et/ou génétiques pouvant conduire à la formation d'agrégats d'α-synucléine	41
Figure 16 : Le système d'expression UAS-Gal4 chez la drosophile.....	45
Figure 17 : Visualisation des neurones dopaminergiques dans le système nerveux central de Drosophile adulte	44

INTRODUCTION

I. La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative touchant 3 % de la population de plus de 65 ans (Fahn et Sulzer 2004). La description de cette maladie a été publiée en 1817 par James Parkinson qui la présentait comme une pathologie caractérisée par des tremblements involontaires, un tonus musculaire réduit mais sans atteinte des facultés sensorielles et intellectuelles (Parkinson 2002). L'évolution de la MP est progressive et lente avec des symptômes moteurs qui se déclarent après une perte d'environ 70% des neurones dopaminergiques (Uhl, et al. 1994). La qualité de vie des patients est altérée du fait de l'apparition de symptômes moteurs et non-moteurs mais l'espérance de vie reste stable. L'accumulation d'une protéine neuronale, l' α -synucléine (α -syn) sous forme d'inclusions cytoplasmiques, appelées corps de Lewy, reste le point commun entre ces différentes formes de la MP (Masliah, et al. 2000) (Spillantini, et al. 1997). Les corps de Lewy sont caractérisés par des immuno-marquages de la forme phosphorylée en sérine 129 de l' α -syn qui est dite pathologique (Figure 1) (Fujiwara, et al. 2002) (Kalia et Lang 2015). En parallèle de ces inclusions, une perte des neurones de la *substantia nigra pars compacta* est observée chez les patients lors d'examens post-mortem (Figure 2).

Le développement de la MP peut reposer sur des mutations génétiques, on parle alors de formes familiales de la MP, ou bien les causes peuvent rester non identifiées et on parle alors de formes sporadiques ou idiopathiques de la MP. L'identification de familles où la fréquence des cas de parkinsonisme était anormalement élevée a permis de caractériser des gènes porteurs de mutations (Polymeropoulos, et al. 1997). Ces gènes ont été associés au développement de la MP et ont été appelés « gènes PARK » (Tableau 1). Les mécanismes responsables de l'agrégation de l' α -syn ne pas encore complètement compris à ce jour.



α -synucléine phosphoSer129

Figure 1 : Inclusion cytoplasmique dans un neurone de patient parkinsonien

Des marquages réalisés par immunohistochimie sur des coupes de cerveaux de patients parkinsoniens mettent en évidence des inclusions cytoplasmiques, ou corps de Lewy, dans les neurones qui sont caractérisées par une accumulation d' α -synucléine et notamment de la forme phosphorylée en sérine 129 et d'ubiquitine.

Photo modifiée à partir de (Jucker et Walker 2013)

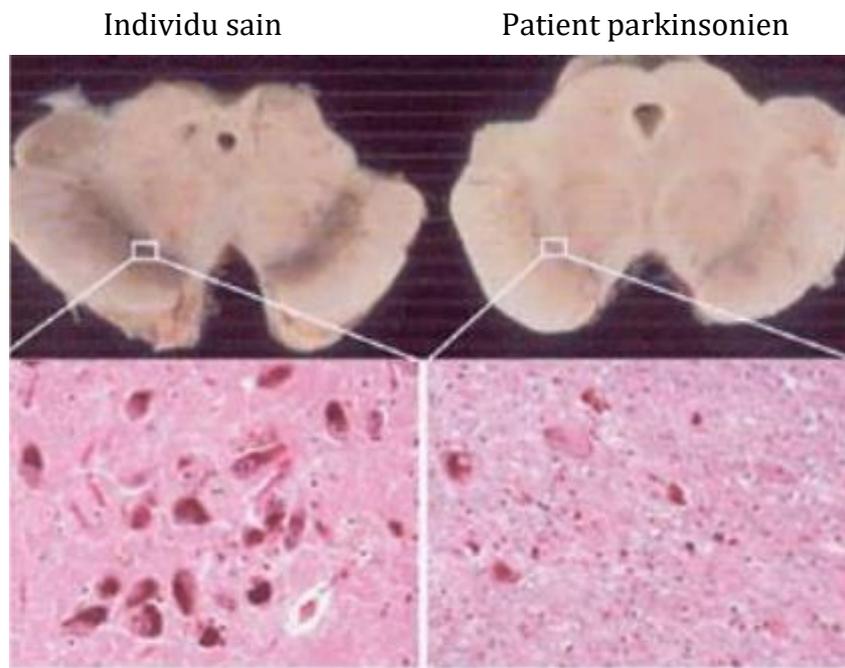


Figure 2 : Apparence de la substance noire de patient parkinsonien comparé à un individu sain

Le marquage des noyaux cellulaires par immunohistochimie permet de mettre en évidence une perte des neurones de la substance noire chez les patients parkinsoniens.

Gène PARK	Transmission	Protéine	Fonction
PARK 1/4	AD	α -synucléine	Intégrité des vésicules de neurotransmetteurs
PARK 2	AR	parkin	Ubiquitine ligase E3
PARK 3	AD	?	?
PARK 5	AD	UCHL-1	Hydrolase C-terminal de l'ubiquitine
PARK 6	AR	PINK-1	Kinase mitochondriale
PARK 7	AR	DJ-1	Déglycase
PARK 8	AD	LRRK2	Kinase, GTPase
PARK 9	AR	ATP13A2	Enzyme lysosomale, transport cationique
PARK 10	AD	USP24	Déubiquitine ligase
PARK 11	AD	GIGYF2	Répresseur post-transcriptionnel
PARK 12	Chromosome X	?	?
PARK 13	AD	HTRA2/OMI	Sérine protéase mitochondriale
PARK 14	AR	PLA2G6	Phospholipase A2
PARK 15	AR	FBX07	Ubiquitine ligase E3
PARK 16	?	RAB7L1	Protéine liant le GTP
PARK 17	?	VSP35	Transport rétrograde des endosomes vers le Golgi
PARK 18	?	HLA-DRA	Chaîne alpha 2 du système CMH de classe II

Tableau 1 : Gènes PARK associées à des formes familiales de la maladie de Parkinson.

Parmi les gènes PARK, certains sont transmis de manière autosomale récessive (AR), autosomale dominante (AD) ou bien de manière récessive liée au chromosome X. Les cases notées « ? » ne sont pas encore décrites dans la littérature.

Tableau réalisé à partir de : (Richarme, et al. 2015) (Vande Walle, Lamkanfi et Vandenabeele 2008) (MacLeod, et al. 2013) (Vilariño-Güell, et al. 2011) (Rahman et Morrison 2019) (Kannarkat, et al. 2015)

1) Etiologie de la maladie de Parkinson

La MP est la deuxième maladie neurodégénérative la plus répandue après la maladie d'Alzheimer avec au moins 166 700 personnes atteintes en 2015 en France (Moisan, et al. 2018). La prévalence de cette maladie augmente au sein des populations âgées avec 2,56 cas sur 1 000 personnes âgées de 60-64 ans, puis 4,75 cas sur 1 000 personnes âgées de 65-69 ans, 8,41 cas sur 1 000 personnes âgées de 70-74 ans et plus de 10 cas sur 1 000 personnes à partir de 75 ans (Moisan, et al. 2018). Les symptômes de la MP varient d'un patient à l'autre mais l'accumulation pathologique d' α -syn est le point commun à tous les cas ainsi que la perte sélective des neurones dopaminergiques. Les neurones dopaminergiques seraient particulièrement sensibles du fait de leur activité électrophysiologique basale constante dépendante du calcium. En effet, l'influx constant de calcium dans le cytoplasme des neurones malgré une capacité de stockage faible induirait un stress oxydatif basal par les mitochondries, même à l'état physiologique (Hirsch, et al. 1992). L'implication de la mitochondrie a également été pointée par des examens post-mortem réalisés sur des cerveaux de patients parkinsoniens où un déficit d'activité du complexe I de la chaîne respiratoire a été mesuré (Schapira, et al. 1990). De plus, la fréquence électrique des neurones dopaminergiques a été retrouvée augmentée dans la substance noire de souris exprimant l' α -syn mutée [A53T] (Subramaniam, et al. 2014). La perte des neurones dopaminergiques est à l'origine des manifestations cliniques de la MP qui peuvent être regroupées en deux grandes familles, les symptômes non-moteurs et les symptômes moteurs. La difficulté des médecins pour diagnostiquer la MP repose sur le fait que les symptômes non-moteurs apparaissent entre 10 et 20 ans avant les premiers signes cliniques de type moteurs. Cette difficulté de diagnostiquer précocement la MP rend l'étude de l'initiation de la MP, avant l'apparition de symptômes moteurs, essentielle pour fournir les traitements adéquats.

A. Marqueurs de la phase « pré-symptomatique » : symptômes non moteurs

La phase pré-symptomatique de la MP correspond à l'apparition de troubles sensoriels que les patients ne sont pas en mesure de discerner par rapport aux

symptômes en lien avec le vieillissement. Il s'agit de manifestations non spécifiques comme des troubles du sommeil, une perte du goût ou de l'odorat ou encore des constipations. Pour cette raison, des études prospectives ont été réalisées afin d'identifier des critères de risque pour prédire l'apparition de la MP (Barber, et al. 2017) (Dinov, et al. 2016).

i. Troubles autonomes

La plupart des patients parkinsoniens présentent des troubles du système nerveux tels que des dysfonctionnements du système digestif, du système urogénital ou encore de la régulation de la tension artérielle (Klingelhoef et Reichmann 2017). Parmi ces troubles, on peut citer la constipation qui est de plus en plus étudiée et qui correspond à un allongement du temps de transit intestinal à cause d'une motilité diminuée. En effet, des liens très forts émergent entre la MP et la modification du microbiote intestinal, à tel point que l'hypothèse d'une origine entérique de la MP est étudiée depuis quelques années (Felice, et al. 2016) (Liddle 2018).

ii. Troubles sensoriels

Une diminution ou une perte du goût ou de l'odorat font partie des troubles communément décrits chez environ 90% des patients parkinsoniens (Tarakad et Jankovic 2017). Parmi les troubles sensoriels ressentis par les patients parkinsoniens, il a été décrit que leur sensation de douleur est plus forte car les récepteurs responsables de la nociception sont hyper-activables (Valek, Auburger et Tegeder 2019). De nombreux troubles du sommeil sont associés à la maladie de Parkinson comme des insomnies ou des hypersomnies et des troubles du sommeil paradoxal (Faludi, et al. 2015). Une étude suggère que les troubles du sommeil et la sensation de douleurs ressenties chez les patients pourraient être directement liées (Vila-Chã, et al. 2019).

iii. Troubles neuropsychiatriques

Contrairement à ce qu'avait décrit James Parkinson en 1817, une partie des patients parkinsoniens présente des troubles neuropsychiatriques (Parkinson 2002) (Reijnders, et al. 2008). En effet, des psychoses, démences ou hallucinations visuelles peuvent être associées et près de 17 à 35% des patients souffriraient de dépression (Reijnders, et al. 2008).

iv. Biomarqueurs et diagnostic précoce de la MP

Les chercheurs et médecins participent à un effort de recherche commun afin d'identifier des biomarqueurs fiables permettant l'indentification précoce de la MP (Prigione, et al. 2010) (Saeed, et al. 2017). Le premier axe de recherche concerne les fluides circulants et notamment le sang dont le prélèvement est aisé et qui permettrait de mesurer un marqueur commun pour l'ensemble des cas de MP avec la détection d'une forme nitrée d' α -synucléine (Prigione, et al. 2010) (Tian, et al. 2019). Un second axe d'étude se concentre sur les modifications du cerveau et de ses fonctions (Saeed, et al. 2017).

B. Marqueurs de la phase « symptomatique » : symptômes moteurs

La phase symptomatique de la MP correspond à l'apparition de troubles locomoteurs chez les patients parkinsoniens. Dans la plupart des cas, ce sont ces symptômes qui permettent aux médecins de diagnostiquer les nouveaux patients. L'apparition des symptômes moteurs est associée à la perte des neurones dopaminergiques et notamment ceux de la *substantia nigra pars compacta*. Ces neurones ont un rôle inhibiteur sur le contrôle du mouvement. C'est donc la perte de cette inhibition qui est responsable des symptômes locomoteurs associés à la MP.

i. Bradykinésie

La bradykinésie est un symptôme locomoteur qui se traduit par une lenteur dans l'exécution des mouvements volontaires. Ce symptôme se manifeste différemment au niveau des membres inférieurs et supérieurs avec, respectivement, une démarche ralentie et des petits pas rapprochés ainsi qu'une lenteur d'exécution des mouvements fins comme l'écriture (Schilder, et al. 2017).

ii. Akinésie

L'akinésie est un symptôme associé avec la bradykinésie. Une akinésie désigne la lenteur d'initiation des mouvements, volontaires ou réflexes (Schilder *et al.*, 2017). Ce symptôme est handicapant au quotidien pour les patients et il est responsable d'une augmentation des accidents domestiques car les patients ont plus de difficultés à éviter une chute ou une brûlure par mouvements réflexes par exemple.

iii. Hypertonie

L'hypertonie musculaire correspond à un tonus musculaire trop élevé. L'hypertonie repose sur la contraction à la fois des muscles agonistes et antagonistes d'un membre lors de l'exécution d'un mouvement et qui mène à une rigidité du membre. Cette hypertonie peut être associée à une rigidité générale du corps, ce qui participe à la lenteur des mouvements. Cette contraction musculaire trop élevée et prolongée mène à des douleurs intenses chez les patients parkinsoniens (Schilder, et al. 2017).

iv. Tremblement de repos

Le tremblement de repos est un signe apparent majeur de la MP. Le tremblement est considéré comme symptomatique de la MP lorsqu'il est involontaire, c'est-à-dire lorsque les muscles ne sont pas stimulés mais au repos.

2) Implication de l' α -synucléine dans la maladie de Parkinson

A. Expression, localisation et rôle

L' α -synucléine (α -syn) est codée par le gène SNCA ou PARK 1/4 (Tableau 1) dont la séquence est très conservée entre espèces animales mais qui n'est pas exprimée par *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* ni par *Drosophila melanogaster* (Siddiqui, Pervaiz et Abbasi 2016). Chez l'Homme, l' α -syn est codée par le gène SCNA, ou PARK 1/4 (Tableau 1) et est exprimée dans le système nerveux central principalement et de manière plus abondante dans le cortex, l'hippocampe et la substance noire (Taguchi, et al. 2016). L' α -syn est exprimée au niveau du soma des neurones présynaptiques puis elle est retrouvée dans le cytoplasme ou en interaction avec des membranes, notamment à la membrane des vésicules présynaptiques (Figure 3) (Burré 2015) (Miraglia, et al. 2018) (Snead et Eliezer 2014). L' α -syn est également exprimée dans le système nerveux périphérique et dans les globules rouges (Tian, et al. 2019).

L' α -syn peut être localisée à différents endroits dans un neurone, en interactions avec des organites ou à la membrane plasmique et semble être impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires. En effet, l' α -syn a été observée à la membrane plasmique des neurones présynaptiques et elle semble être impliquée dans le contrôle, le relargage et le recyclage des vésicules de neurotransmetteurs (Goers, et al. 2003) (Snead et Eliezer 2014). Le neurotransmetteur principalement impacté dans la MP est la dopamine. Il a été montré que l' α -syn module la synthèse en interagissant directement avec la tyrosine hydroxylase (TH) (Butler, Sambo et Khoshbouei 2017). Le fonctionnement des neurones dopaminergiques est donc en partie dépendante de l' α -syn (Perez, et al. 2002) (Venda, et al. 2010). L' α -syn a été localisée à la membrane des mitochondries et semble être capable de contrôler l'activation de l'apoptose en inhibant le relargage du cytochrome c par la mitochondrie en condition de stress oxydatif (Di Maio, et al. 2016). Il a été décrit que l' α -syn était impliquée dans la stabilité du cytosquelette d'actine des neurones (Ordóñez, Lee

et Feany 2018) et serait capable, par ce biais, de moduler les fonctions mitochondriales (Figure 3) (Menges, et al. 2017).

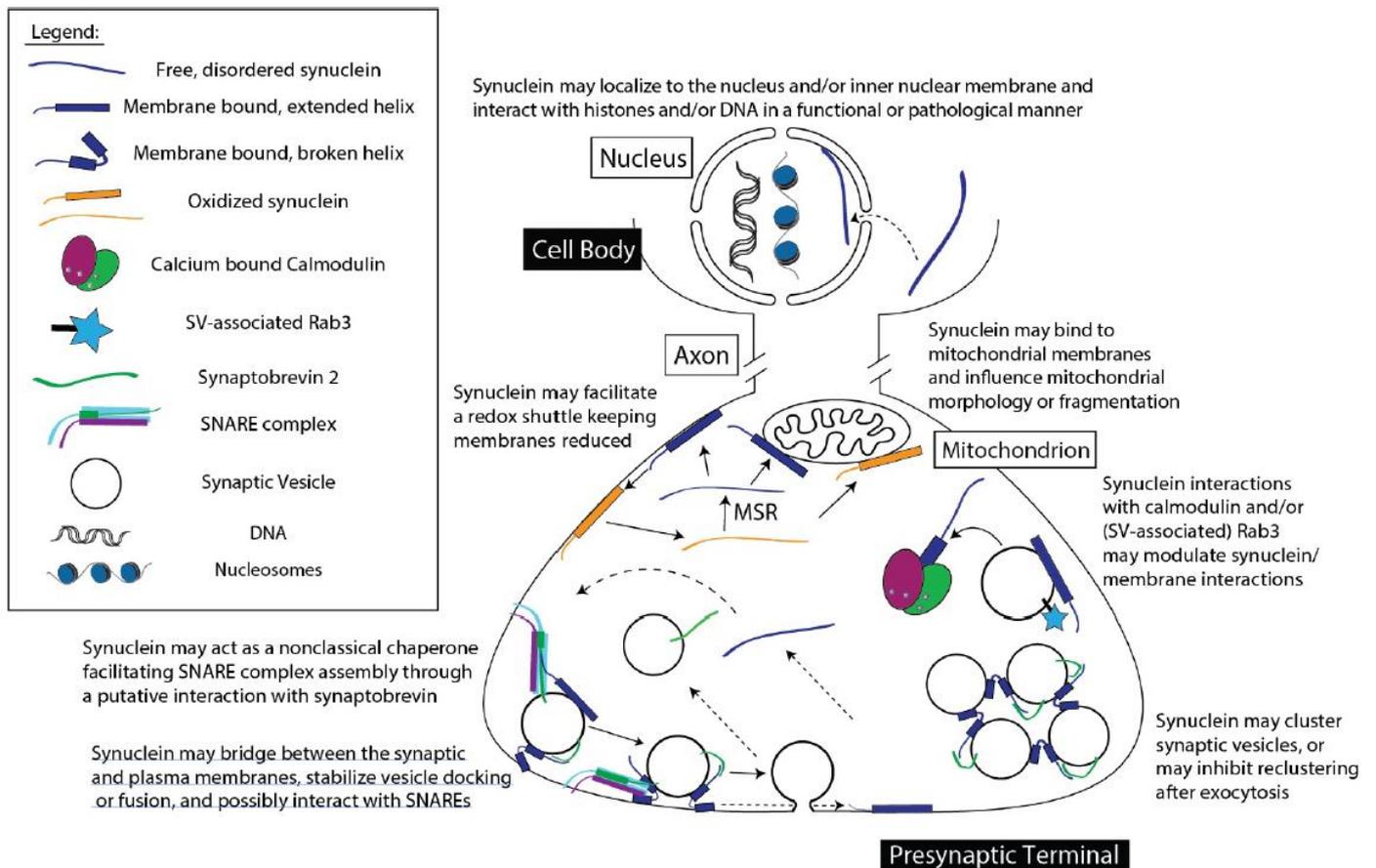


Figure 3 : Membranes, cibles et voies cellulaires, avec lesquelles l' α -synucléine interagit potentiellement en conditions physiologiques.

En conditions physiologiques dans la cellule neuronale, l' α -synucléine peut exister sous plusieurs conformations spatiales, désordonnée ou ordonnée en hélice. La forme désordonnée est libre dans le cytoplasme alors que la forme conformée en hélice peut interagir avec des membranes comme la membrane plasmique, la membrane mitochondriale ou encore celle des vésicules d'exocytose, de type vésicules synaptiques notamment. En conditions de stress oxydatif, l' α -synucléine oxydée interagit différemment avec la membrane mitochondriale et module la stabilité du cytosquelette d'actine de la mitochondrie et par conséquent sa dynamique du fusion/fission.

Schéma de (Snead et Eliezer 2014)

B. Séquence et mutations génétiques

L' α -syn est une protéine de 140 acides aminés qui est structurée en 3 domaines : un domaine N-terminal, un domaine « NAC » (non-amyloid component) et un domaine C-terminal (Figure 4). Le domaine N-terminal est composé de répétitions qui sont particulièrement conservés (XKTKEGVXXXX) et qui sont spécifiques de l' α -syn (George 2002). Cette séquence répétée forme une hélice alpha amphipathique qui permet à l' α -syn d'interagir avec les membranes et d'y être localisée en conditions physiologiques (Dikiy et Eliezer 2012) (Dettmer, et al. 2015). La présence des 5 mutations associées à des formes familiales de la MP dans la région amphipathique de l' α -syn rend compte de l'importance de cette région. En effet, le développement de la MP reposerait sur des mécanismes en lien avec une agrégation induite par les lipides (Galvagnion, et al. 2015) (Iyer, et al. 2016). Le domaine NAC pour « Non-Amyloid- β Component of senile plaques », est un domaine hydrophobe qui est nécessaire à l'agrégation de l' α -syn. En effet, l'altération ou la suppression de ce domaine diminue les capacités d'oligomérisation de l' α -syn et notamment à cause des interactions entre les domaines NAC et C-ter de l' α -syn (Jha, et al. 2018). Le domaine C-terminal de l' α -syn porte une charge négative nette car il est riche en proline ainsi qu'en résidus acides qui lui confère une structure tridimensionnelle aléatoire en hélice dépliée. La séquence de ce domaine est homologue à celle des petites protéines chaperonnes de type « heat shock protein », ce qui suggère une fonction potentiellement similaire de l' α -syn (Kim, et al. 2004). La tyrosine en position 125 et la sérine en position 129 peuvent être phosphorylées mais la phosphorylation de l'une exclue celle de l'autre. L' α -syn phosphorylée sur la sérine en position 129 est retrouvée accumulée dans les corps de Lewy dont elle est le composant majoritaire, ce qui suggère une implication de cette modification post-traductionnelle dans l'agrégation de l' α -syn (Cavallarin, Vicario et Negro 2010).

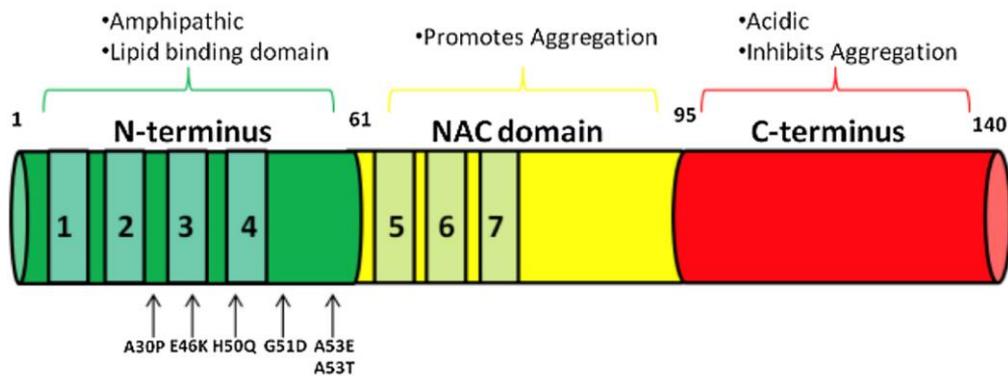


Figure 4 : Schéma de la séquence protéique de l'α-synucléine.

Le schéma indique les 3 régions de l'α-synucléine avec la région amphipatique qui est composée de séquences répétées menant à une conformation tridimensionnelle en hélice alpha sur laquelle repose son interaction avec les lipides. Cette région N-terminale contient les 5 mutations ponctuelles décrites pour être à l'origine de formes familiales de la maladie de Parkinson. Le domaine NAC, pour « Non-Aymoïd-β Component of senile plaques », est associé à la capacité de l'α-synucléine à s'agréger. Le domaine C-terminal est particulièrement riche en résidus acides qui confèrent une conformation dépliée à ce domaine qui est le lieu de phosphorylations qui s'excluent l'une l'autre dont la phosphorylation en sérine 129, dite pathologique, qui est retrouvée accumulée dans les corps de Lewy.

Schéma de (Emamzadeh 2016)

Le lien entre l'α-syn et la MP a été établi en 1997 par l'équipe de Polymeropoulos qui a étudié le génome de plusieurs familles présentant une incidence de la MP plus forte que la population générale (Polymeropoulos, et al. 1997). Le polymorphisme causant la mutation A53T a été le premier à être identifié dans des cas familiaux de la MP. A ce jour, cinq mutations ont été identifiées : A30P, E46K, H50Q, G51D, A53T (Khalaf, et al. 2014) (Healey, Woodside et Tuszynski 2016). Ces mutations sont rares et représenteraient environ 1 à 2% des patients parkinsoniens (Gasser 2015). Les mutations de l'α-syn affecte la région N-terminal qui est responsable de l'interaction avec les lipides et entraîneraient une conformation de l'α-syn en feuillets bêta. Cette conformation mise en évidence *in vivo* favorise l'agrégation de l'α-syn et est corrélée *in vitro* à une nucléation sur les membranes et à une élongation accélérée des fibrilles d'α-syn (Figure 5) (Flagmeiera, et al. 2016). Le gène codant pour l'α-syn est également retrouvé sous forme sauvage mais dupliqué ou tripliqué dans des cas familiaux de MP. La gravité des symptômes semble être corrélée au nombre du gène SNCA chez le patient ainsi qu'à une

progression plus rapide (Chartier-Harlin, et al. 2004). Cette corrélation semble indiquer que la concentration en l' α -syn serait déterminante dans le développement de la MP.

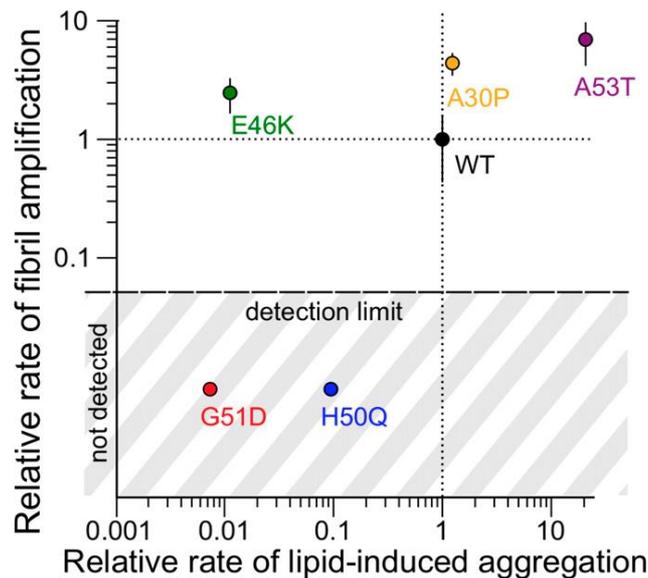


Figure 5 : Les mutations ponctuelles du gène codant pour l' α -synucléine associées à des formes familiales de la maladie de Parkinson modifient l'agrégation induite par les lipides et le taux d'amplification des fibrilles d' α -synucléine *in vivo*.

Les taux d'amplification des fibrilles et d'agrégation induite en présence de vésicules lipidiques sont normalisées par rapport à celles de la forme WT de l' α -synucléine. Le taux d'agrégation de l' α -synucléine correspond à la nucléation, ou formation d'hélice α , à partir d' α -synucléine monomérique en solution en présence de vésicules lipidiques mimant les membranes cellulaires. Les mutations A30P et A53T augmentent l'agrégation de l' α -synucléine par rapport à la forme WT alors que les mutations E46K, G51D et H50Q la diminuent. L'amplification des fibrilles d' α -synucléine correspond à l'élongation de fibrilles préformées dans une solution d' α -synucléine monomérique. Les mutations E46K, A30P et A53T provoquent une accélération de la nucléation de l' α -synucléine par rapport à la forme WT alors que les mutations G51D et H50Q ne permettent pas de détecter de forme agrégée. Figure de (Flagmeiera, et al. 2016)

C. Modifications post-traductionnelles

L' α -syn peut présenter diverses modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'oxydation, l'ubiquitination, la nitration, la troncation, la sumoylation, la glycosylation ou l'acétylation (Barrett et Greenamyre 2015) (Schmid, Fauvet, et al.

2013). Ces modifications influent sur l'oligomérisation de l' α -syn mais la contribution précise de ces différentes modifications dans le développement de la MP n'est pas complètement définie. Ces modifications se situent dans la partie C-terminale de l' α -syn qui est dépliée non conformée et donc accessible aux enzymes en condition physiologique. Ces modifications post-traductionnelles qui altèrent la répartition des charges sont décrites pour favoriser l'agrégation de l' α -syn en modifiant la conformation tridimensionnelle de la partie C-ter puis de la protéine entière (van der Wateren, et al. 2018).

i. La phosphorylation en Tyr 125 ou en Ser129

La phosphorylation en sérine 129 (Pser129) de l' α -syn est un marqueur majeur de la MP (Fujiwara, et al. 2002). En effet, cette marque est retrouvée sur environ 4% de l' α -syn totale mais 90% de l' α -syn accumulée dans les corps de Lewy est phosphorylée en sérine 129 (Figure 1) (Spillantini, et al. 1997) (Jucker et Walker 2013). Ce marqueur caractéristique des corps de Lewy a été considéré comme l'élément pathologique à l'origine de la mort des neurones dopaminergiques (Chen et Feany 2005). Plus récemment, une hypothèse opposée a émergé proposant les corps de Lewy comme un moyen pour la cellule de réduire la quantité d' α -syn toxique libre en la séquestrant (Riederer, et al. 2019). Dans ce contexte, la phosphorylation en sérine 129 de l' α -syn correspondrait à un adressage de la protéine pour une dégradation par une voie spécifique de l'autophagie sous forme d'agrésome (dégradation de l' α -syn par l'autophagie décrite en partie II. 3).

ii. Ubiquitination

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle induisant un adressage d'une protéine mal conformée ou à dégrader vers le protéasome. L'ubiquitination correspond à la liaison réversible d'une ou plusieurs protéines d'ubiquitine sur les résidus lysines qui sont des sites d'ubiquitination. Il est à noter que le second composant le plus abondant dans les corps de Lewy est l'ubiquitine. Cette accumulation indique donc

un besoin pour la cellule de dégrader l' α -syn toxique (dégradation de l' α -syn par la voie du protéasome décrite en partie II. 2) (Bennett, et al. 1999) (Dyllick-Brenzinger, et al. 2010) (Riederer, et al. 2019).

D. Equilibre dynamique entre les formes mono- et oligomériques

Les mutations ponctuelles (A53T, A30P, E46K, H50Q ou G51D) ou les multiplications (duplications et triplications) identifiées au sein du gène PARK1/4 codant pour l' α -syn sont liées aux formes familiales de la MP et présentent une agrégation accrue (Polymeropoulos, et al. 1997) (Ibáñez, et al. 2004) (Flagmeiera, et al. 2016) (Ki, et al. 2007). Actuellement, la communauté scientifique considère plutôt l'agrégation de l' α -syn comme une conséquence de processus pathologiques sous-jacents plutôt que comme la cause première à l'origine du développement de la MP (Alexopoulou, et al. 2016) (Hasegawa, et al. 2017) (Navarro-Yepes, et al. 2016).

Il est actuellement décrit que l' α -syn sous forme homo-tétramérique serait plus stable, n'aurait pas la capacité de s'agréger en fibrilles pathologiques et remplirait des fonctions physiologiques en lien avec son interaction avec les vésicules synaptiques (Gajula Balija, et al. 2011) (Burré 2015). En conditions pathologiques, les tétramères seraient déstabilisés et l' α -syn retrouverait une conformation oligomérique (Lashuel, et al. 2002) (Khalaf, et al. 2014). Cette hypothèse est supportée par une étude qui pointe l'effet des mutations familiales sur la déstabilisation du domaine N-terminal (Dettmer, et al. 2015). En effet, la perturbation dans les motifs consensus répétés KTKEGV et donc des hélices alpha du domaine N-terminal et du domaine NAC induirait une déstabilisation des tétramères d' α -syn et une accumulation de formes monomériques (Figure 6). La formation de fibrilles d' α -syn est une réaction de nucléation par laquelle des monomères solubles sont convertis en une structure oligomérique insoluble organisée en feuillets β (Lashuel, et al. 2002). Les formes intermédiaires entre ces deux formes d' α -syn sont appelées oligomères. Les fibrilles d' α -syn peuvent avoir une conformation en fibrille ou en ruban et être à l'origine d'une toxicité qui reposent sur des mécanismes différents (Figure 6) (Miraglia, et al. 2018) (Spillantini et Goedert 2018).

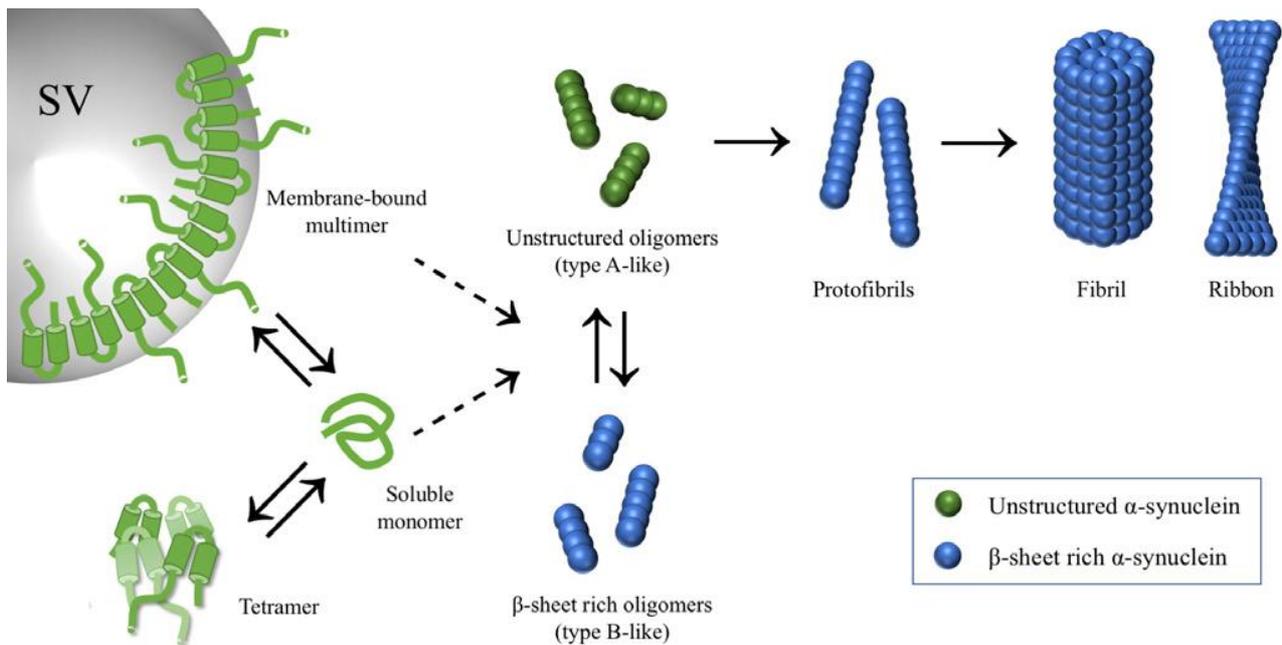


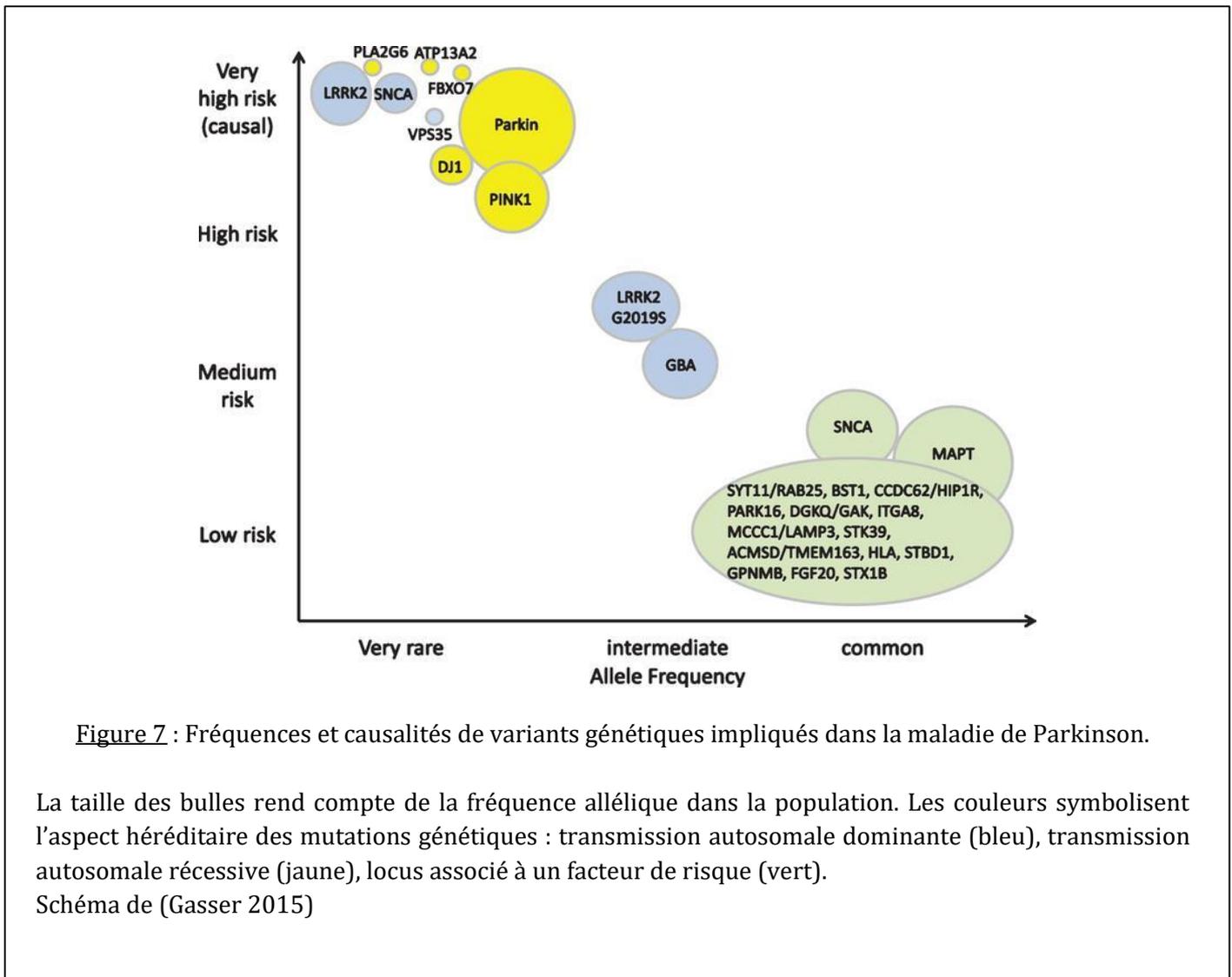
Figure 6 : Formation des fibrilles d' α -synucléine

En condition physiologique, l' α -synucléine est retrouvée sous forme de monomère désordonné en équilibre dynamique avec sa forme multimérique qui est liée aux vésicules présynaptiques (SV). L' α -synucléine est également décrite sous forme d'homo-tétramère stable qui peut être dissout en monomères qui pourront s'agréger en oligomères désordonnés solubles ou en oligomères insolubles ayant une configuration spatiale en feuillet bêta. Ces agrégats insolubles peuvent interagir et former des structures organisées de type fibrillaire. Schéma de (Miraglia, et al. 2018)

3) Autres mutations génétiques impliquées dans la maladie de Parkinson

Les mutations génétiques menant au développement de la MP ont d'abord été identifiées dans le gène SCNA ou PARK1/4 codant pour l' α -syn car son accumulation dans les corps de Lewy avait déjà été mise en évidence. L'identification d'autres mutations dans des locus et menant à une fréquence élevée de cas de MP dans certaines familles ont permis d'identifier d'autres gènes PARK (Tableau 1). De manière générale, les mutations situées dans des locus reconnus comme étant des facteurs de risque sont relativement

communes et fréquentes dans la population alors que les mutations associées à des transmissions autosomales dominantes sont les plus rares (Figure 7).



4) Facteurs de risques environnementaux de la maladie de Parkinson : les agents phytosanitaires

La plupart des facteurs de risques environnementaux ayant une incidence sur le développement de la MP ont été décrit à la suite de contaminations aiguës et d'apparition de symptômes ressemblant à ceux de la MP. C'est le cas de certaines substances comme les produits phytosanitaires qui étaient mis sur le marché puis retirés après des cas

d'intoxication aient été signalés. Aujourd'hui, les produits phytosanitaires sont testés en laboratoire principalement pour évaluer leur hépato-toxicité et s'assurer de l'action détoxifiante des enzymes du foie.

L'exposition de la population générale aux pesticides se fait principalement par l'alimentation qui peut présenter des résidus de pesticides (Oates et Cohen, 2011). Il a été montré que les professions agricoles utilisant le paraquat (PQ) et la roténone étaient 2,5 fois plus susceptibles de développer la MP que la population générale qui n'est pas en contact avec ces pesticides (Tanner, et al. 2011). Par conséquent, les pesticides roténone et paraquat représentent un facteur de risque pour le développement de la MP.

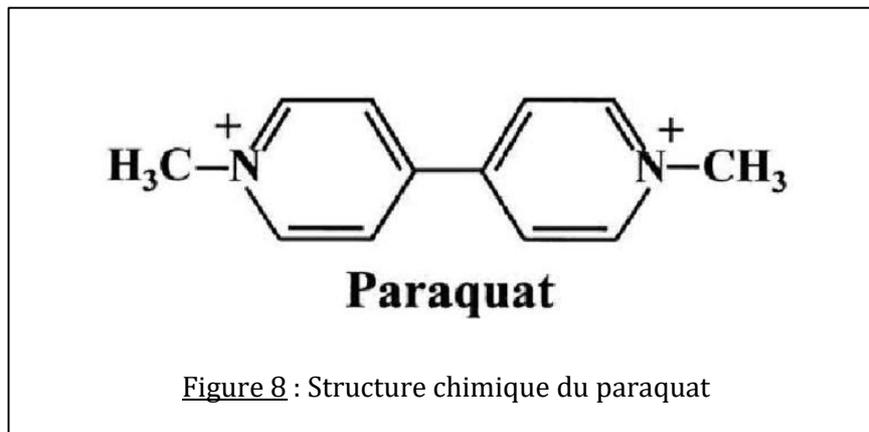
A. Pesticide : la roténone

La roténone est un insecticide naturel dont l'usage était autorisé en agriculture biologique jusqu'en 2008. A cette date, son autorisation de mise sur le marché a été retiré par la commission européenne. Ce retrait faisait suite à l'identification de symptômes liés à son utilisation comme une diminution de la fertilité, une augmentation du nombre de fausses-couches et l'apparition de symptômes ressemblant à ceux de la MP. La roténone est une molécule hydrophobe qui est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique et d'être toxique directement dans les neurones du système nerveux central. La toxicité de la roténone repose sur sa capacité à bloquer l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui entraîne une diminution de la respiration et donc de la production d'ATP dans la cellule. En plus de cette action directe sur la mitochondrie, les mécanismes toxiques induisant la mort des neurones dopaminergiques avec l'activation de la voie pro-apoptotique JNK, ont été élucidé grâce à des études réalisées sur des modèles cellulaires (Klintworth, et al. 2007) (Newhouse, et al. 2004). Bien qu'interdite en France, l'usage de la roténone est utile en laboratoire afin de modéliser l'induction de symptômes de types parkinsoniens comme une perte des neurones dopaminergiques ou des troubles moteurs comme cela a été fait chez le rat (Cannon, et al. 2009) ou encore chez la Drosophile (Coulom et Birman 2004). Le développement de modèles animaux pour l'étude de la MP a permis de mettre en évidence que les substances environnementales comme le MPTP, la roténone ou le

paraquat ont des modes d'action différents et une sélectivité tissulaire par exemple (Richardson, et al. 2005) (Tanner, et al. 2011).

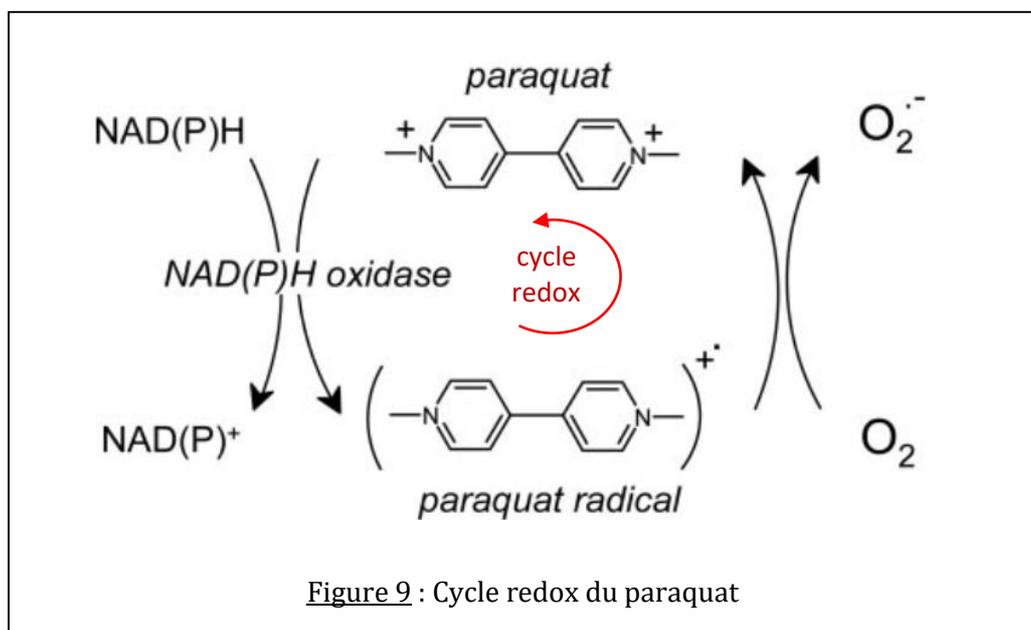
B. Herbicide : le paraquat

Le paraquat (PQ) a été utilisée dès 1955 pour ses propriétés herbicides et c'est actuellement le second herbicide le plus utilisé dans le monde après le glyphosate. Les institutions de santé européennes ont classifié comme toxique l'inhalation, le contact avec la peau et l'ingestion du PQ et son usage a été interdit en 2011 en Europe. Le PQ est largement utilisé en agriculture dans le monde car il s'agit d'un herbicide non sélectif qui agit sur les plantes par contact.



Le PQ aspergé sur les plantes est rapidement absorbé par les feuilles où son action toxique a lieu sur les chloroplastes. Dans les chloroplastes, le PQ interfère le photosystème I qui intervient dans la photosynthèse. Le PQ bloque le flux d'électrons provenant du photosystème I entre la ferredoxine et le NADP⁺ et les électrons réduisent le PQ en le faisant passer de l'état de cation divalent à l'état réduit de cation monovalent (Figure 9). Le PQ⁺ à l'état de cation monovalent réduit l'oxygène O₂ en radical superoxide O₂⁻. Le PQ⁺ peut subir un cycle redox et être recyclé en PQ. La diminution de la quantité de NADP⁺ induit une baisse d'activité des chloroplastes et le radical superoxide provoque des dommages sur l'ADN qui engendre la mort des cellules et enfin de la plante. De manière similaire dans la mitochondrie, le PQ interfère avec le flux d'électrons provenant du complexe I de la chaîne respiratoire (Costello, et al. 2009) (Dinis-Oliveira, Remiao, et

al. 2006). La toxicité de cette molécule utilisée comme herbicide est également toxique sur les cellules animales, au laboratoire sur le lignée cellulaire SH-SY5Y par exemple ou même chez l'Homme (Fukushima, et al. 1993) (Tanner, et al. 2011). La toxicité première du PQ repose sur le stress oxydatif qui, à son tour, induit l'activation d'autres voies qui mènent à la mort cellulaire (Richardson, et al. 2005). En effet, ce stress oxydatif a été décrit pour activer la voie de l'autophagie (R. Gonzalez-Polo, M. Niso-Santano, et al. 2007b), le blocage du protéasome (Yang et Tiffany-Castiglioni 2007) et la mort cellulaire par apoptose (Dinis-Oliveira, Duarte, et al. 2008) (R. Gonzalez-Polo, M. Niso-Santano, et al. 2007a) (Grant, Lantos et Parkinson 1980) (Klintworth, et al. 2007) (Li et Sun 1999) (Gonzalez-Polo, Rodriguez-Martin, et al. 2004) (McCarthy, et al. 2004) (Niso-Santano, Bravo-San Pedro, et al. 2011) (Richardson, et al. 2005). Un lien direct entre l'agrégation de l' α -syn et le PQ a également été mis en évidence *in vitro* avec une accélération de l'agrégation de l' α -syn dans une solution contenant du PQ (Uversky, Li et Fink 2001). Les modèles de rongeurs, qui expriment une α -syn endogène, permettent d'étudier l'effet d'une exposition au PQ sur l'agrégation de l' α -syn (Norris, et al. 2007) (Zeng, Geng et Jia 2018). Ces modèles ont permis de mettre en évidence qu'une exposition chronique au PQ induisait une surexpression de l' α -syn dans le système nerveux des souris ainsi qu'une accumulation de l' α -syn pathologique, phosphorylée en sérine 129 (Pser129) dans le système nerveux central mais également dans le système nerveux entérique (Manning-Bog, et al. 2002) (Zeng, Geng et Jia 2018).



II. Mécanismes cellulaires impliqués dans la réponse aux stress liés à la maladie de Parkinson

Le développement de la MP repose sur des stress cellulaires qui s'accumulent avec le temps, avant l'apparition des premiers symptômes et donc bien avant le diagnostic. Parmi les stress identifiés, on peut citer l'accumulation et/ou l'agrégation et/ou les modifications post-traductionnelles de l' α -syn dans les neurones. On peut également citer le stress oxydatif qui peut être induit directement par des molécules de l'environnement telles que les pesticides ou bien de manière indirecte en conséquence de l'agrégation de l' α -syn.

La surexpression, le mauvais repliement ou l'agrégation de l' α -syn sont des modifications auxquelles la cellule répond en activant des mécanismes de réponse afin de rétablir l'homéostasie. En effet, l'accumulation d' α -syn dans le cytoplasme sera prise en charge par des systèmes de dégradation des protéines telles que le système de l'ubiquitine-protéasome ou la voie de l'autophagie. De plus, l'accumulation d' α -syn mal conformée et accumulée dans le réticulum endoplasmique (RE) activera les voies de stress en réponse aux protéines mal conformées dans le RE, également appelée voie UPR pour « unfolded protein response ».

1) Fonctions physiologiques de la voie UPR et implications dans la maladie de Parkinson

L'activation de la voie UPR repose sur l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE. En effet, la protéine chaperonne résidente du RE, GRP78/BiP, inhibe l'activation de la voie UPR en se liant à trois protéines transmembranaires, ATF6, PERK et IRE1 (Figure 10). L'activation de ces trois voies de signalisation UPR repose sur la relocalisation de la protéine GRP78/BiP qui se lie avec une plus grande affinité aux protéines mal repliées dans le RE. L'activation de ces voies de signalisation induit une réponse adaptative de la cellule avec une diminution de la synthèse de protéines et lipides

nécessitant des modifications dans le RE et avec une augmentation de l'expression et de l'activation de protéines aux fonctions de chaperonnes ou de dégradation des protéines. En effet, une activation de la réponse UPR induit la surexpression de protéines chaperonnes cytoplasmiques ou résidentes du RE, la surexpression d'enzymes protéolytiques, la diminution de la traduction des protéines et de la synthèse des lipides. On peut également citer l'activation du système ERAD, pour « Endoplasmic Reticulum Associated Degradation » qui consiste à mobiliser le protéasome, un système de dégradation des protéines cytoplasmiques (Figure 10) (Kocaturk et Gozuacik 2018). En effet, le système ERAD permet de réduire le stress subi par le RE grâce à la translocation des protéines mal repliées du RE vers le cytoplasme. Un complexe de translocation contenant une ubiquitine-ligase E3 est responsable de l'ubiquitination des protéines provenant du RE vers le cytoplasme où elles seront dégradées par le protéasome. L'activation de la voie de l'autophagie est induite par la voie UPR afin de supporter la dégradation des protéines mal conformées afin d'éviter une accumulation dans le RE (Fouillet, et al. 2012). Malgré la mise en place de ces réponses adaptatives, une activation prolongée de la voie UPR est associée à une activation de la voie de l'apoptose menant à la mort cellulaire (Holtz et O'Malley 2003) (Ryu, et al. 2002).

Dans le contexte de la MP, l'agrégation de l' α -syn est centrale avec l'accumulation de sa forme phosphorylée en sérine 129 dans les corps de Lewy. Il a été mis en évidence que l'activation de la voie UPR dans un contexte d'agrégation de l' α -syn est dépendante de cette phosphorylation en sérine 129 pour la lignée cellulaire SH-SY5Y (Sugeno, et al. 2008). Il a également été montré que l' α -syn interagissait directement avec la protéine BiP/GRP78 en conditions physiologiques et que l' α -syn s'accumulait dans le RE où elle induisait une activation chronique de la voie UPR puis la mort des neurones chez la souris (Colla, et al. 2012). L' α -syn sous forme agrégée mais pas monomérique pourrait également se lier et activer SERCA, une pompe responsable de l'entrée du Ca^{2+} dans le RE (Betzer, et al. 2018). Cette entrée de Ca^{2+} dans le RE serait suivie d'un relargage dans le cytoplasme puis d'un stockage dans la mitochondrie. Cette entrée de Ca^{2+} dans la mitochondrie mènerait à un relargage du cytochrome c et de l'activation de l'apoptose (Betzer, et al. 2018).

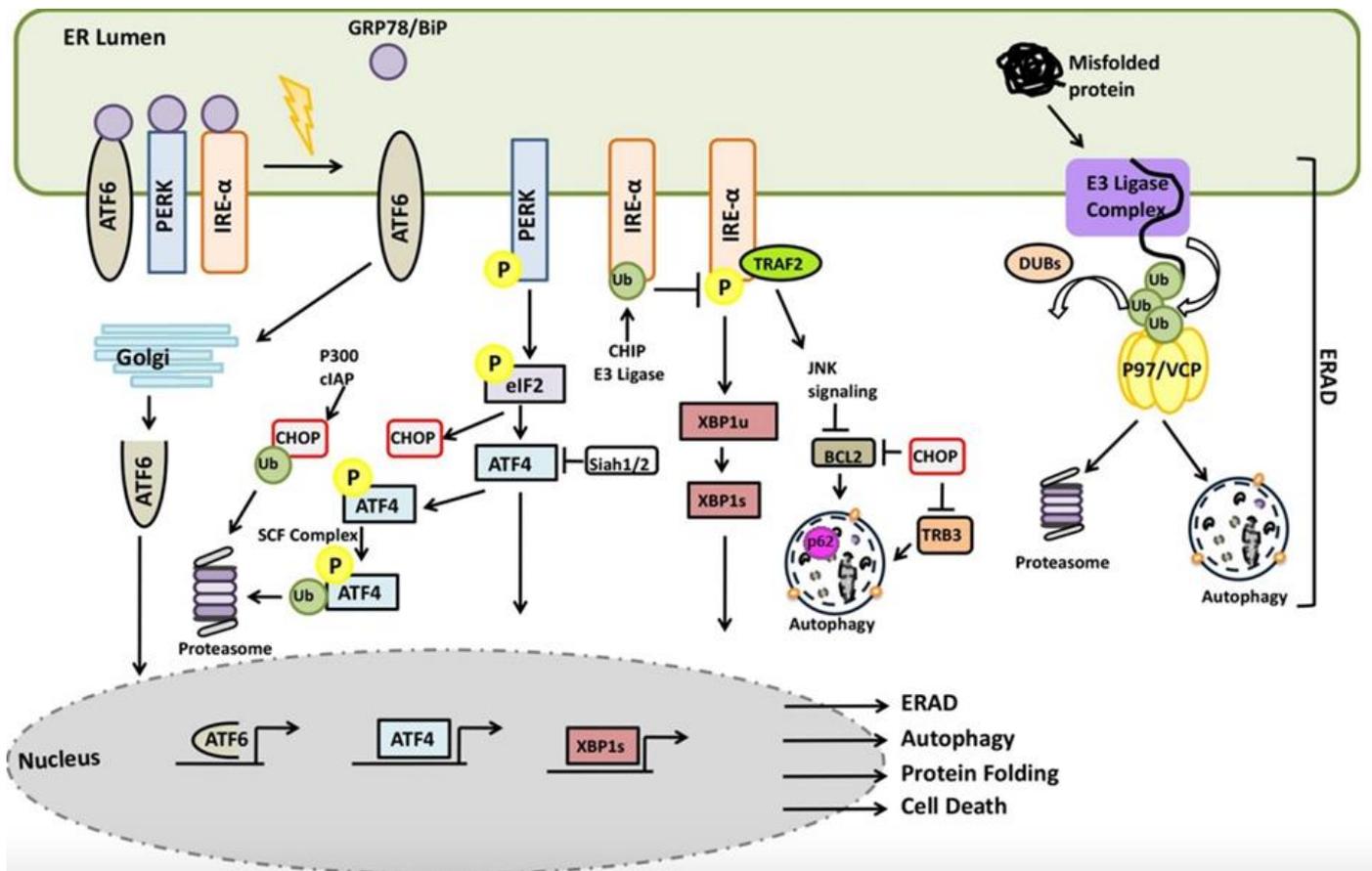


Figure 10 : Schéma récapitulatif des voies de stress du réticulum endoplasmique

La protéine GRP78/BiP se lie aux protéines mal conformées dans le réticulum endoplasmique (RE) avec une plus grande affinité qu'aux protéines ATF6, PERK et IRE1. La relocalisation de GRP78/BiP conduit à l'activation des voies de signalisation associées au RE. Cette activation mène à l'expression de protéines impliquées dans le repliement et/ou la dégradation des protéines mal conformées ou à l'activation de l'apoptose. Les systèmes cytoplasmiques du protéasome et de l'autophagie peuvent également être activés dans ce contexte d'accumulation des protéines mal conformées dans le RE (ERAD).

Adaptée de (Kocaturk et Gozuacik 2018)

2) Fonctions physiologiques de la voie ubiquitine-protéasome et implications dans la maladie de Parkinson

Le protéasome est un complexe protéique responsable de la dégradation de protéines cytoplasmiques préalablement ubiquitinées. En effet, les protéines reconnues comme mal repliées par des chaperonnes sont ubiquitinées sur les lysines de leur séquence. Ce système joue également un rôle essentiel dans la dégradation des protéines qui sont impliquées dans le cycle cellulaire, la prolifération, l'apoptose, le contrôle de la transcription, la transduction du signal et la régulation du métabolisme. En effet, de nombreuses enzymes constituent des points de contrôle de ces voies métaboliques et elles sont donc des cibles d'une dégradation fréquente par le système ubiquitine-protéasome (UPS). Les protéines porteuses de chaînes d'ubiquitines liées par la lysine en position 48 (K48) sont sélectivement adressées au protéasome. La sous-unité 19S, appelée sous-unité régulatrice du protéasome, est responsable de la reconnaissance des chaînes d'ubiquitines, composées d'au moins 4 résidus ubiquitines (Figure 11). C'est la sous-unité 20S, appelée sous-unité catalytique du protéasome, qui est responsable de la dégradation des protéines ubiquitinées en peptides de 7 à 9 acides aminés qui seront ensuite recyclés (Figure 11). Le protéasome est retrouvé dans le cytoplasme ou bien associé au RE dans le cadre du système de dégradation ERAD. La voie ubiquitine-protéasome (UPS) est donc responsable de la dégradation des protéines mal repliées cytoplasmiques mais également de celles accumulées dans le RE.

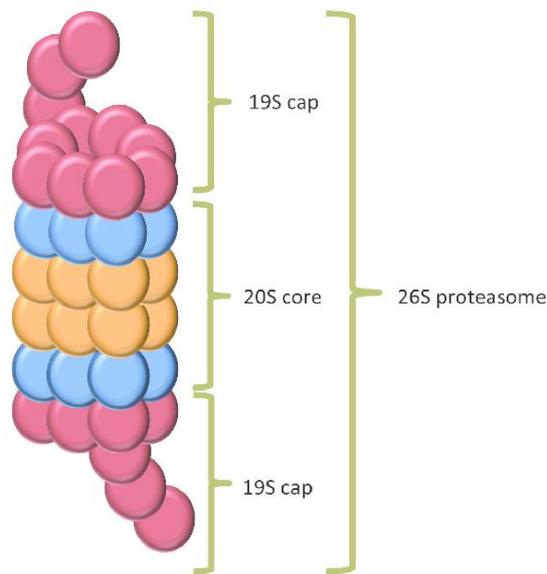


Figure 11 : Structure du protéasome

Le protéasome est constitué d'une sous-unité catalytique centrale 20S et de deux sous-unités régulatrices 19S responsables du repliement des protéines mal conformées.
Schéma modifié de (Lub, et al. 2016)

Dans le cadre de la MP, il a été montré que l' α -syn monomérique peut former des agrégats d'oligomères solubles. Lors d'une nouvelle agrégation et/ou modification structurelle, l' α -syn oligomérique s'accumule et forme des fibrilles insolubles, également appelées proto-fibrilles. L'accumulation de ces structures aboutit éventuellement à la formation de corps de Lewy (LB) et/ou de neurites de Lewy (LN) (Figure 12) (Prasad, et al. 2019). Les oligomères solubles sont principalement dégradés par le protéasome ou peuvent être dissous, dans une certaine mesure, en monomères par des protéines chaperonnes comme Hsp70 par exemple (Figure 12, flèches bleues) (Prasad, et al. 2019). Une fois que les oligomères solubles sont formés, ils s'agrègent rapidement et deviennent insolubles. Les agrégats insolubles d' α -syn semblent être éliminés principalement par autophagie (Prasad, et al. 2019). De manière surprenante, une étude suggère que la dégradation de l' α -syn par le protéasome participerait à son oligomérisation *in vitro* à cause de la libération du fragment C-terminal de l' α -syn lors de sa protéolyse (Lewis, et al. 2010). Cette forme tronquée d' α -syn serait retrouvée enrichie dans les corps de Lewy. L' α -syn sous forme de proto-fibrille, notamment l' α -syn mutée [A53T], serait capable

d'inhiber le système ubiquitine-protéasome, *in vitro* (McNaught, et al. 2001) et également *in vivo* (Bengoa-Vergniory, et al. 2017). Cependant, une étude contradictoire a conclu que l' α -syn agrégée n'inhibait pas le protéasome à elle seule mais que la combinaison entre une surexpression de l' α -syn et une déprivation de sérum, générant un stress oxydatif et une activation de l'autophagie, induisait l'accumulation d'agrégats d' α -syn dans des lignées cellulaires (Dyllick-Brenzinger, et al. 2010). Ce résultat suggère que la neurodégénérescence en lien avec l'agrégation de l' α -syn reposerait sur les effets convergents entre le stress oxydatif qui augmente au cours du vieillissement et la diminution des capacités de dégradation des protéines mal repliées par le protéasome.

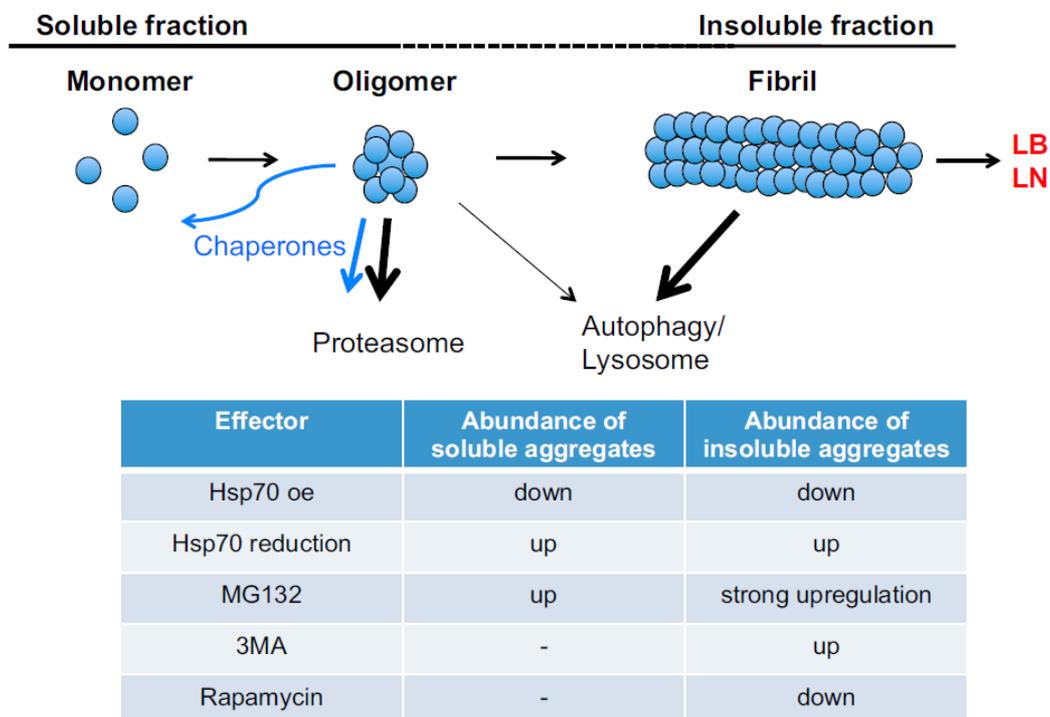


Figure 12 : Schéma de la dégradation de l' α -synucléine par le protéasome et la voie de l'autophagie

Effets des modifications des voies de dégradation des protéines cellulaires sur l'abondance des agrégats solubles ou insolubles d' α -syn. La surexpression (oe) de la chaperonne Hsp70 réduit l'abondance des agrégats d' α -syn solubles et insolubles et sa réduction a l'effet inverse. L'inhibition du protéasome par l'administration de MG132 augmente les agrégats solubles d' α -syn et d'autant plus les agrégats insolubles. La modification de l'autophagie n'a aucun impact sur les agrégats solubles d' α -syn. L'abondance d'agrégats insolubles d' α -syn augmente légèrement lors de l'inhibition de l'autophagie (3MA) et diminue lors de l'augmentation de l'autophagie (rapamycine).

Figure de (Prasad, et al. 2019)

Le flux des protéines ubiquitinées à dégrader par le protéasome peut être régulé par des enzymes appelées déubiquitines-ligases, ou DUB, qui sont responsables de la déconjugaison des chaînes d'ubiquitines. L'action de ces DUB est donc d'augmenter le temps de demi-vie avant leur prise en charge par le protéasome. Une étude a démontré l'importance de la DUB Usp8 qui est retrouvée dans les corps de Lewy (Alexopoulou, et al. 2016). Cette étude a mis en évidence que la présence de Usp8 dans les corps de Lewy était inversement proportionnelle à la présence d' α -syn contenant des chaînes d'ubiquitines liées à K63 qui était significativement réduite dans les neurones dopaminergiques chez les Drosophiles. La présence de Usp8 prolonge ainsi la demi-vie de l' α -syn dans les neurones et favorise sa toxicité en empêchant son adressage au protéasome (Alexopoulou, et al. 2016). Les DUBs pourraient être impliquées dans les cas sporadiques de la MP et représenter un facteur de risque.

Plusieurs études ont mis en évidence que l'activité catalytique du protéasome était inhibée ou qu'il pouvait être dissocié en condition de stress oxydatif (Ding et Keller 2001) (Zhao, et al. 2017). Cette altération du protéasome a notamment été retrouvée en condition d'exposition de la lignée cellulaire SH-SY5Y au paraquat (PQ), un herbicide lié au développement de la MP (Wang, et al. 2006) et (Yang et Tiffany-Castiglioni 2007). La composante environnementale de la MP semble donc être directement impliquée dans le blocage de ce système de dégradation des protéines mal repliées comme l' α -syn par exemple. D'autres effets d'une exposition au PQ sur la voie UPS ont été mis en évidence dans la lignée cellulaire dopaminergique SK-N-SH (Navarro-Yepes, et al. 2016). En effet, cette étude a mis en évidence qu'une exposition au PQ induisait une diminution de l'ubiquitine au niveau protéique mais pas de son ARNm et que cela était corrélé avec une dimérisation/inactivation de la protéine Ref(2)-P/p62 qui interagit avec l'ubiquitine et est responsable de la dégradation des protéines ubiquitinées par autophagie. La toxicité du PQ en lien avec l'agrégation de l' α -syn pourrait reposer sur une altération des voies de dégradation des protéines dépendantes de l'ubiquitine avec un effet direct sur l'inhibition de la voie de l'UPS et, par ce biais, sur la dégradation des protéines mal repliées par la voie de l'autophagie (Navarro-Yepes, et al. 2016).

3) Fonctions physiologiques de l'autophagie et implications dans la maladie de Parkinson

La dégradation des protéines cytoplasmiques met en jeu leur ubiquitination préalable et leur prise en charge, par le système UPS ou par l'autophagie, dépend de leur taille et de leur solubilité. Les protéines solubles dont la taille permet d'être prise en charge par le système par le protéasome seront ainsi dégradées dans le cas d'un mauvais repliement. Les protéines insolubles qui ont tendance à s'agréger sont dégradées par la voie de l'autophagie après avoir été accumulées activement sous forme d'agrésomes (Figure 13). Pour cela, les protéines insolubles ubiquitinées sont séquestrées à la membrane plasmique par la protéine HDAC6, pour, histone déacetylase 6, qui interagit, d'une part, avec les chaînes d'ubiquitines en K63 portées par les protéines à dégrader et, d'autre part, avec la dynéine, un moteur moléculaire qui interagit avec les microtubules du cytosquelette (Kawaguchi, et al. 2003). La dynéine est ensuite responsable du transport de ces petits agrégats protéiques vers des centres d'agrégation où l'agrésome formé sera pris en charge par un autophagosome grâce à l'interaction avec des protéines adaptatrices telles que Ref(2)-P/p62, NBR1 ou ALFY (Kocaturk et Gozuacik 2018).

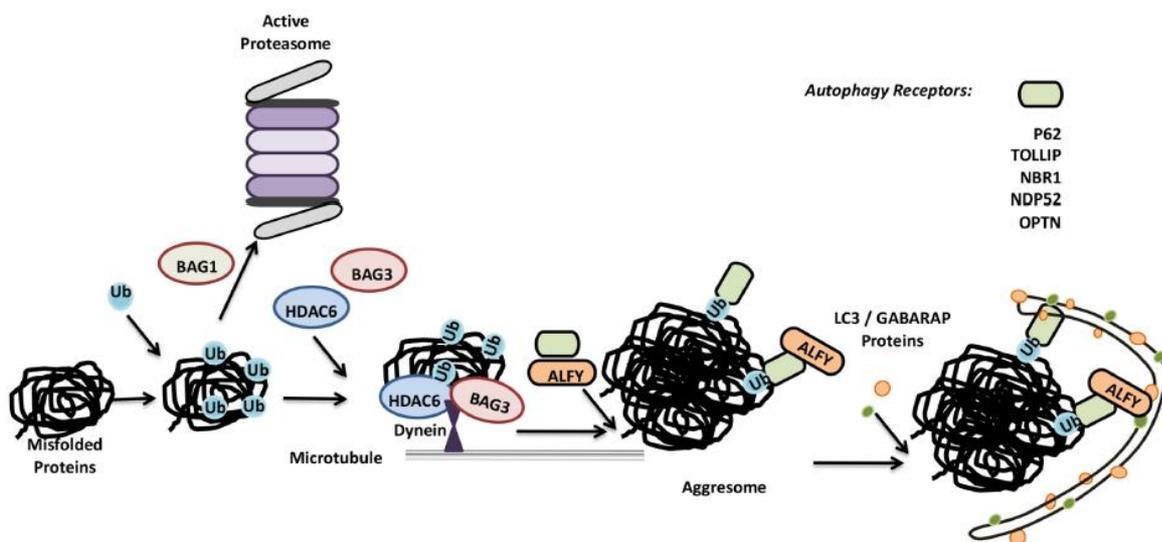


Figure 13 : Dégradation des protéines mal conformées par les systèmes du protéasome et de l'autophagie.

Les protéines cytoplasmiques mal conformées sont ubiquitinylées et dirigées vers les systèmes de dégradation en fonction des protéines mal conformées, du motif des chaînes d'ubiquitine et des protéines adaptatrices liées. Elles peuvent également être accumulées activement sous forme d'agrésomes qui seront dégradés sélectivement par l'autophagie.

Schéma de (Kocaturk et Gozuacik 2018).

De manière plus large, l'autophagie est un mécanisme de dégradation des composants et des organites cellulaires qui sont dysfonctionnels afin de les recycler (Klionsky et Emr 2000). L'autophagie est activée en conditions de stress externes telles qu'un manque de nutriments, une hypoxie ou bien en de stress internes avec une accumulation d'organites endommagés ou de protéines agrégées par exemple. L'autophagie est un processus physiologique qui intervient lors du développement embryonnaire pour le remodelage cellulaire et la biogenèse des organites cytoplasmiques. Il existe plusieurs types d'autophagie qui ont été définis par le type de substrat retrouvé dans l'autophagolysosome (Klionsky, et al. 2007). On peut distinguer trois types d'autophagie avec 1) la macro-autophagie, également appelée autophagie, où les composants cytoplasmiques à dégrader sont englobés dans des autophagosomes, des vésicules à double-membrane (Baba, et al. 1994). Les gènes qui codent pour des protéines intervenant dans la régulation de ce processus sont appelés gènes ATG pour « autophagy-related genes ». La formation d'un autophagosome repose sur l'élongation de la membrane du pré-autophagosome concomitante avec l'interaction des protéines à dégrader avec la membrane interne via une protéine adaptatrice telle que Ref(2)-P/p62 (Figure 14). Cette étape nécessite une interaction entre les protéines codées par les gènes ATG12 et ATG5 et la protéine LC3 codée par le gène ATG8, sous forme active LC3-II porteuse d'un groupement phosphatidyl-éthanolamine (PE). Une fois l'autophagosome formé, il peut fusionner avec des lysosomes, formant ainsi l'autophagolysosome où les protéines et/ou organites cytoplasmiques interagissant avec la protéine adaptatrice Ref(2)-P/p62 seront dégradées sous l'action du pH acide et des enzymes lysosomales (Figure 14). L'activation de l'autophagie peut être suivie en observant des vacuoles d'autophagie dont la membrane est associée à la protéine sous forme active LC3-II. Le flux de l'autophagie peut être suivi avec la protéine adaptatrice Ref(2)-P/p62 qui est située dans la lumière de l'autophagolysosome et qui sera dégradée avec les autres protéines et organites avec lesquels elle interagit. Le deuxième type d'autophagie est 2) la microautophagie où les composants cytoplasmiques à dégrader sont retrouvés dans le lysosome via une invagination de sa membrane. De manière similaire à l'autophagie, les composants seront dégradés sous l'action du pH acide et des enzymes lysosomales. Le troisième type d'autophagie est 3) l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) où les protéines cytoplasmiques à dégrader sont porteuses d'une séquence consensus KFERQ.

Ces protéines sont transloquées dans le lysosome grâce au transporteur LAMP2A pour « lysosome-associated membrane protein 2A ».

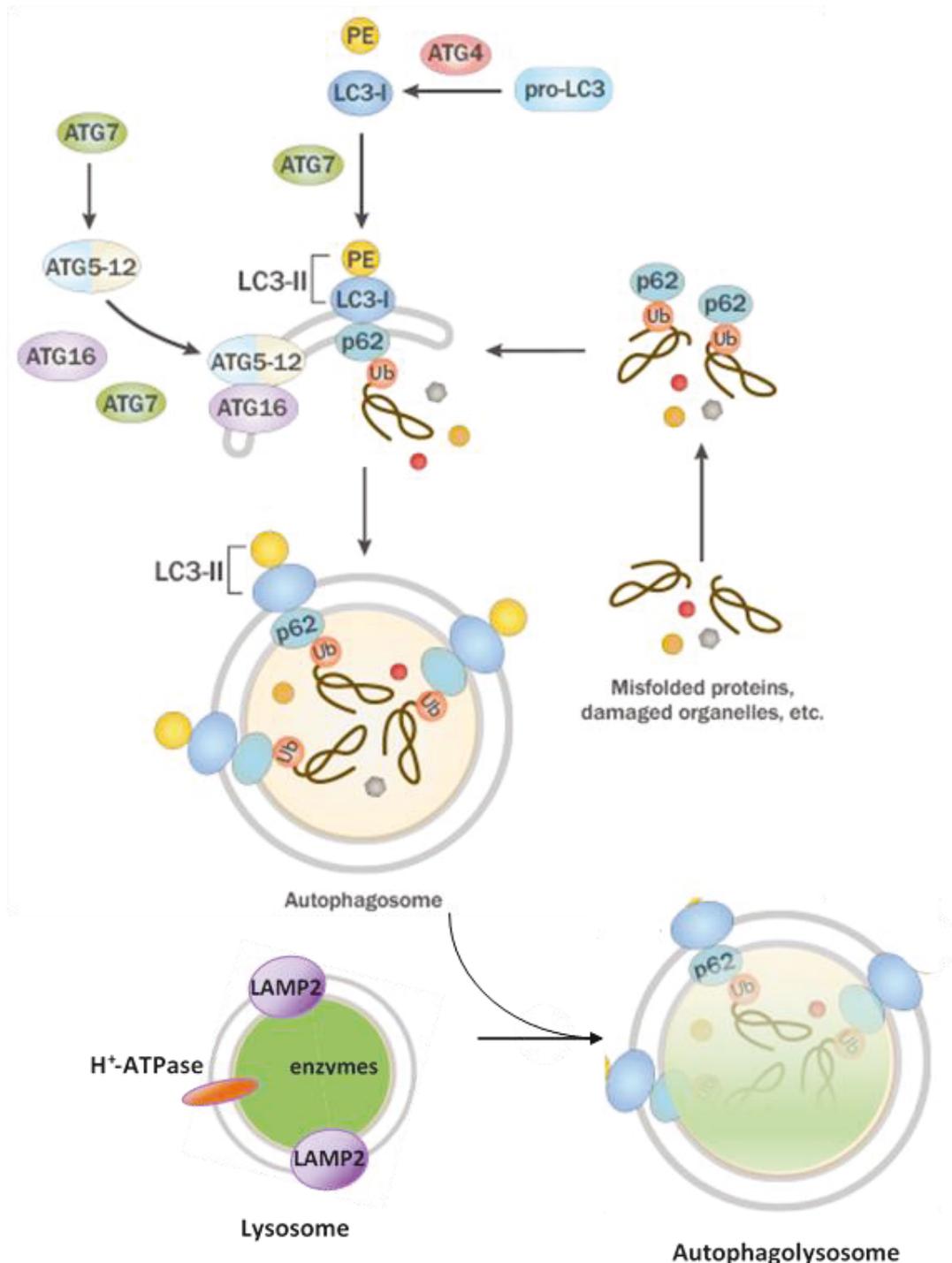


Figure 14 : Schéma de la voie de l'autophagie

L'élongation de la membrane pour former des autophagosomes précoces est modulée par LC3/Atg8 et Atg7. La protéine Ref(2)-P/p62 assure la reconnaissance spécifique des chaînes de polyubiquitines liées aux protéines ou organites à dégrader. L'autophagosome fusionne ensuite avec des lysosomes, formant ainsi l'autophagolysosome dans lequel s'opère la dégradation par les enzymes lysosomales. Schéma modifié à partir du site novusbion.com

Des dysfonctionnements de l'autophagie ont été mis en évidence dans les processus neurodégénératifs (Martinez-Vicente et Cuervo 2007) (Ravikumar et Rubinsztein 2004) où une augmentation de la formation de vacuoles d'autophagie a été observée lors d'un examen post-mortem dans la substance noire de patients parkinsoniens (Anglade, et al. 1997). Chez les patients, une activation de l'autophagie dans les hématies du sang périphérique a également été mise en évidence (Prigione, et al. 2010). Cette étude suggère que l'activation de l'autophagie pourrait être généralisée à toutes les cellules qui expriment α -syn dans le cadre de la MP. L'implication de l'autophagie dans le développement de la MP reste débattue car certaines études suggèrent que l'accumulation de vacuoles d'autophagie est responsable de la mort neuronale alors que d'autres études suggèrent que l'autophagie est protectrice (Bandyopadhyay et Cuervo 2007) (Pan, et al. 2008) . En effet, l'activation persistante de l'autophagie en conséquence d'un blocage de la dégradation des protéines mal repliées par le système UPS pourrait induire de manière directe ou indirecte la mort neuronale (Trojanowski et Lee 2000) (Massey, et al. 2006) (Bialik, Dasari et Kimchi 2018).

Une étude a permis de mettre en évidence l'importance de l'étape d'activation de l'autophagie, en amont de la formation de l'autophagosome, et son implication dans la MP. Une étude récente a permis de mettre en évidence que le gène USP24, pour « ubiquitin specific peptidase 24 », localisé dans le locus PARK10 associé à un facteur de risque de la MP est régulateur négatif de l'autophagie (Tableau 1) (Thayer, et al. 2019). En effet, les résultats de cette étude suggèrent que la protéine USP24 régule l'autophagie en modifiant l'ubiquitination et la stabilité de la protéine ULK1/ATG1 dans des cellules souches pluripotentes induites humaines différenciées (iPSC) en neurones dopaminergiques. L'inactivation de la protéine USP24 a entraîné une augmentation de la protéine ULK1/ATG1 et du flux de l'autophagie ainsi qu'un maintien des neurites de neurones dopaminergiques dérivés d'iPSC âgées. Ces résultats obtenus sur une lignée cellulaire sont soutenus par une mesure réalisée de manière post-mortem chez des patients diagnostiqués pour des cas sporadiques de la MP. En effet, des niveaux élevés d'USP24 ont été mesurés dans la substance noire d'une sous-population des patients étudiés, ce qui suggère que l'USP24 pourrait réguler négativement l'autophagie dans la MP.

L'autophagie médiée par des protéines chaperonnes, ou CMA, a également été étudiée pour son implication dans la MP car l' α -syn porte la séquence consensus KFERQ qui permet sa dégradation par la voie de la CMA (Bhattacharjee, et al. 2019). Chez les Mammifères, l' α -syn est prise en charge par la CMA et il a été montré que les formes mutées [A53T] et [A30P] de l' α -syn sont responsables du blocage du transporteur LAMP2A, ce qui empêche leur dégradation dans les lysosomes par la CMA mais également celle des autres protéines cytoplasmiques à dégrader par cette voie (Cuervo, et al. 2004). Des études récentes ont été réalisées chez la Drosophile qui exprimait l' α -syn et la protéine LAMP2A humaines, dont la Drosophile ne possède pas d'homologue. En effet, l'absence de redondance et d'homologue de ces deux protéines chez la Drosophile permet une étude précise des mécanismes cellulaires en jeu dans la MP. Chez la Drosophile, l'expression de la protéine LAMP2A réduit l'accumulation de l' α -syn et les troubles locomoteurs associés à l'expression seule de l' α -syn en facilitant la dégradation de l' α -syn par le processus de microautophagie endosomale mais également en induisant le processus d'autophagie avec la surexpression de ATG5 (Issa, et al. 2018). En effet, chez la Drosophile, l'absence d'homologue de LAMP2A signifie que la voie de la CMA n'existe pas mais les protéines à dégrader qui portent le motif KFERQ sont prises en charge par la microphagie endosomale. Cette voie de dégradation fait intervenir des protéines chaperonnes qui prennent en charge les protéines à dégrader qui portent le motif KFERQ ainsi que les protéines ESCRT, pour « endosomal sorting complex required for transport », qui permettent l'invagination des protéines dans les endosomes (Metcalf et Isaacs 2010). Ces endosomes tardifs, fusionnent ensuite avec le lysosome grâce aux protéines Rab et SNARE, pour « Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor », où elles seront dégradées (Metcalf et Isaacs 2010).

Des études réalisées chez le rat et chez la Drosophile ont mis en évidence l'aspect protecteur d'une activation de l'autophagie en condition de stress induit par des agents chimiques divers. En effet, il a été montré dans la lignée cellulaire SH-SY5Y que des vacuoles d'autophagie s'accumulaient sous l'effet d'une exposition au paraquat (PQ) avec une dégradation accrue des protéines (R. Gonzalez-Polo, M. Niso-Santano, et al. 2007a) (R. Gonzalez-Polo, M. Niso-Santano, et al. 2007b). Les auteurs de ces études suggèrent que l'autophagie serait neuroprotectrice dans un contexte de stress oxydatif induit par le PQ, notamment grâce à la dégradation des mitochondries dont la fonction de respiration

a été altérée par le PQ. Une autre étude réalisée chez la Drosophile a mis en évidence que l'autophagie qui est induite lors de l'activation de la voie UPR est neuroprotectrice chez la Drosophile exposée à la tunicamycine. En effet, la tunicamycine empêche la N-glycosylation des protéines dans le RE où elles s'accumulent alors et activent la voie UPR (Fouillet, et al. 2012). De plus, un prétraitement à une dose faible de tunicamycine permet un sauvetage de 20% de neurones dopaminergiques supplémentaires dans des cerveaux de souris injectés avec de la 6-OHDA, un inducteur chimique de la MP, par rapport aux souris sans prétraitement (Fouillet, et al. 2012). De manière similaire chez le rat injecté intracérébralement à la 6-OHDA ou à la tunicamycine, le flux de l'autophagie est retrouvé augmenté avec une diminution de la détection de la protéine Ref(2)-P/p62 (Ning, et al. 2019). Ces deux études réalisées chez la Drosophile, la souris et le rat soutiennent qu'une activation de la voie UPR sous l'effet d'inducteurs chimiques est supportée par une activation de l'autophagie qui est associée à une neuroprotection.

Plusieurs études ont mis en évidence que la neurotoxicité d'une molécule inductrice de la MP comme le paraquat (PQ) était inhibée par l'autophagie dans la lignée cellulaire SH-SY5Y et chez la souris (Garcia-Garcia, et al. 2013) (Wills, et al. 2012) (Anandhan, et al. 2017). Ainsi, dans la lignée cellulaire SH-SY5Y exprimant une forme dominante négative de la protéine ATG5, la mort cellulaire induite par le PQ a augmenté mais pas dans des conditions d'exposition à la 6-OHDA ou au MPP+, deux autres inducteurs chimiques de la MP. Ce résultat suggère que l'activation de l'autophagie de manière ATG5-dépendante est neuroprotectrice lors d'une exposition au PQ (Garcia-Garcia, et al. 2013). Des résultats similaires ont été obtenus chez la souris injectée au PQ et dont la mort neuronale a été diminuée par l'autophagie dépendante de la protéine ATG5 (Anandhan, et al. 2017). Il est à noter que l'autophagie, présentée comme neuroprotectrice dans le cas d'une exposition au PQ, peut également être bloquée sous l'effet du PQ. Cela a été suggéré dans une étude réalisée chez la souris WT où une injection intra-péritonéale de PQ a provoqué l'accumulation de l' α -syn ainsi qu'un blocage du flux de l'autophagie dans le cerveau (Wills, et al. 2012). Plusieurs études ont conclu que l'autophagie était protectrice en diminuant l'accumulation de l' α -syn (Bengoa-Vergniory, et al. 2017), bien qu'une exposition au PQ semble bloquer le flux de l'autophagie et la rende inefficace pour éviter une mort neuronale sous l'effet de l'agrégation de l' α -syn.

L'étude de la MP grâce à des modèles cellulaires et animaux a permis de mettre en évidence les liens complexes qui existent entre les différents compartiments cellulaires avec lesquels l' α -syn interagit et qui peuvent également être modifiés sous l'effet de facteurs environnementaux (Figure 15). Les marqueurs centraux de la MP sont l'agrégation de l' α -syn, la mort des neurones dopaminergiques et les altérations de la fonction locomotrice mises en évidence dans les modèles animaux de la MP. Récemment, des modèles de la MP prenant en compte l'implication de facteurs génétiques, avec des formes mutées d' α -syn ou de protéines impliquées dans la MP, mais également de facteurs environnementaux, avec une exposition à un agent inducteur de la MP, sont de plus en plus étudiés. En effet, la MP reste une maladie multi-factorielle où l'action d'un stress environnemental sur un/des facteurs de risque(s) génétique(s) reste encore à élucider afin de modéliser les cas sporadiques de la MP qui représentent près de 90% des patients.

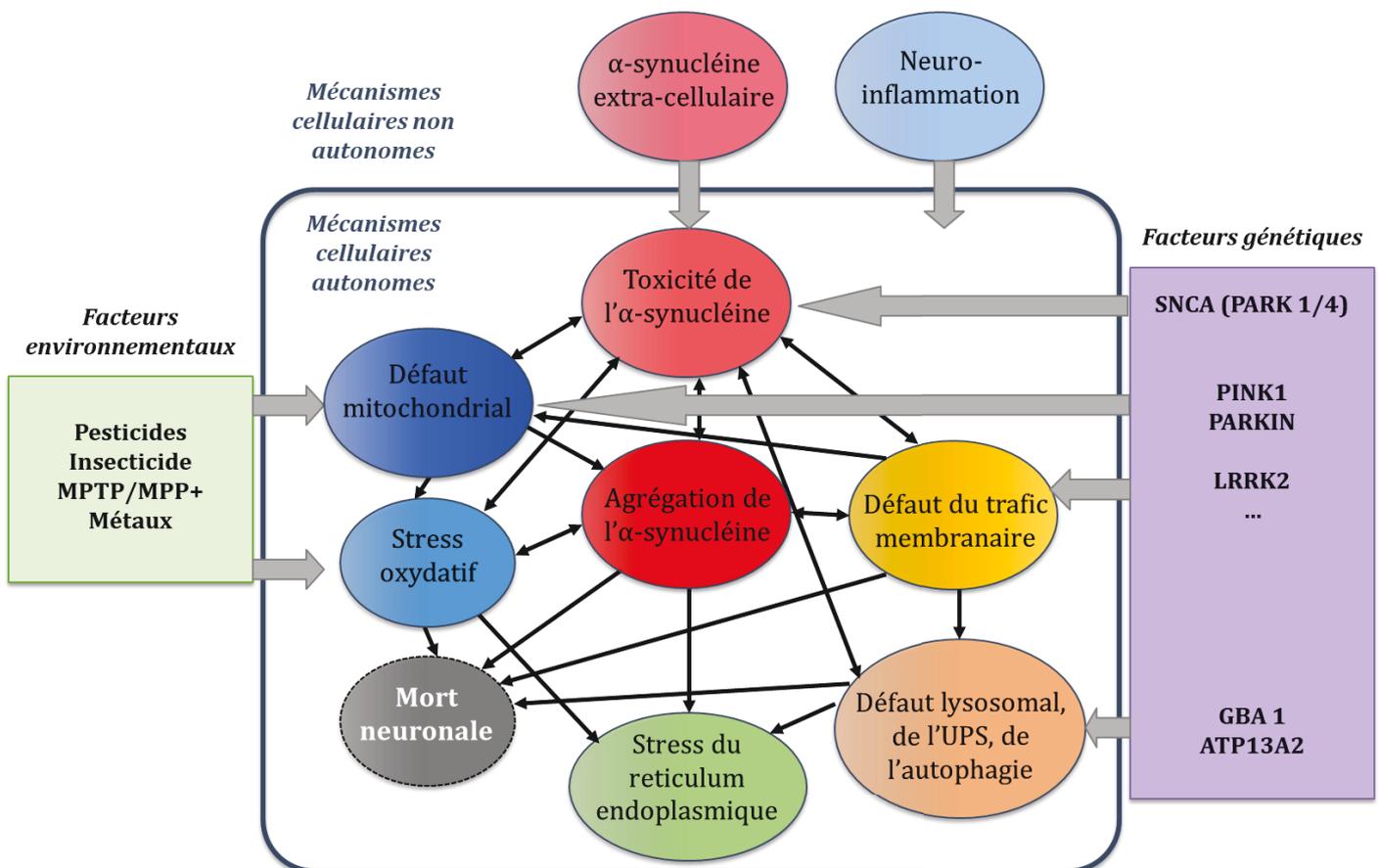


Figure 15 : Schéma des interactions entre les défauts cellulaires associés à des facteurs environnementaux et/ou génétiques pouvant conduire à la formation d'agrégats d' α -synucléine.

Réalisé à partir de (Hasegawa, et al. 2017)

III. Utilisation de la Drosophile pour modéliser la maladie de Parkinson

Le développement de modèle de Drosophiles pour étudier la MP a permis de progresser sur la compréhension des mécanismes pathologiques à l'origine de cette maladie neurodégénérative. Le premier modèle d'induction de la MP chez la Drosophile a été décrit il y a 20 ans (Feany et Bender 2000) et de nombreux modèles d'induction, génétique ou chimique, de la MP chez la Drosophile reposent sur les avantages de cet animal de laboratoire (Pandey et Nichols 2011).

1) La Drosophile, modèle de maladies humaines

La Drosophile est un animal modèle en laboratoire qui présente de nombreux avantages avec notamment un cycle et une durée de vie relativement courts, respectivement de 10 jours et 2-3 mois, qui facilitent l'utilisation de ce modèle pour étudier des maladies liées au vieillissement par rapport aux modèles Mammifères. De plus, le génome de la Drosophile est plus petit et moins redondant que celui des Mammifères et présente environ 70% de gènes homologues parmi ceux qui ont été identifiés pour être impliqués dans des maladies humaines (Adams, et al. 2000). De nombreux outils génétiques viennent appuyer l'utilisation de la Drosophile avec des outils de mutagenèse, de silencing ou de surexpression de gènes, ou de transgènes, dans le type cellulaire d'intérêt et au temps voulu (Venken, Simpson et Bellen 2011). Ces nombreux avantages font de la Drosophile un modèle qui permet de réaliser des criblages génétiques ou encore chimiques pour découvrir de nouvelles cibles ou molécules thérapeutiques à moyenne échelle (Pandey et Nichols 2011) (Fernández-Hernández, et al. 2016). L'expression de transgènes par la Drosophile grâce au système UAS/Gal4 permet de contrôler les tissus ainsi que le stade de développement auxquels les transgènes choisis seront exprimés (Figure 16). De plus, les Drosophiles modifiées génétiquement sont disponibles dans des bibliothèques où près de 150 000 lignées de Drosophiles sont recensées à ce jour (<https://flybase.org/>)

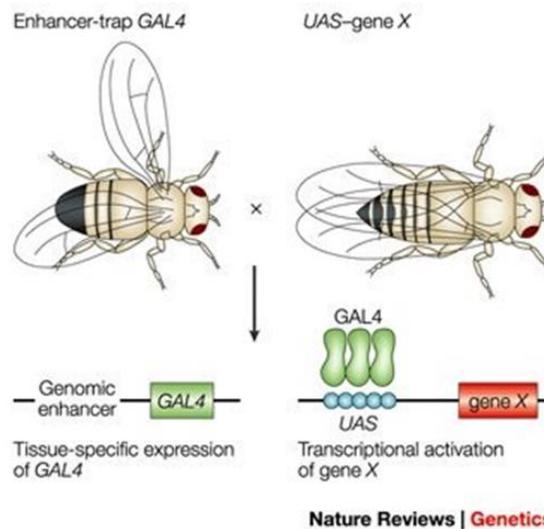


Figure 16 : Le système d'expression UAS-Gal4 chez la drosophile

Le système d'expression comprend deux parties : le gène Gal4 code pour la protéine activatrice de la transcription de la levure, Gal4. La séquence UAS est une séquence promotrice auquel Gal4 se lie spécifiquement pour activer la transcription du gène se trouvant en aval (gène X, rouge).

Schéma de (Muqit et Feany 2002)

2) Le système nerveux de la Drosophile pour modéliser la MP

Le système nerveux de la Drosophile est plus simple que celui des Mammifères mais ils partagent des caractéristiques comparables en terme d'organisation, de structure et de fonctions. L'implication des neurones dopaminergiques est centrale dans la MP et la perte de ces neurones, notamment dans la *substantia nigra pars compacta*, est corrélée à l'apparition des symptômes moteurs chez l'Homme. Chez la Drosophile, un comportement moteur reposant sur la fonction des neurones dopaminergiques a également été mis en évidence ainsi que l'implication précise de chaque cluster de neurones dopaminergiques (Mao et Davis 2009) (Yamamoto et Seto 2014). Le lien mis en évidence entre la fonction des neurones dopaminergiques et la locomotion des Drosophiles a permis de développer des tests pour évaluer la géotaxie négative des Drosophiles (Feany et Bender 2000) (Coulom et Birman 2004) (Nichols, Becnel et Pandey

2012). Le test de géotaxie négative repose sur la tendance naturelle des Drosophiles à grimper le long d'une paroi verticale et qui peut être induite sous l'effet d'un choc physique sur un support. La géotaxie négative induite par un choc est altérée dans les modèles de la MP chez la Drosophile (Riemensperger, et al. 2013) (Sun, et al. 2018).

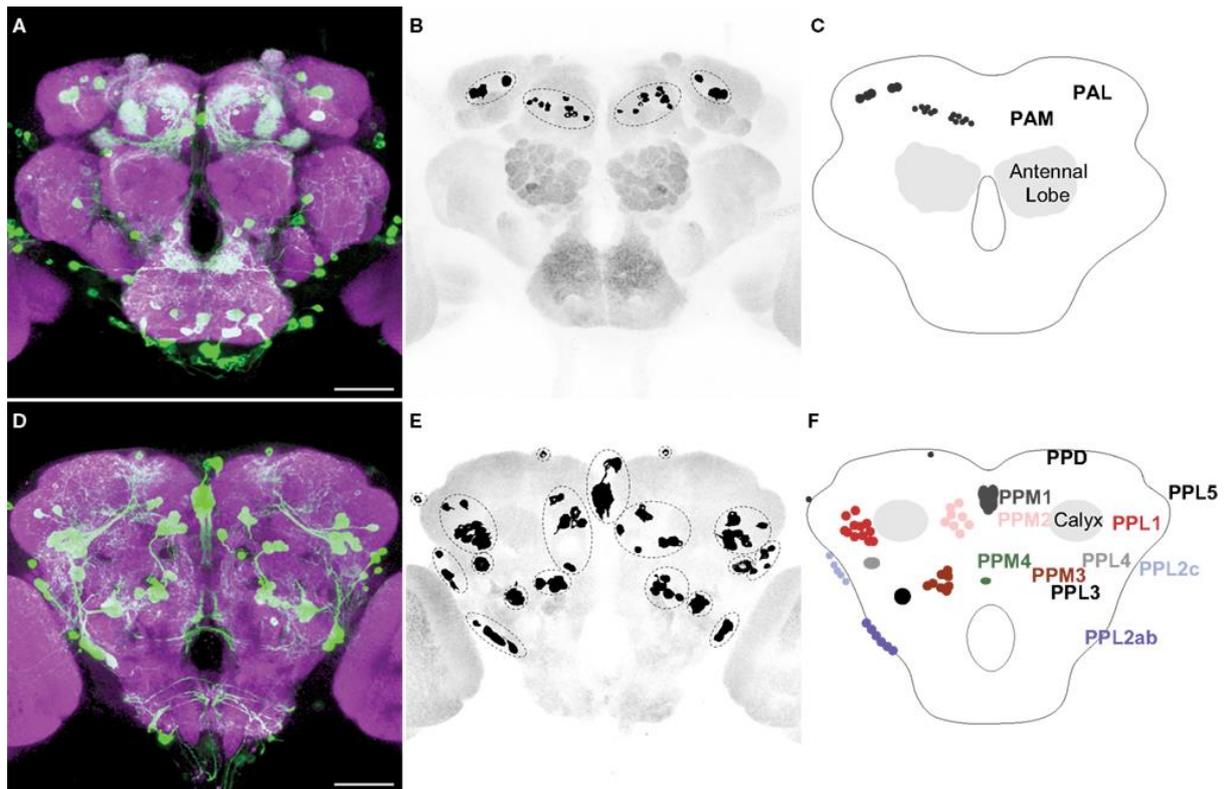


Figure 17 : Identification des neurones dopaminergiques dans le système nerveux central de Drosophile adulte

Les neurones dopaminergiques exprimant le gène codant pour la tyrosine hydroxylase (*th*) sont visualisées par immunofluorescence dans le cerveau de Drosophile *TH-GAL4>UAS-mCD8::GFP*.

Les panels (A-C) sont des vues antérieures et les panels (D-F) sont des vues postérieures de cerveau. Le marquage anti-GFP (vert) est spécifique des neurones dopaminergiques et le cerveau a été contre-marqué avec l'anticorps nc-82 (violet) (panels A et D). La barre d'échelle = 50 μ m. Les corps cellulaires des neurones sont mis en évidence grâce à une modification de contraste des images (B et E) et les lignes pointillées entourent différents clusters de neurones dopaminergiques. Les noms, localisations et nombres classiques de neurones par clusters sont représentés par des couleurs différentes (C et F).

Figure provenant de (Mao et Davis 2009)

La Drosophile n'exprime pas d'homologue au gène SNCA humain codant pour l' α -synucléine cependant l'expression transgénique du gène humain reste un moyen très utile pour modéliser la MP. En effet, des mécanismes de type gain de fonction seraient responsables de la pathogénicité de l' α -syn dans le développement de la MP. De plus, l' α -syn humaine exprimée dans les Drosophiles est prise en charge par la cellule et est retrouvée modifiée, par exemple phosphorylée en sérine 129, et dans des inclusions cytoplasmiques, comme chez l'Homme (Feany et Bender 2000) (Auluck, et al. 2002) (Takahashi, et al. 2003). Ces marqueurs de la MP observés chez la Drosophile valident l'intérêt de l'étude des mécanismes d'agrégation de l' α -syn et des mécanismes pathologiques associés à cette agrégation (Whitworth 2011) (Xiong et Yu 2018) (Szabo et Tofaris 2019). Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes toxiques à l'origine du développement de la MP, la Drosophile est un animal modèle de choix.

3) Les modèles d'induction de la maladie de Parkinson chez la Drosophile

Depuis que le premier modèle d'induction de la MP chez la Drosophile a été décrit il y a 20 ans (Feany et Bender 2000), de nombreux modèles d'induction, génétique ou chimique, de la MP ont permis d'élucider de nombreux mécanismes à l'origine de l'agrégation de l' α -syn et qui ont été validés dans des modèles de rongeurs.

A. Les modèles d'induction génétique de la MP chez la Drosophile

Les modèles d'induction génétique de la MP chez la Drosophile exprimant l' α -syn humaine, sous forme WT ou mutée, récapitulent les marqueurs principaux de la MP avec une perte des neurones dopaminergiques, des inclusions intra-neurales contenant de l' α -syn et une altération de la locomotion (Feany et Bender 2000) (Auluck, et al. 2002). Ces modèles ont également permis de mettre en évidence d'autres symptômes non-locomoteurs associés à la MP comme des défauts de l'olfaction, de l'acuité visuelle, de l'apprentissage, de la mémoire, du cycle circadien ou encore du sommeil (Gajula Baliya, et

al. 2011) (Chen, Wilburn, et al. 2014) (A. Chen, S. Xia, et al. 2014) (Afsari, et al. 2014) (Julienne, et al. 2017). Parmi les systèmes binaires d'expression transgénique disponibles chez la Drosophile, le système UAS/Gal4 permet d'induire l'expression d'un transgène en amont de la séquence UAS sous le contrôle d'une séquence promotrice en aval de la séquence Gal4. Un autre système d'expression binaire a été utilisé pour induire une expression transgénique encore plus forte avec le « système Q » (Riabinina, et al. 2015). En effet, ce modèle de MP chez la Drosophile a montré une forte neurodégénérescence, des déficits locomoteurs et une agrégation de l' α -syn de manière précoce entre 4 et 10 jours (Ordonez, Lee et Feany 2018) alors que l'expression de l' α -syn WT avec le système UAS/Gal4 permet d'observer ces mêmes marqueurs à l'âge de 3 semaines (Robin, et al. 2019).

Les modèles de Drosophiles peuvent permettre l'étude des interactions entre l' α -syn et des gènes codant pour des protéines intervenant dans les processus de dégradation de l' α -syn. Une étude a ainsi été réalisée sur des Drosophiles pour comprendre comment l'agrégation de l' α -syn, sous formes WT ou mutée [A53T], était modulée par la protéine Usp8/UBPY (Alexopoulou, et al. 2016). Chez l'Homme, l'accumulation de la protéine Usp8/UBPY est associée à une diminution de la forme ubiquitinée de l' α -syn avec une chaîne d'ubiquitine en K63, dans les corps de Lewy. Cette observation suggère que l' α -syn fait partie des protéines cibles de cette DUB qui diminuerait alors l'adressage de l' α -syn vers le protéasome. Chez les Drosophiles exprimant l' α -syn WT et déficientes pour la protéine Usp8/UBPY, une augmentation de l'ARNm de l' α -syn a été mesurée par qPCR ainsi qu'une diminution de la quantité d' α -syn monomérique, dans la fraction protéique soluble et d'autant plus dans la fraction insoluble, par Western blot. Ce résultat suggère que la protéine Usp8/UBPY est responsable de l'accumulation d' α -syn et notamment sous forme d'oligomères insolubles mis en évidence par Western blot. Chez les Drosophiles exprimant l' α -syn, sous forme WT ou [A53T], une diminution de l'expression d'USP8/UBPY a également été associée à une réduction de la mort des neurones dopaminergiques et une meilleure capacité locomotrice par rapport aux Drosophiles exprimant USP8/UBPY. Ce résultat suggère que la protéine Usp8/UBPY est responsable de l'accumulation d' α -syn dans les neurones dopaminergiques qui aurait pour conséquence la mort de ces neurones et une perte de locomotion. Une autre étude s'est intéressée au rôle de la glucocérébrosidase dans

l'agrégation de l' α -syn dans un modèle de Drosophile (Suzuki, et al. 2015). La glucocérébrosidase est codée par le gène GBA qui a été retrouvé muté dans des familles d'une communauté juive ashkénaze où la fréquence des cas de MP était plus proche de cas familiaux que de cas sporadiques et qui est aujourd'hui considéré comme un locus à risque (Aharon-Peretz, Rosenbaum et Gershoni-Baruch 2004). Chez les Drosophiles exprimant l' α -syn humaine, l'inactivation de GBA endogène exacerbe le dysfonctionnement locomoteur, la perte de neurones dopaminergiques et la dégénérescence de la rétine par rapport aux Drosophiles exprimant l' α -syn et le gène homologue de la GBA. Dans cette condition d'expression de l' α -syn et d'inactivation de GBA endogène, une accumulation accrue d' α -syn n'a pas été mis en évidence contrairement à un changement de conformation de l' α -syn. En effet, l' α -syn accumulée chez ces Drosophiles était plus résistante à une digestion par la protéinase K (pK) que dans les Drosophiles exprimant l' α -syn et le gène homologue de la GBA. Ces résultats suggèrent que la glucocérébrosidase a un effet neuroprotecteur concernant l'agrégation de l' α -syn (Suzuki, et al. 2015). Des expériences *in vitro* ont permis de mettre en évidence que le glucosylcéramide, un substrat de la glucocérébrosidase, accélérât le mauvais repliement de l' α -syn qui devenait alors plus résistante à une digestion par la pK. Ces expériences suggèrent que la perte de fonction de la glucocérébrosidase est associée à une accumulation du glucosylcéramide qui favorise un changement de conformation toxique de l' α -syn, à l'origine de la mort des neurones dopaminergiques chez la Drosophile (Suzuki, et al. 2015). Un modèle de double induction génétique de la MP chez la souris supporte l'importance de la glucocérébrosidase dont l'activité est diminuée lors d'une co-expression avec l' α -syn mutée [A53T] humaine et qui est associé à une perte accrue des neurones dopaminergiques de la substance noire (Ikuno, et al. 2019). En conclusion, les études d'induction génétique de la MP chez la Drosophile ont permis de mettre à jour des mécanismes pathologiques conservés qui sous-tendent le développement de la maladie chez l'Homme.

B. Les modèles d'induction chimique de la MP chez la Drosophile

Les modèles d'induction chimique de la MP chez la Drosophile par une exposition au paraquat (PQ) ont été mis au point afin de comprendre le mode d'action du PQ car il induit des marqueurs similaires comme la mort spécifique des neurones dopaminergiques ou une altération de la locomotion (Chaudhuri, et al. 2007) (Lawal, et al. 2010) (Shukla, et al. 2014) (Cassar, et al. 2015). Une exposition des Drosophiles à une dose aiguë de 20 mM de PQ induit des défauts locomoteurs après 12h et la mort de neurones dopaminergiques est observée après 6h et celle des Drosophiles au bout de 4 jours (Chaudhuri, et al. 2007). Aux doses de 10 ou 20 mM de PQ, des changements morphologiques des neurones dopaminergiques sont observés dans les différents clusters dès 24h, ce qui est indicatif d'une altération de leur fonction (Shukla, et al. 2014) (Cassar, et al. 2015). Les neurones du cluster PPL1 semblent d'autant plus sensibles au PQ que leur perte est observée à cette même durée (Lawal, et al. 2010). Une autre étude a conclu que l'effet toxique du PQ, qui est spécifique des neurones dopaminergiques de la Drosophile, repose sur l'expression d'un récepteur membranaire à la dopamine, le récepteur « D1-like dopamine receptor » ou DAMB (Cassar, et al. 2015). Ces doses de PQ induisent une mort des Drosophiles en quelques jours et ne permettent pas d'observer de mécanismes cellulaires en lien avec le vieillissement alors qu'il s'agit du premier facteur de risque de développer la MP chez l'Homme. L'absence d'expression de gène homologue au gène SNCA humain chez la Drosophile ne permet pas d'observer l'effet du PQ sur le développement de marqueurs en lien avec l'agrégation de l' α -syn.

C. Les modèles d'induction mixte de la MP chez la Drosophile

Les modèles d'induction mixte de la MP mis en place chez la Drosophile ont pour but de modéliser les interactions entre un stress environnemental et l'agrégation de l' α -syn. Une étude a été réalisée sur la larve de Drosophile exprimant l' α -syn mutée [A53T] dans leurs neurones dopaminergiques afin de mettre en évidence l'effet d'une exposition chronique à 10 μ M de roténone sur la locomotion (Varga, et al. 2014). Cette étude a montré que les larves exprimant l' α -syn mutée [A53T] ou celles exposées chroniquement à la roténone présentaient des déficits de locomotion et une perte de neurones DA de manière

dépendante de l'âge. La combinaison d'une exposition chronique à la roténone dans le milieu nutritif des larves exprimant l' α -syn mutée [A53T] a provoqué une altération de la locomotion et une perte neuronale accrues par rapport à chaque condition individuelle (Varga, et al. 2014). Cette étude a donc mis en évidence une interaction entre un facteur génétique et un facteur environnemental qui, chacun pris séparément, sont associés au développement de symptômes de la MP. Généraliser ce genre de modèle d'induction mixte pourrait permettre l'étude plus détaillée des mécanismes sous-jacents à l'interaction entre gènes et différents facteurs environnementaux qui sont à l'origine de la MP.

Problématique de la thèse

Comme décrit précédemment, la MP est caractérisée par l'agrégation de l' α -syn et la dégénérescence sélective des neurones dopaminergiques associée à des défauts locomoteurs. L'étiologie de la MP est inconnue mais ses origines multifactorielles impliquent à la fois des facteurs génétiques et environnementaux. Parmi les agents phytosanitaires associés au développement de la MP, le paraquat (PQ) est décrit pour induire un stress environnemental. En effet, une étude a conclu que les personnes utilisant le PQ ou la roténone étaient 2,5 fois plus susceptibles de développer une MP que ceux qui n'étaient pas en contact avec ces pesticides (Tanner, et al. 2011). Une relation existe donc chez l'Homme entre la toxicité du PQ et l'agrégation de l' α -syn qui est centrale dans la MP. La caractérisation de modèles d'induction mixte de la MP permettrait d'élucider les effets toxiques d'une exposition chronique à un agent chimique sur les mécanismes favorisant l'agrégation de l' α -syn. Dans cette étude, nous proposons de caractériser les effets d'une exposition chronique au PQ contenu dans le milieu nutritif de Drosophiles exprimant une des formes, WT ou mutée [A53T], de l' α -syn dans l'ensemble des neurones. Nous nous intéresserons à l'expression et à l'accumulation de l' α -syn ainsi qu'aux processus en lien avec son agrégation et à l'effet de cette induction mixte sur la survie et la locomotion des Drosophiles modélisant l'aspect multifactoriel de la MP.

RESULTATS

L'ensemble des résultats présentés a été produit en collaboration avec Jean-Noël Arzac de l'équipe de Thierry Baron de l'Anses Lyon.

Introduction

La maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative touchant 3 % de la population de plus de 65 ans (Fahn et Sulzer 2004). Cette maladie chronique qui fait partie d'un groupe de pathologies appelées « α -synucléinopathies » est caractérisée notamment par la dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la substance noire du cerveau et par l'identification d'inclusions intra-cytoplasmiques, les corps de Lewy. Certains travaux suggèrent que le stress oxydatif, le stress du réticulum endoplasmique et le dysfonctionnement mitochondrial sont impliqués dans cette mort cellulaire neuronale (Trist, Hare et Double 2019) (Martinez, et al. 2019). Ces inclusions sont constituées de différents composants, comme l'ubiquitine par exemple, mais le composant principal est une protéine, l' α -synucléine, qui porte des transformations post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'ubiquitination, la troncation et la nitration. Parmi ces modifications, la phosphorylation du résidu sérine 129 (Pser129) est le changement le plus abondant (Schmid, Chiappe, et al. 2009) (Okochi, et al. 2000). Les causes exactes de la MP restent inconnues à ce jour mais les facteurs génétiques et environnementaux semblent être impliqués (Warner et Schapira 2003) (Ball, et al. 2019). Concernant les facteurs génétiques, de nombreuses études ont confirmé leur implication avec l'identification de mutations responsables des formes monogéniques rares de la maladie, des duplications/triplications ou des mutations ponctuelles du gène codant pour l' α -synucléine (A53T, A30P, E46K, G51D, H50Q) du gène codant pour l' α -synucléine en lien avec une augmentation de l'agrégation de cette protéine (Farrer, et al. 2004) (Ki, et al. 2007) (Hernandez, Reed et Singleton 2016). Au regard des facteurs environnementaux, des études épidémiologiques suggèrent une corrélation entre la MP et l'exposition aux pesticides (Ahmed, et al. 2017) (Tanner, et al. 2011). Toutefois, les symptômes de la maladie étant susceptibles de se manifester plusieurs années après une exposition chronique aux produits (herbicides, insecticides, fongicides), la plupart des études n'ont pas permis d'identifier les produits chimiques directement incriminables. Ce délai d'apparition des symptômes de la MP ne permet pas d'identifier les risques potentiels des produits chimiques concernant les maladies neurodégénératives chez l'Homme avec les tests toxicologiques des pesticides qui sont utilisés à des fins réglementaires (Moretto et Colosio 2011). Depuis plusieurs années, le développement de modèles animaux non-vertébrés (*Drosophila*, *C. elegans*) ou Vertébrés (zebrafish, souris,

rat, primate) a permis d'approfondir l'étude de la MP (Zeng, Geng et Jia 2018). De manière intéressante, certains modèles génétiques surexprimant l' α -synucléine humaine, sauvage ou mutée, présentent une neurodégénérescence, un déficit locomoteur et une agrégation de l' α -synucléine (Cannon, et al. 2009) (Feany et Bender 2000) (Auluck, et al. 2002) (Ordonez, Lee et Feany 2018). En particulier, des modèles de Drosophiles ont été utilisés pour comprendre le mode d'action de substances chimiques, comme le paraquat, en condition d'exposition aiguë mais les doses d'exposition employées ne permettaient pas d'observer l'ensemble des mécanismes moléculaires et cellulaires possiblement impliqués compte tenu de la durée de vie courte des animaux à ces doses (Lawal, et al. 2010) (Shukla, et al. 2014) (Cassar, et al. 2015). Seuls des modèles de rongeurs ou de primates ont permis d'étudier l'effet d'une exposition chronique au paraquat sur la MP (Manning-Bog, et al. 2002) (Norris, et al. 2007) (McCormack, et al. 2008) (Ren, Zhao et Sun 2009) (Naudet, et al. 2017) (Kikuchi, et al. 2017).

Afin de déterminer si les modèles de Drosophiles disponibles pouvaient être un outil pour l'étude des modes d'action des substances chimiques en condition d'exposition chronique, nous avons utilisé le modèle génétique de MP chez la Drosophile sous système UAS/Gal4 pour le contrôle de l'expression de l' α -syn humaine mutée [A53T] (Feany & Bender, 2000). En particulier, nous avons recherché les effets induits en réponse à une exposition chronique au paraquat, pendant 15 jours à 0,75 mM, sur l'accumulation et les modifications post-traductionnelles de l' α -synucléine ainsi que sur des voies métaboliques de protéasome ou de l'autophagie qui assurent la dégradation des protéines. Dans ces conditions, nous avons démontré, une augmentation de la quantité d' α -synucléine détectable chez les Drosophiles exposées chroniquement au paraquat ainsi qu'une possible accélération du processus pathologique développée spontanément par ce modèle.

Matériel et Méthodes

Elevage et maintenance des Drosophiles

Les Drosophiles sont élevées sur un milieu de culture standard composé de farine de maïs, de levure, d'un fongicide et d'eau. L'élevage se fait en conditions contrôlées : température à 25°C et humidité de 60%. Les lignées sont maintenues dans des tubes de 28,5x95mm (Dutscher) contenant du milieu de culture. Les adultes reproducteurs sont transférés tous les 15 jours sur milieu frais.

Lignées de Drosophiles

Génotype des Drosophiles	Provenance
; sGMR-Gal4/CyO ; pWIZ/TM6B	Dérivée de Bloomington, BDSC : 9146
:: ELAV-Gal4	Bloomington, BDSC : 8760
; UAS-GFP ;	Laboratoire de Claude Desplan
:: UAS-syn WT	Bloomington, BDSC : 8146
:: UAS-syn [A53T]	Bloomington, BDSC : 8148

Préparation des lots expérimentaux

Pour les expériences d'exposition, les croisements sont réalisés avec 10 femelles vierges de génotype ::ELAV-Gal4 et 6 mâles porteurs de l'UAS choisi. Les animaux sont transférés sur milieu frais tous les 2 à 3 jours pendant 1 semaine. Après éclosion des larves, des groupes de 25 Drosophiles mâles âgées de 2 à 4 jours sont placés dans un tube (28,5x95mm) sur milieu d'agarose 0,8% et de sucrose 10% additionné ou non de PQ à la concentration de 0,75 mM.

Exposition chronique au paraquat

Pour la préparation du milieu d'exposition au PQ, une solution mère de PQ à la concentration de 0,1g/ml est réalisée. Dans un second temps, cette solution est diluée avec de l'eau pour obtenir une solution à la concentration de 2,25 M.

100 µl de cette dilution sont déposés dans chaque tube préparé 24 heures plus tôt et contenant 3 mL de milieu composé d'agarose 0,8% et de sucrose 10% afin d'avoir une concentration finale de [0,75 mM] de paraquat. Pour les tubes devant accueillir les animaux contrôles, 100µL d'eau sont déposés selon les mêmes modalités.

Les tubes sont utilisés 24 heures après l'ajout de la solution de PQ.

Le suivi expérimental se fait en conditions contrôlées : température à 25°C, humidité de 60% et cycle d'éclairage lumière/obscurité de 12h/12h. Les Drosophiles mortes sont dénombrées quotidiennement et les animaux vivants sont transférés dans de nouveaux tubes tous les 3 ou 4 jours.

Test de locomotion de Drosophiles

Les Drosophiles sont transférées dans des tubes (28,5x95mm) vides sans être mises sur glace ou sous CO₂ pendant les 48h qui précèdent le test. Les tubes de Drosophiles sont tapés verticalement sur un support afin d'induire le réflexe de géotaxie négative et une photo est prise après 18 secondes. Cette opération est répétée 10 fois afin de dénombrer les Drosophiles dans chacun des tiers du tube : haut, milieu et bas, et de calculer une moyenne de l'index de locomotion à partir de la formule :

$$\left(\frac{\text{Nombre Drosophile total} + \text{Nombre Drosophile partie haute} - \text{Nombre Drosophile partie basse}}{\text{Nombre Drosophile total}} \times 0,5 \right)$$

Arrêt des protocoles expérimentaux

Lors de l'arrêt des protocoles, les animaux morts sont séparés des animaux vivants sous loupe binoculaire. Les Drosophiles vivantes sont congelées à -80°C ou endormies (glace ou CO₂) pour dissection avant analyse.

Etude des cerveaux et des rétines par immunofluorescence

Les Drosophiles sont endormies sur glace puis disséquées dans du tampon HL3 1X additionné de [120 mM] glucose, extemporanément (Stewart, et al. 1994). Après dissection, les cerveaux et rétines sont transférés dans une solution de HL3-glucose-1%

PFA pour incubation à 4°C pour la nuit. Les tissus sont rincés trois fois 1h sous agitation avec du tampon PAT3 froid (PBS 1X, 0,5% triton, 5 mg/mL BSA) puis ils sont incubés dans un tampon de blocage (PBS 1X, 0,5% triton, 5 mg/mL BSA, 3% NGS) pendant 1h à température ambiante. Après blocage, les tissus sont incubés sur la nuit à 4°C en présence des anticorps primaires dilués dans le tampon de blocage. Après rinçage, 3x20 minutes avec du milieu PAT3 froid, les tissus sont incubés (température ambiante, 2 heures) en présence des anticorps secondaires couplés à un fluorochrome et de phalloïdine-rhodamine (solution mère en méthanol à la concentration de 0,1mg/ml puis diluée au 1/800). Après rinçage, 3x20 minutes avec du milieu PAT3 froid, les tissus sont montés entre lame et lamelle séparées par du scotch double-face dans un milieu de montage contenant du DAPI (Vector labs, Vectashield H-1200).

Les échantillons sont conservés dans l'obscurité à 4°C et observés au microscope confocal avec un LSM800 (Zeiss, logiciel ZEN2) dans les 48h qui suivent le montage. Les images de microscopie confocale sont analysées avec le logiciel Fiji grâce à une macro créée par Daan Van Den Brink (Laboratoire de Bertrand Mollereau).

Etude des rétines par microscopie électronique à transmission

Le protocole utilisé et rappelé ici a été publié par (Van Den Brink, et al. 2018). Les Drosophiles endormies sous CO₂ sont disséquées et les yeux sont incubés dans un tampon de fixation composée de 0,1M cacodylate buffer, 2,5% glutaraldehyde, 2 mM CaCl₂ pendant 16 h à 4°C. Après un rinçage dans un tampon composé de 0,1M de cacodylate à température ambiante, les yeux sont incubés dans un tampon composé de 1% OsO₄, 0,1M cacodylate pendant 2h à température ambiante. Les tissus sont progressivement déshydratés dans l'acétone à température ambiante puis montés dans 100% de résine epoxy (Epon 812) dans des moules en silicone. Après une polymérisation de la résine à 60°C pendant 48h, les échantillons sont coupés en sections de 60 nm et marqués avec du citrate de plomb. Les échantillons sont observés au microscope à transmission (Philips, CM120) fonctionnant à 80 kV.

Anticorps	Protéine détectée	Distributeur : référence	Dilution
MJFR1	α -syn totale	Abcam : ab138501	IF = 1/400 WB = 1/500
Syn211	α -syn totale	Santa Cruz : sc-12767	IF = 1/400
AB 51253	α -syn Pser129	Abcam : [EP1536Y] ab51253	WB = 1/300
AB 42906	α -syn Pser129	Abcam : ab 42906	WB = 1/500
nc-82	Neurones présynaptiques	DSHB : nc82-c	IF = 1/800
Ref(2)-P	Ref(2)-P	(Nezis, et al. 2008)	IF = 1/800
Ref(2)-P	Ref(2)-P	Cell signaling : 5114	WB = 1/1 000
FK2	Ubiquitine liée	Millipore : 04-263	WB = 1/10 000
β -tubuline	β -tubuline	DSHB : E7-c	WB = 1/1 000

Tableau 2 : Liste des anticorps primaires

Préparation des extraits protéiques pour analyse par western blot

Les Drosophiles stockées à -80°C sont décapitées sur glace. Les têtes sont broyées au Potter 0,1 mL pendant 5 minutes sur glace dans les tampons A, B ou C additionnés du Cocktail inhibiteur de protéase (Roche, 04 693 132 001) et/ou du Cocktail inhibiteur de phosphatase (Pierce, 78428).

- Tampon A : Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, NP40 0,5% à PH 7.5.
- Tampon B : Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, NP40 1%, DL-Dithiothreitol 1mM à PH 7.5.
- Tampon C : Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, NP40 1%, DL-Dithiothreitol 50mM, SDS 1%, Urée 7M, Thiourée 2M.

Des lots de 100 têtes sont broyées dans 200 μ L de tampon A, B ou C. Après centrifugation à 15 000 g pendant 3 minutes à 21°C, 180 μ L de surnageant sont additionnés de 60 μ L de

tampon de dénaturation (16% SDS, 8% β -mercaptoethanol, 768 mM glycine, 100 mM Tris et 20% sucrose).

Résistance à une digestion par la protéinase K de l' α -synucléine

Les homogénats préparés en tampon B (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1% NP40, 1mM DL-Dithiothreitol à pH 7,5 (sans ajout du Cocktail inhibiteur de protéase) sont incubés pendant 60 minutes à 25°C.

Pour chacun les points de digestion (0 ou 0,5 ou 1 ou 1,5 ou 2 μ g/mL), 45,6 μ L d'homogénat sont additionnés de 11,4 μ L d'une solution de protéinase K à la concentration de (0 ou 2,5 ou 5 ou 7,5 ou 10 μ g/mL). Après une incubation de 30 minutes à 25°C, les extraits digérés sont additionnés de 19 μ L de tampon de dénaturation (16% SDS, 8% β -mercaptoethanol, 768 mM glycine, 100 mM Tris, 20% sucrose).

Western blot

Les extraits protéiques sont chauffés à 95-100°C pendant 5 minutes avant d'être déposés sur gel Stain-Free 4-15% (Bio-Rad, 5678084). Après 50 minutes de migration en tampon Tris/Glycine/SDS (Euromedex, EU 0510) à 200 Volts, le gel est activé sous UV (1 minute) puis les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF 0,45 μ M (1 heure, 115 Volts) en tampon Tris Caps (Bio-Rad, 161-0778). Après transfert et uniquement pour les membranes destinées à l'immunodétection de l' α -synucléine, la membrane est immergée 30 minutes dans une solution de PBS contenant de la PFA 4% et du glutaraldéhyde 0,01%. Les sites de fixation non spécifiques sont alors bloqués pendant 1h à température ambiante dans une solution de TBS- 0,1% Tween-3% BSA puis les membranes sont incubées sur la nuit avec différents anticorps primaires dilués dans une solution de TBS-0,1%Tween-1% BSA, dont la nature et la concentration sont spécifiées dans le tableau 2. Après trois lavages dans du TBS-0,1% Tween (5 et 5 et 10 minutes), un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris ou de chèvre anti-IgG de lapin couplé à l'enzyme « horseradish peroxydase » (HRP) dilués au 1/1 000 dans une solution de TBS-0,1% Tween est appliqué pendant 1 heure à température ambiante sur les membranes. Après trois lavages dans du TBS-0,1% Tween (5 et 5 et 10 minutes), puis un rinçage final en PBS (10 minutes). La révélation des immunomarquages est réalisée à l'aide du kit de révélation « Dura Extended Duration Substrate Kit » (Thermo Fisher, 34075). La

révélation puis l'analyse des immunomarquages obtenus est réalisée à l'aide du système d'imagerie ChemiDoc MP (Bio-Rad) et du logiciel d'analyse Image Lab (Bio-Rad).

Immunohistochimie

Les Drosophiles endormies sur glace sont décapitées puis les têtes sont immédiatement transférées dans une solution de formol 4% tamponnée à pH 7 pour 24 heures. Après inclusion en paraffine et recoupe de 4 µm d'épaisseur au microtome (épaisseur de 4 µm), les coupes de tissus sont déposées sur une lame de verre.

Après déparaffinage, les lames sont placées dans un tampon citrate 10 mM à pH 5,8 de démasquage antigénique (Sigma, C9999) et chauffées au micro-onde (5 minutes à 850 W, 5 minutes à température ambiante, 5 minutes à 200 W puis 20 minutes à température ambiante). Les lames sont incubées dans une solution d'eau oxygénée à 3% (VWR, 23615.261) pendant 5 minutes à température ambiante puis exposées à une solution de blocage commerciale « blocking reagent » (Sigma-Aldrich, 11096176001) pendant 30 minutes à température ambiante. Les tissus sont mis en présence de l'anticorps primaires AB 51253 au 1/300^{ème} ou AB42906 au 1/500^{ème} ou MJFR1 au 1/500^{ème} (Abcam, ab138501) pendant une nuit à 4°C. Après 5 rinçages avec du TBS-0,1% Tween, la solution de blocage commerciale « blocking reagent » (Sigma-Aldrich, réf 11096176001) est ajoutée pendant 30 minutes à température ambiante puis l'anticorps secondaire (Cliniscience, 4010-05) est appliqué pendant 1 heure 30 minutes à température ambiante au 1/250^{ème} en TBS-0,1% Tween. Après 5 rinçages avec du TBS-0,1% Tween, puis 3 rinçages avec du TBS, les tissus sont exposés à un substrat de révélation (Cliniscience, SK-4105) pendant 8 minutes. Les noyaux des échantillons sont contre-colorés par l'hématoxyline puis le montage final entre lame et lamelle est réalisé dans un milieu de montage (Pertex, 00811). Les échantillons sont visualisés par microscopie optique.

Extraction de l'ARN

Les Drosophiles endormies sont décapitées sur glace puis les têtes sont immédiatement transférées en tube Eppendorf et gardés sur glace. 100 µL de Trizol sont ajoutés pour broyer l'échantillon avec un stick Eppendorf pendant 5 minutes puis 400 µL de Trizol sont ajoutés et l'échantillon est laissé à incuber pendant 10 minutes à température ambiante. 100 µL de chloroforme sont ajoutés puis l'échantillon est vortexé pendant 30 secondes et laissé à incuber pendant 3 minutes à température ambiante. Après

centrifugation à 12 000 rpm pendant 45 minutes à 4°C, la phase aqueuse est récupérée et elle est laissée à incuber pendant 10 minutes à température ambiante.

Le même volume d'isopropanol est ajouté à la phase aqueuse puis le mélange est vortexé pendant 15 secondes et laissé à incuber pendant 10 minutes à température ambiante. Après centrifugation à 12 000 rpm pendant 30 minutes à 4°C, le surnageant est éliminé. Le culot est resuspendu dans 1 mL d'éthanol froid à 70%, puis centrifugé à 12 000 rpm pendant 15 minutes à 4°C, à deux reprises. Après centrifugation, l'éthanol est retiré pour laisser le culot sécher pendant 10-20 minutes puis l'ARN est suspendu dans 20 µL d'eau RNAase-free et vortexé pendant 10 secondes pour être homogénéisé. L'échantillon est placé à -80°C avant d'être utilisé.

RT-qPCR du gène *vmat*

Les extraits d'ARN sont traités par la DNase I selon la notice du kit utilisé (Invitrogen, 18068015) avec une incubation à 25°C pendant 15 minutes puis avec l'ajout d'EDTA à 25 mM suivi d'une incubation à 65°C pendant 10 minutes.

La synthèse d'ADNc est opérée selon la notice du kit de synthèse iScript cDNA (Biorad, 1708891) avec une étape d'amorçage à 25°C pendant 5 minutes puis avec l'étape de reverse transcription à 46°C pendant 20 minutes. L'enzyme est inactivée à 95°C pendant 1 minute.

La réaction de qPCR est réalisée en ajoutant à 10µL d'échantillon : 3 µL d'ADNc à 2,5 ng/µL, 5 µL de SYBR Green 2X et 2 µL du couple de primers *vmat* à 3 µM (primer sens = TTCACCGTAAACGCAAACACCACC, primer antisens = TTGATTGCTGTCCAACCTGCTGCT de (Fouillet, et al. 2012)).

Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé avec le logiciel GraphPad Prism 6.0

Résultats

Profil d'expression et détection de l' α -synucléine [A53T] humaine chez la Drosophile

Le modèle de Drosophile que nous proposons d'étudier a été décrit et mis au point par le groupe de Mel Feany il y a 20 ans (Feany et Bender 2000). Nous avons réalisé des marquages par immunofluorescence afin de contrôler le profil d'expression de l' α -synucléine humaine (α -syn) avec le promoteur ELAV avec le système d'expression UAS/Gal4 par des Drosophiles (Figure 1). Ces immuno-marquages ont été réalisés avec l'anticorps MJFR1 qui reconnaît l' α -syn humaine totale. L' α -syn est détectée dans tout le cerveau de la Drosophile et plus fortement dans des structures neuronales que sont les « mushroom bodies », les lobes antennaires et les ganglions sub-œsophagiens. Chez des Drosophiles âgées de 35 jours (Figure 1A, panels c et d), la détection en immunofluorescence de l' α -syn [A53T] diminue dans les lobes antennaires et les ganglions sub-œsophagiens et cette détection diminue davantage à 50 jours (Figure 1A, panels e et f). Nous avons également pu observer ce profil et cette diminution de la détection de l' α -syn [A53T] par immunofluorescence avec un second anticorps détectant l' α -syn totale, l'anticorps Syn211 (résultats non montrés). L' α -syn est également détectée mais faiblement dans l'œil de la Drosophile âgée de 10 jours (Figure 1B, panel de gauche). Ce profil d'expression du transgène sous le contrôle du promoteur ELAV est cohérent avec ce qui a été publié précédemment (Koushika, Lisbi et White 1996). Une expression de l' α -syn [A53T] sous le contrôle du promoteur sGMR induit une forte détection dans l'ensemble des types cellulaires de la rétine de la Drosophile, à savoir dans les photorécepteurs, des cellules de type neuronal, et dans les cellules inter-ommatidiales, des cellules à fonction gliale (Figure 1B, panel de droite). Dans ce contexte d'expression, l' α -syn [A53T] est également détectée dans les prolongements des neurones, au niveau de la lamina et de la medulla. Ce profil d'expression et cette forte expression de l' α -syn [A53T] sous le contrôle du promoteur sGMR sont cohérents avec les descriptions de la littérature (Fouillet, et al. 2012) (Van Den Brink, et al. 2018) (Poças, et al. 2015). Le profil et le niveau d'expression de l' α -syn [A53T] mis en évidence dans la figure 1, sous promoteur sGMR ou ELAV, sont similaires à ceux observés lors de l'expression d'autres transgènes comme l' α -syn humaine WT ou la GFP (résultats non montrés).

Figure 1

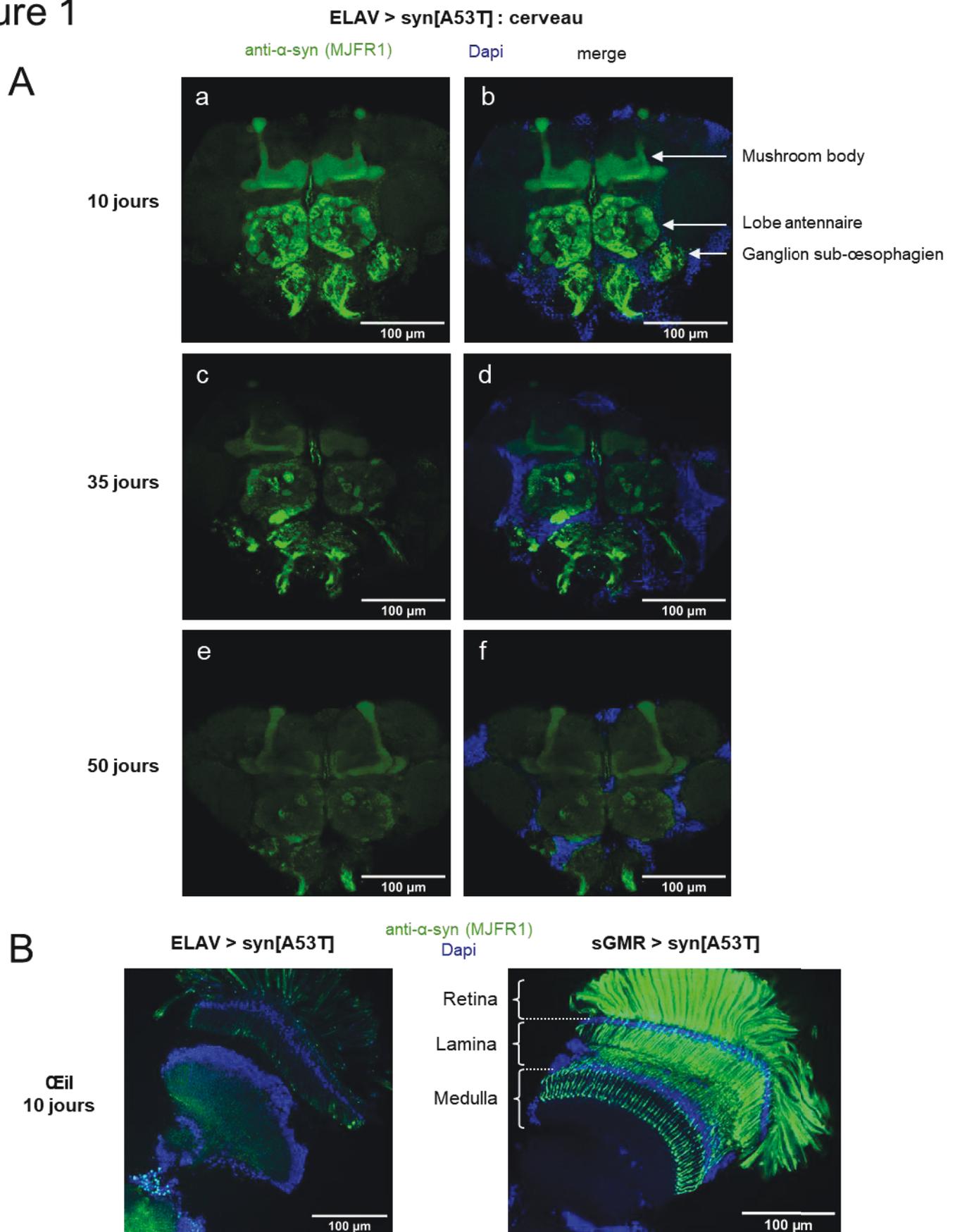


Figure 1. L' α -synucléine [A53T] devient moins immuno-délectable chez les Drosophiles âgées

(A). L' α -synucléine totale est détectée par immunofluorescence avec l'anticorps MJFR1 dans le cerveau de Drosophiles âgées de 10 jours (panel a), de 35 jours (panel c) ou 50 jours (panel e) exprimant le transgène ;;UAS-syn[A53T], notamment dans les « mushroom bodies », les lobes antennaires et les ganglions sub-œsophagiens (panel b). L'intensité du marquage diminue lors du vieillissement des Drosophiles (panels a, c et e). Le marquage Dapi met en évidence les corps cellulaires situés dans le cortex, en périphérie du cerveau (panels b, d et f). Microscopie confocale, vue frontale, grossissement x200.

(B). L' α -synucléine totale est détectée par immunofluorescence avec l'anticorps MJFR1 dans les photorécepteurs de la rétine (panel b) ou sous le contrôle du promoteur sGMR dans les cellules neuronales et gliales de la rétine (panel c) dans des Drosophiles âgées de 10 jours. Microscopie confocale, grossissement x400.

La détection de l' α -syn [A53T] par immunofluorescence diminue avec l'âge, nous proposons de suivre l'accumulation de l' α -syn [A53T] dans ce modèle sous le contrôle du promoteur ELAV en fonction de l'âge des Drosophiles.

Modifications des propriétés biochimiques de l' α -synucléine [A53T] en fonction de l'âge des Drosophiles

Afin de comprendre si la diminution de la détection d' α -syn dans les cerveaux de Drosophiles était due à une modification de l' α -syn en lien avec le vieillissement des Drosophiles, nous avons étudié la solubilité l' α -syn [A53T] extraite de têtes de Drosophiles avec le tampon d'extraction B à différents âges (Figure 2A, panel a). Nous observons un niveau stable d' α -syn [A53T] contenue dans la fraction soluble de têtes de Drosophiles âgées de 1 à 30 jours. Ce niveau diminue entre 30 et 40 jours et l' α -syn monomérique n'est plus détectée à 50 jours. Nous avons modifié les conditions d'extraction protéique de l' α -syn avec des tampons d'extraction enrichis en détergents ioniques (SDS), non-ioniques (DTT) ou en constituants capables de déstabiliser des formes hautement agrégées (urée, thio-urée) pour détecter des formes d' α -syn qui seraient agrégées. Les protéines ont été extraites des têtes de Drosophiles âgées de 10 ou 50 jours avec le tampon d'extraction A, composé notamment de 0,5% Np40, ou le tampon B, composé notamment de 1% Np40 et de 1 mM DTT, ou C, composé de 1% Np40, de 1 mM DTT comme le tampon B et additionné de SDS, d'urée et de thio-urée (Figure 2A, panel b). Le niveau d' α -syn extraite de têtes de Drosophiles avec le tampon A est plus faible à 50 jours par rapport à 10 jours. Ce résultat met en évidence une diminution de la solubilité de l' α -syn [A53T] avec l'âge. Le niveau d' α -syn extraite de têtes de Drosophiles âgées de 50 jours est plus fort avec les tampons B ou C par rapport au tampon A. Nous avons également utilisé une autre approche de détection de l' α -syn [A53T] avec l'anticorps MJFR1 par immunohistochimie (IHC) chez les Drosophiles âgées de 10 ou 40 jours (Figure 3, panels a et b). L' α -syn [A53T] est détectée par IHC dans l'ensemble du cerveau des Drosophiles âgées de 10 ou 40 jours et de manière encore plus forte dans les mêmes structures neuronales mises en évidence par immunofluorescence. La surface de marquage de l' α -syn [A53T] augmente dans les cerveaux de Drosophiles âgées de 40 jours par rapport à ceux de 10 jours. Les résultats de détection de l' α -syn [A53T] obtenus par IHC sont contradictoires avec ceux obtenus par immunofluorescence. Cela pourrait

être expliqué par l'étape de démasquage antigénique du protocole d'IHC mais qui est absente du protocole d'immunofluorescence. Pour déterminer si les difficultés d'immuno-détection de l' α -syn [A53T] chez les Drosophiles âgées par immunofluorescence étaient dues à une modification conformationnelle de la protéine, nous avons décrit le profil de digestion de l' α -syn [A53T] par des doses croissantes de protéinase K en fonction de l'âge des Drosophiles (Figure 2B) comme cela a été fait dans le cadre d'autres études (Suzuki, et al. 2015). Les protéines contenues dans la fraction soluble extraite de têtes de Drosophiles avec le tampon B ont été digérées par 0 ou 0,75 ou 1 ou 1,5 ou 2 μ M de pK et l' α -syn [A53T] a été détectée avec l'anticorps MJFR1. L' α -syn [A53T] monomérique n'est plus détectable après une digestion avec 1,5 μ M de pK à 10 jours alors qu'elle reste détectable pour les Drosophiles âgées de 50 jours. L' α -syn [A53T] extraite de Drosophiles âgées de 50 jours est plus résistante à une digestion par 1,5 μ M de pK que celle extraite des mêmes Drosophiles âgées de 10 jours. Afin de mettre en évidence des agrégats d' α -syn, nous avons utilisé la technique de microscopie électronique à transmission (MET) pour pouvoir observer des structures agrégées, denses aux électrons. Les Drosophiles exprimant l' α -syn [A53T] sous le contrôle du promoteur ELAV ne présentaient pas de structure dense aux électrons dans les neurones photorécepteurs (résultats non montrés). Afin de favoriser l'agrégation de l' α -syn [A53T] et observer des structures agrégées, nous avons sélectionné le promoteur sGMR pour surexprimer plus fortement l' α -syn [A53T] (Figure 2C). Des structures denses aux électrons sont observées dans les projections axonales des photorécepteurs au niveau du lobe optique, dans la lamina, chez les Drosophiles âgées de 30 jours exprimant l' α -syn [A53T] mais pas à 1 jour (Figure 2C). Des structures de formes similaires mais plus grosses et plus denses sont observées dans les Drosophiles exprimant l' α -syn [A53T] âgées de 60 jours (Figure 2C).

Après l'étude des modifications biochimiques subies par l' α -syn et en lien avec son agrégation, nous avons souhaité mettre en évidence la présence éventuelle de l' α -syn phosphorylée en sérine 129 (Pser129) dans le cerveau de Drosophile exprimant l' α -syn [A53T].

Figure 2

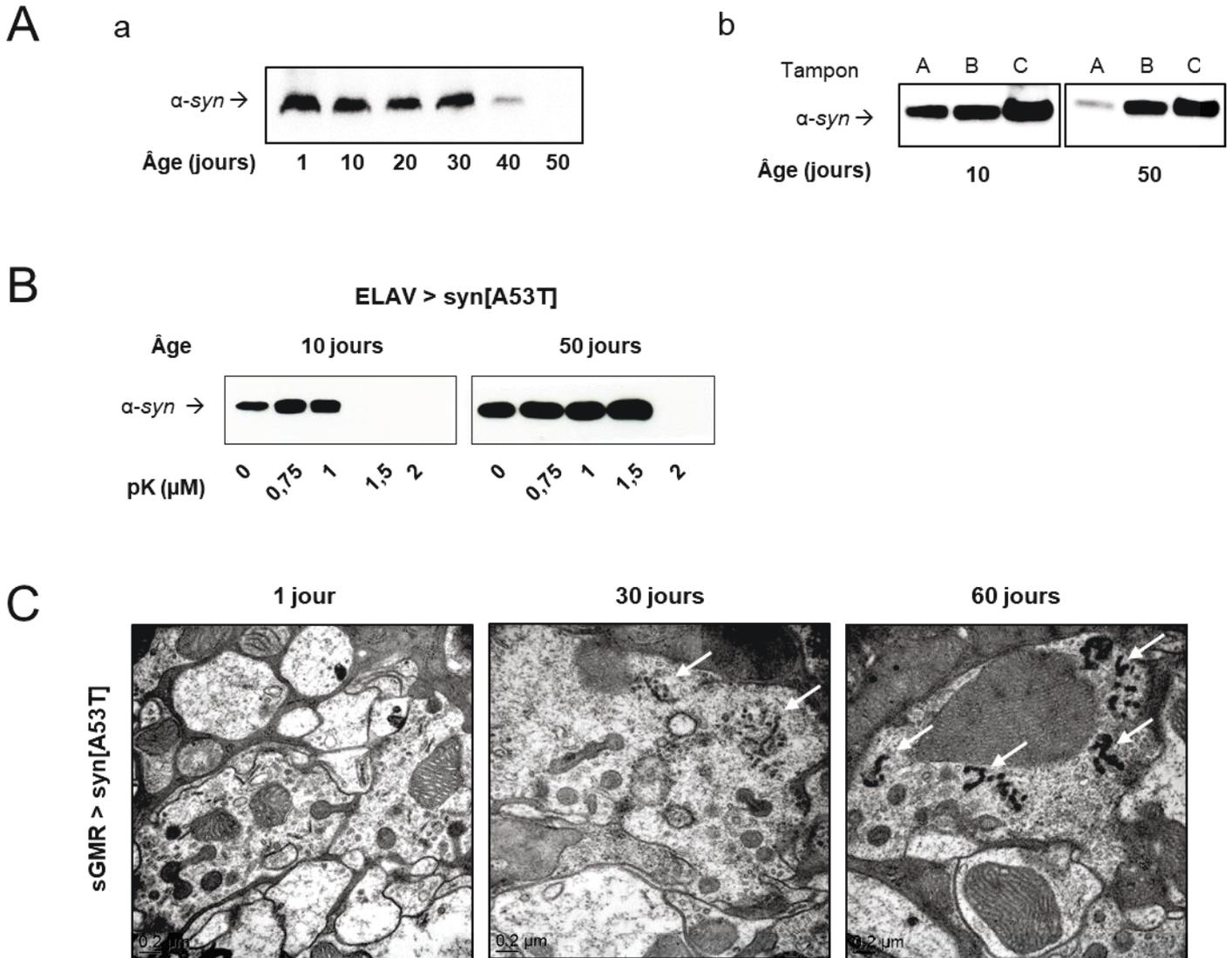


Figure 2. L' α -synucléine [A53T] devient plus agrégable chez les Drosophiles âgées

(A). Solubilité de l' α -synucléine [A53T] monomérique extraite en tampon A en fonction de l'âge des Drosophiles (panel a) ou à 10 et 50 jours en fonction des tampons d'extraction A, B ou C (panel b).

(B). Résistance de l' α -synucléine [A53T] monomérique à une digestion par la protéinase K en fonction de l'âge des Drosophiles et de la concentration de protéinase K.

(C). Détection d'agrégats denses aux électrons dans la lamina de Drosophiles âgées de 1 ou 30 ou 60 jours exprimant le transgène ;;UAS-syn[A53T] dans les cellules des rétines sous le contrôle du promoteur sGMR-Gal4. Microscopie électronique à transmission, grossissement x19 500.

Identification de l' α -synucléine [A53T] phosphorylée en sérine 129 en fonction de l'âge des Drosophiles

Nous avons tenté de détecter la forme phosphorylée sur la sérine en position 129 de l' α -syn (Pser129 α -syn) par la technique d'IHC avec deux anticorps différents, AB51253 et AB 42906 sur des coupes de cerveaux de Drosophiles exprimant l' α -syn [A53T] sous le contrôle du promoteur ELAV à différents âges (Figure 3). Ces deux anticorps sont spécifiques de l' α -syn Pser129. On observe un marquage faible de l' α -syn Pser129 dans le cerveau de Drosophiles âgées de 10 jours avec l'anticorps 51253 (Figure 3, panel c). Ce marquage de l' α -syn Pser129 correspond aux structures neuronales où l' α -syn [A53T] est fortement détectée avec l'anticorps MFJR1 (Figure 3a), comme dans les ganglions sub-œsophagiens par exemple (Figure 3, panel c') ou dans les lobes antennaires (résultats non montrés). L' α -syn Pser129 est détectée dans les mêmes structures neuronales (Figure 3, panel d) mais la surface de marquage est plus étendue, comme observée au niveau des ganglions sub-œsophagiens par exemple (Figure 3, panel d') ou dans les lobes antennaires (résultats non montrés) dans les cerveaux de Drosophiles âgées de 40 jours. La détection de l' α -syn Pser129 avec l'anticorps AB42906 permet d'observer un marquage au niveau de la région péri-œsophagienne dans les cerveaux de Drosophiles âgées de 10 jours (Figure 3, panel e) et âgées de 40 jours (Figure 3, panel f). A 40 jours, on peut observer un marquage additionnel de l' α -syn Pser129 dans le neuropil, dans une région arrière du cerveau des Drosophiles (Figure 3, panel f'). Bien que ces deux anticorps soient spécifiques de l' α -syn phosphorylée, il semble que les anticorps AB51253 et AB 42906 mettent en évidence deux populations différentes d' α -syn Pser129 dans le cerveau des Drosophiles.

Suite à la mise en évidence de formes agrégées par techniques biochimiques et l'observation de formes phosphorylées en sérine 129 d' α -syn [A53T] *in situ* dans le cerveau et d'agrégats denses aux électrons dans l'œil de Drosophiles âgées, nous avons souhaité comprendre si ces modifications de l' α -syn étaient en lien avec une altération des voies de dégradation des protéines comme le système du protéasome ou la voie de l'autophagie chez les Drosophiles âgées.

Figure 3

ELAV > syn[A53T]

10 jours

40 jours

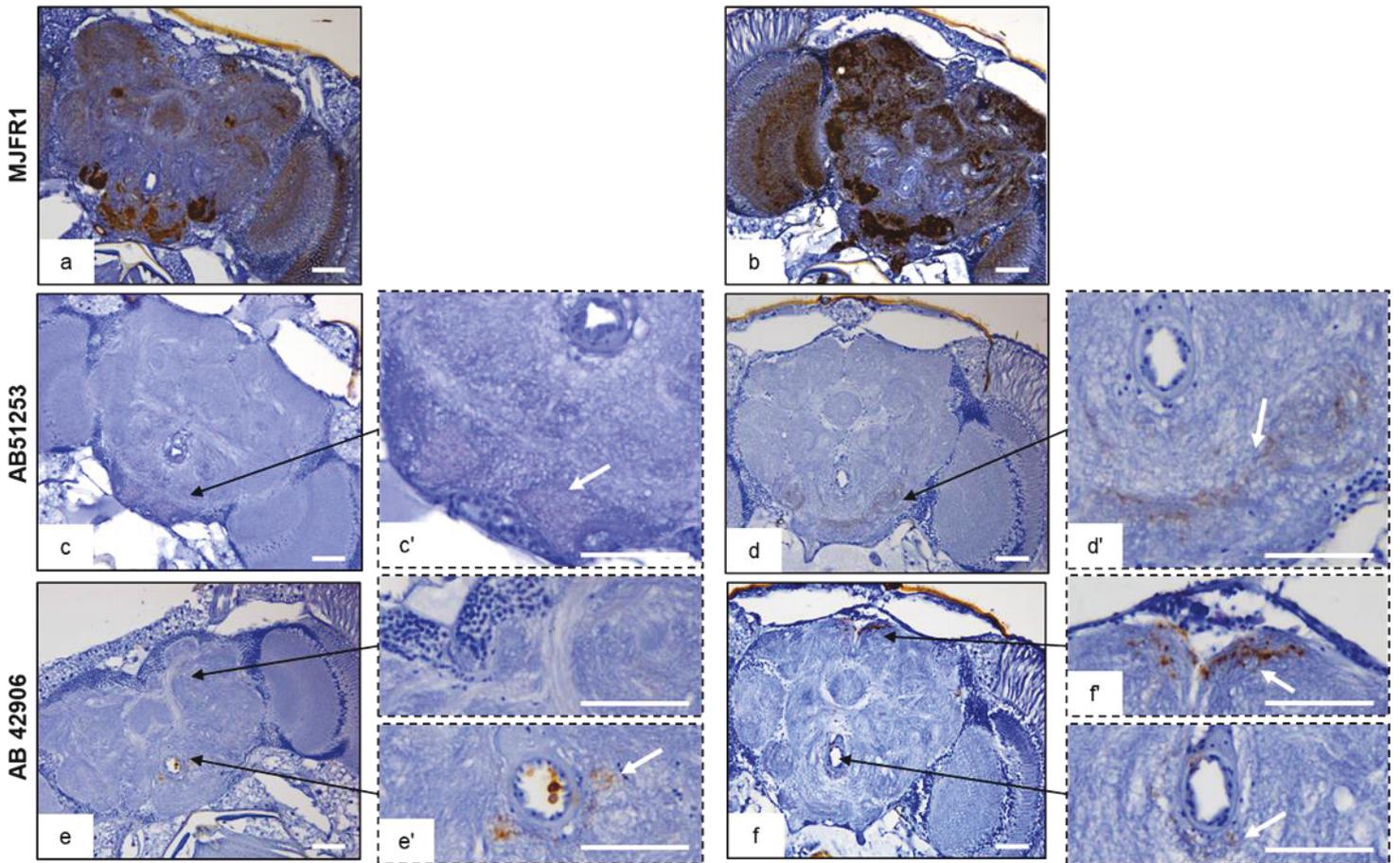


Figure 3. L' α -synucléine [A53T] s'accumule et est phosphorylée en sérine 129 chez les *Drosophiles* âgées

Identification des structures neuronales exprimant le transgène ;;UAS-syn[A53T] par immunohistochimie sous le contrôle du promoteur pan-neuronal ELAV dans des *Drosophiles* âgées de 10 jours (panels a,c et e) ou de 40 jours (panels b, d et f) avec l'anticorps MJFR1 détectant l' α -synucléine totale (panels a et b) ou les anticorps Ab51253 (panels c et d) et Ab42906 (panels e et f) détectant l' α -synucléine phosphorylée en sérine 129.

Observation au microscope optique, barre d'échelle = 50 μ m.

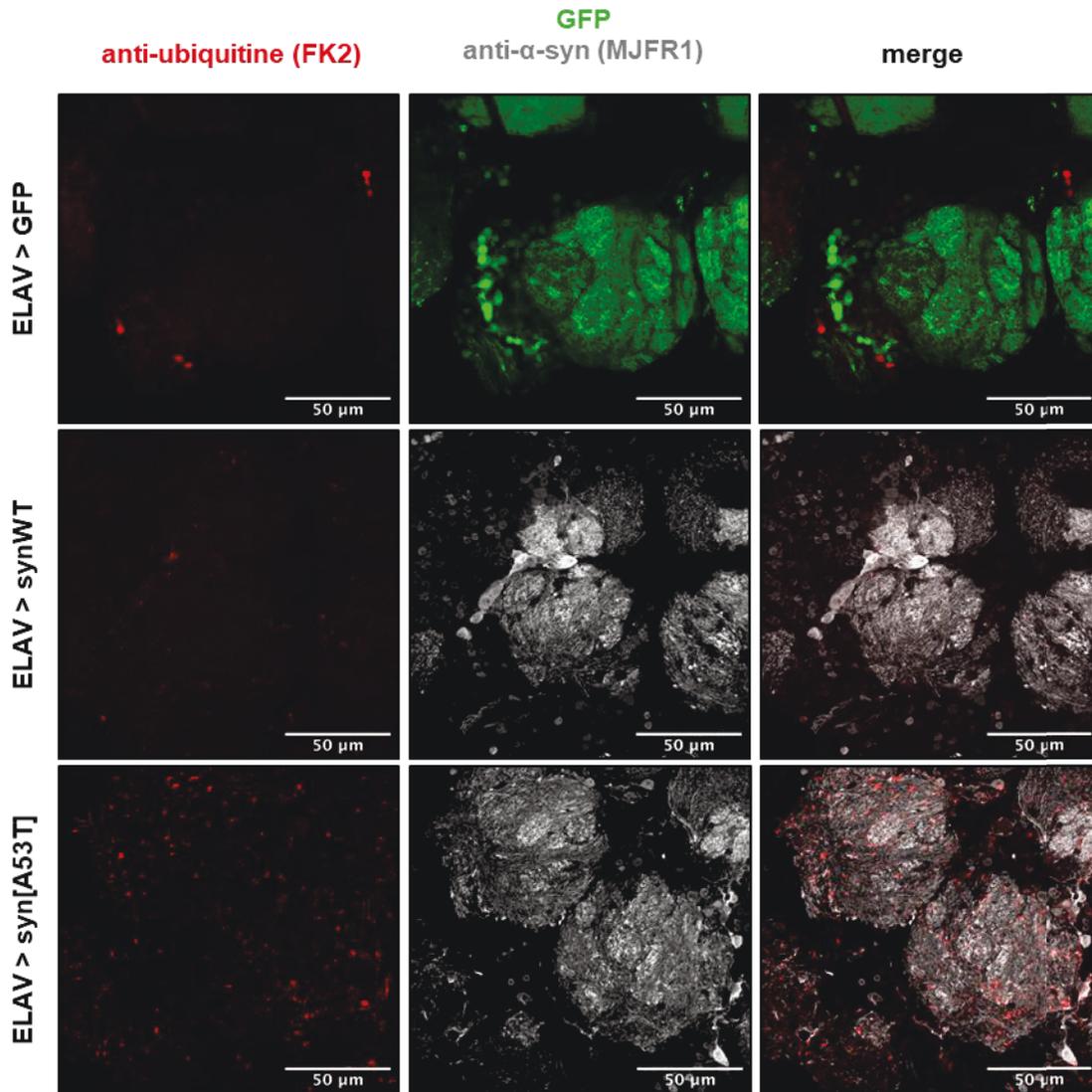
Altération des voies de dégradation des protéines en lien avec l'expression de l' α -synucléine [A53T] dans les Drosophiles âgées

Nous avons cherché à déterminer si la voie de l'ubiquitine-protéasome était altérée dans les cerveaux de Drosophiles âgées de 40 jours exprimant l' α -syn [A53T] sous le contrôle du promoteur ELAV. Pour cela nous avons regardé par immunofluorescence si des protéines ubiquitinylées s'accumulaient dans les lobes antennaires, où l' α -syn est fortement détectée (Figure 4A). Cette expérience préliminaire permet d'observer une accumulation des protéines ubiquitinylées dans les lobes antennaires des Drosophiles exprimant l' α -syn [A53T] avec une surface et une intensité de marquage plus élevée que dans les lobes antennaires de Drosophiles qui expriment la protéine contrôle GFP ou l' α -syn WT (Figure 4B). Nous avons ensuite souhaité déterminer si la voie de l'autophagie était altérée dans les rétines de Drosophiles âgées de 60 jours exprimant l' α -syn [A53T]. Pour cela nous avons détecté par immunofluorescence afin de déterminer si la protéine Ref(2)-P/p62 s'accumulait dans les rétines de Drosophiles exprimant fortement deux protéines contrôles, mCD8 ou mito-HA, ou une des formes, WT ou [A53T], de l' α -syn portant un tag GFP sous le contrôle du promoteur sGMR. (Figure 5). Cette expérience préliminaire permet d'observer une accumulation de Ref(2)-p/p62 dans les rétines de Drosophiles exprimant l' α -syn, et notamment la forme [A53T], par rapport aux rétines de Drosophiles exprimant une des protéines contrôles mCD8-GFP ou mito-HA-GFP.

Les méthodes mises en œuvre pour étudier les modifications de l' α -syn [A53T] nous ont permis de mettre en évidence des formes agrégées par techniques biochimiques et des formes phosphorylées en sérine 129 d' α -syn [A53T] par technique immunohistochimique dans les cerveaux, en fonction de l'âge des Drosophiles ainsi que des altérations des voies du protéasome et de l'autophagie. Dans ces conditions, nous avons souhaité déterminer si ce modèle de Drosophile pouvait être un outil pour l'étude des modes d'action des substances chimiques en condition d'exposition chronique. Plus particulièrement, nous avons souhaité mettre en évidence les effets induits en réponse à une exposition chronique au paraquat (PQ) contenu dans le milieu nutritif composé d'agarose et de sucrose, à une dose de 0,75 mM et pendant 15 jours, sur l'accumulation et les modifications post-traductionnelles de l' α -syn ainsi que sur les voies de dégradation des protéines.

Figure 4

A



B

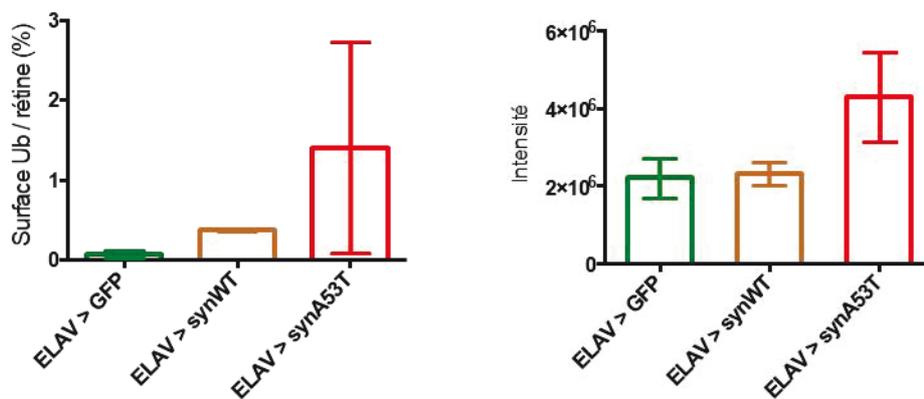


Figure 4. Les protéines ubiquitinylées s'accumulent dans les Drosophiles âgées exprimant l' α -synucléine [A53T]

(A). Détection de protéines ubiquitinylées par immunofluorescence avec l'anticorps FK2 dans les lobes antennaires de Drosophiles âgées de 40 jours exprimant le transgène ;UAS-GFP; ou ;;UAS-synWT ou ;;UAS-syn[A53T] de manière panneuronale sous le contrôle du promoteur ;;ELAV-Gal4. Observation en microscopie confocale, grossissement x400.

(B). Quantification du panel A. Rapport de la surface du marquage Ubiquitine sur la surface du lobe antennaire, exprimé en pourcentage et intensité du marquage ubiquitine. Expérience préliminaire.

Figure 5

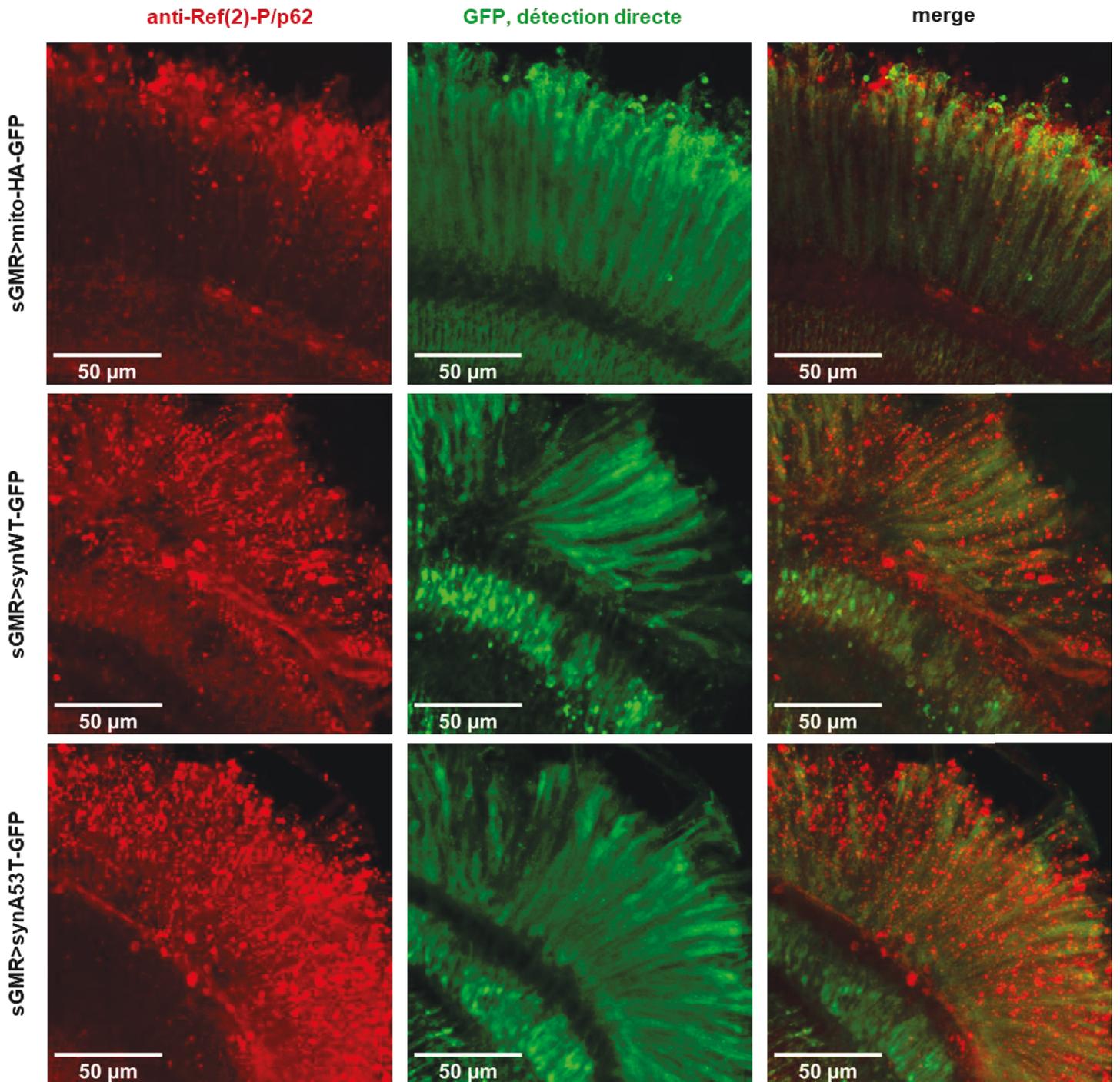


Figure 5. La protéine Ref(2)-P/p62 s'accumule dans les Drosophiles âgées exprimant l' α -synucléine [A53T]

Détection de Ref(2)-P/p62 par immunofluorescence dans les rétines de Drosophiles âgées de 60 jours exprimant le transgène UAS-mCD8-GFP ou UAS-synWT-GFP ou UAS-syn[A53T]-GFP dans les cellules de leurs rétines sous le contrôle du promoteur sGMR-Gal4. Observation en microscopie confocale, grossissement x200.

Sensibilité à une exposition chronique au PQ des Drosophiles exprimant l' α -synucléine

La toxicité d'un inducteur chimique de la MP, comme le PQ, est classiquement suivie grâce à la mesure de la survie des Drosophiles exposées (Feany et Bender 2000) (Cassar, et al. 2015) (Issa, et al. 2018) (Robin, et al. 2019). A la dose de 0,75mM de PQ, la survie moyenne est d'environ 15 jours pour les Drosophiles exprimant l' α -syn, sous forme WT ou [A53T], de manière pan-neuronale sous le contrôle du promoteur ELAV alors qu'elle est d'environ 30 jours en condition contrôle (Figure 6A). On observe que les Drosophiles exprimant l' α -syn WT ont une durée de vie moyenne qui est réduite par rapport aux deux autres lignées, en condition contrôle (Figure 6A). En condition d'exposition chronique à 0,75mM de PQ, les Drosophiles exprimant une des formes, WT ou [A53T], de l' α -syn ont une survie réduite par rapport aux Drosophiles exprimant la protéine GFP (Figure 6A). Certaines caractéristiques de ces courbes de survie peuvent être étudiées plus précisément et notamment la réduction de la survie moyenne entre les conditions contrôles et exposées au PQ (Figure 6B) ainsi que la pente aux alentours de la survie moyenne (Figure 6C). La diminution de la survie moyenne des Drosophiles est significativement plus importante pour celles exprimant une des formes, WT ou [A53T], de l' α -syn que pour les Drosophiles exprimant la protéine GFP (Figure 6B). Cette diminution est encore plus importante pour les Drosophiles exprimant d' α -syn [A53T] par rapport aux Drosophiles exprimant la GFP (Figure 6B). Les pentes des courbes de survie au voisinage de la survie moyenne sont similaires pour les Drosophiles exprimant la GFP, l' α -syn WT ou l' α -syn [A53T] en condition contrôle (Figure 6C). En condition d'exposition chronique au PQ, les pentes des courbes de survie des Drosophiles exprimant la GFP ou l' α -syn WT sont similaires entre elles mais également avec celles de la condition contrôle. La pente de la courbe de survie des Drosophiles exprimant l' α -syn [A53T] en condition d'exposition au PQ est significativement différente des autres conditions (Figure 6C). La valeur de la pente de la courbe de survie des Drosophiles exprimant l' α -syn [A53T] et exposées au PQ reflète la toxicité de cette condition et supporte le résultat de la diminution de survie moyenne des Drosophiles exposées chroniquement au PQ (Figure 6B).

Afin de décrire les effets d'une exposition chronique au PQ, nous avons souhaité étudier d'éventuelles modifications telles que l'accumulation, l'agrégation et la phosphorylation en sérine 129 de l' α -syn.

Figure 6

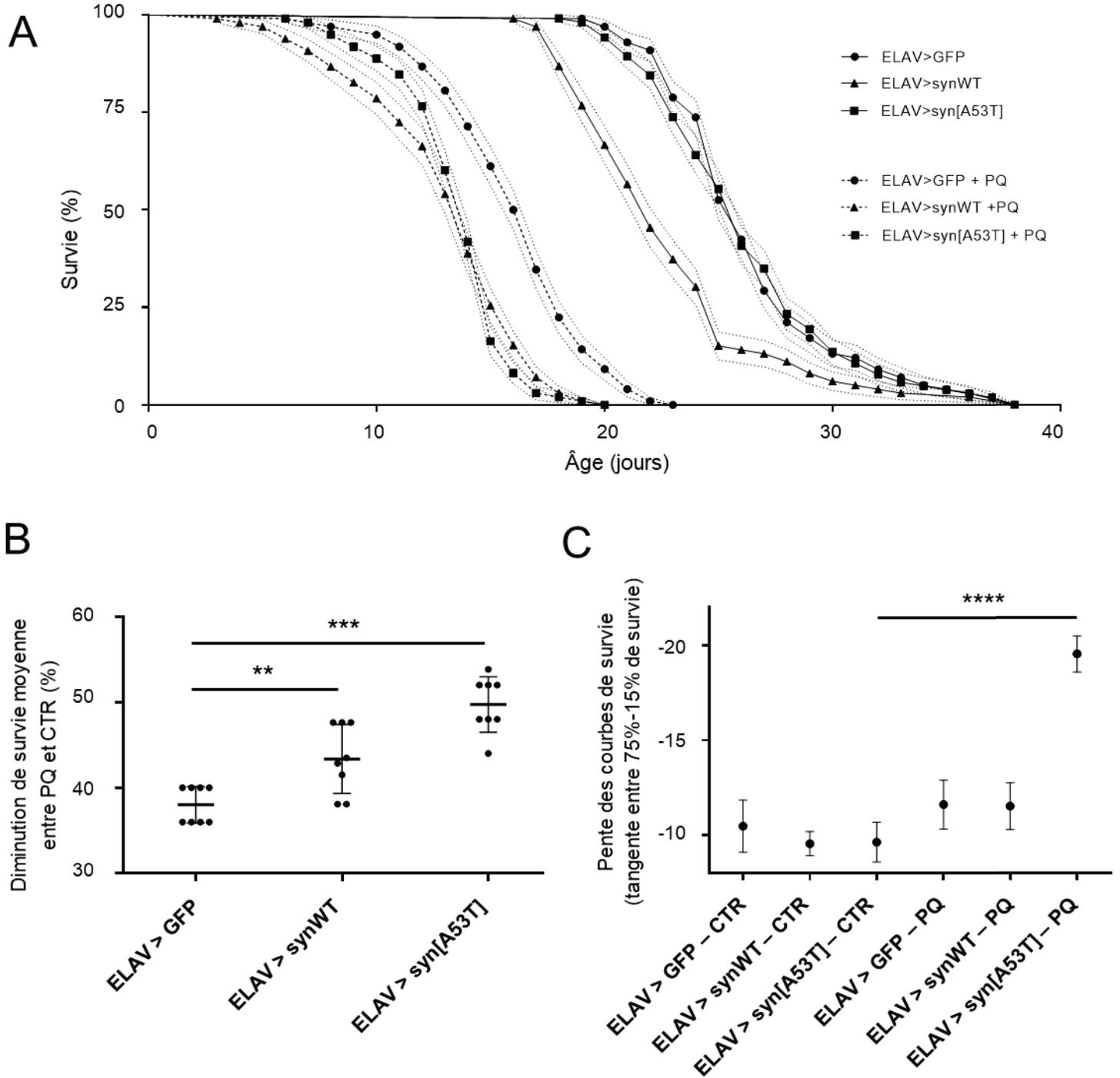


Figure 6. Les Drosophiles exprimant l' α -synucléine [A53T] sont plus sensibles à une exposition chronique au paraquat

(A) Courbes de survie de Drosophiles mâles réalisées à partir de N=5 expériences indépendantes, avec 718 individus ELAV>GFP, 500 individus ELAV>synWT, 1069 individus ELAV>syn[A53T] en condition contrôle et 1306 individus ELAV>GFP, 2247 individus ELAV>synWT et 1121 individus ELAV>syn[A53T] en condition [0,75mM] PQ. Les courbes de survie sont décalées vers la gauche en condition PQ par rapport aux conditions CTR. Les lignes en pointillés représentent la déviation standard des courbes de survie.

(B) Pourcentage de diminution de la survie moyenne avec une exposition chronique à [0,75mM] PQ. La moyenne des résultats est exprimée +/- la déviation standard. Test statistique Mann-Whitney avec *** p = 0,0002 or ** p=0,0087 en comparaison avec le groupe contrôle ELAV>GFP. N=8 expériences indépendantes.

(C) Valeurs des pentes des courbes de survie calculées entre 75% et 15% de survie. La moyenne des résultats est exprimée +/- déviation standard. Test statistique Tukey, alpha=0,05. N=5 expériences indépendantes.

Expression de l' α -synucléine [A53T] par les Drosophiles exposées chroniquement au PQ

L'expression des ARNm de l' α -syn ou de la GFP extraits de têtes de Drosophiles a été mesurée par RT-qPCR après 15 jours d'exposition à 0,75mM de PQ (Figure 7A). Cette expérience préliminaire met en évidence une surexpression du gène codant pour l' α -syn dans les Drosophiles exprimant la forme WT (Figure 7A, en jaune) ou [A53T] (Figure 7A, en rouge) de l' α -syn après 15 jours d'exposition au PQ par rapport à la condition contrôle. Une exposition chronique au PQ induit, à l'inverse, une diminution de l'expression de l'ARNm codant pour la protéine GFP dans les Drosophiles exprimant cette protéine contrôle (Figure 7A, en vert). L'expression de l' α -syn, WT ou [A53T], a également été suivie au niveau protéique avec la détection de l' α -syn monomérique dans la fraction soluble extraite de têtes de Drosophiles exposées pendant 15 jours au PQ avec le tampon de composition A (Figure 7B). Le résultat de ces expériences indique que les niveaux d' α -syn WT mesurés après 15 jours d'exposition au PQ ou en condition contrôle sont similaires avec un ratio d'environ 100% (Figure 7B, en jaune). Le ratio de 160% pour l' α -syn [A53T] indique qu'une exposition chronique au PQ augmente la détection de la protéine par rapport à la condition contrôle (Figure 7B, en rouge).

Après avoir mis en évidence des niveaux augmentés de l'ARNm de l' α -syn [A53T] et de la protéine suite à une exposition chronique au PQ des Drosophiles, nous avons interrogé les effets de cette exposition sur l'agrégation de l' α -syn.

Figure 7

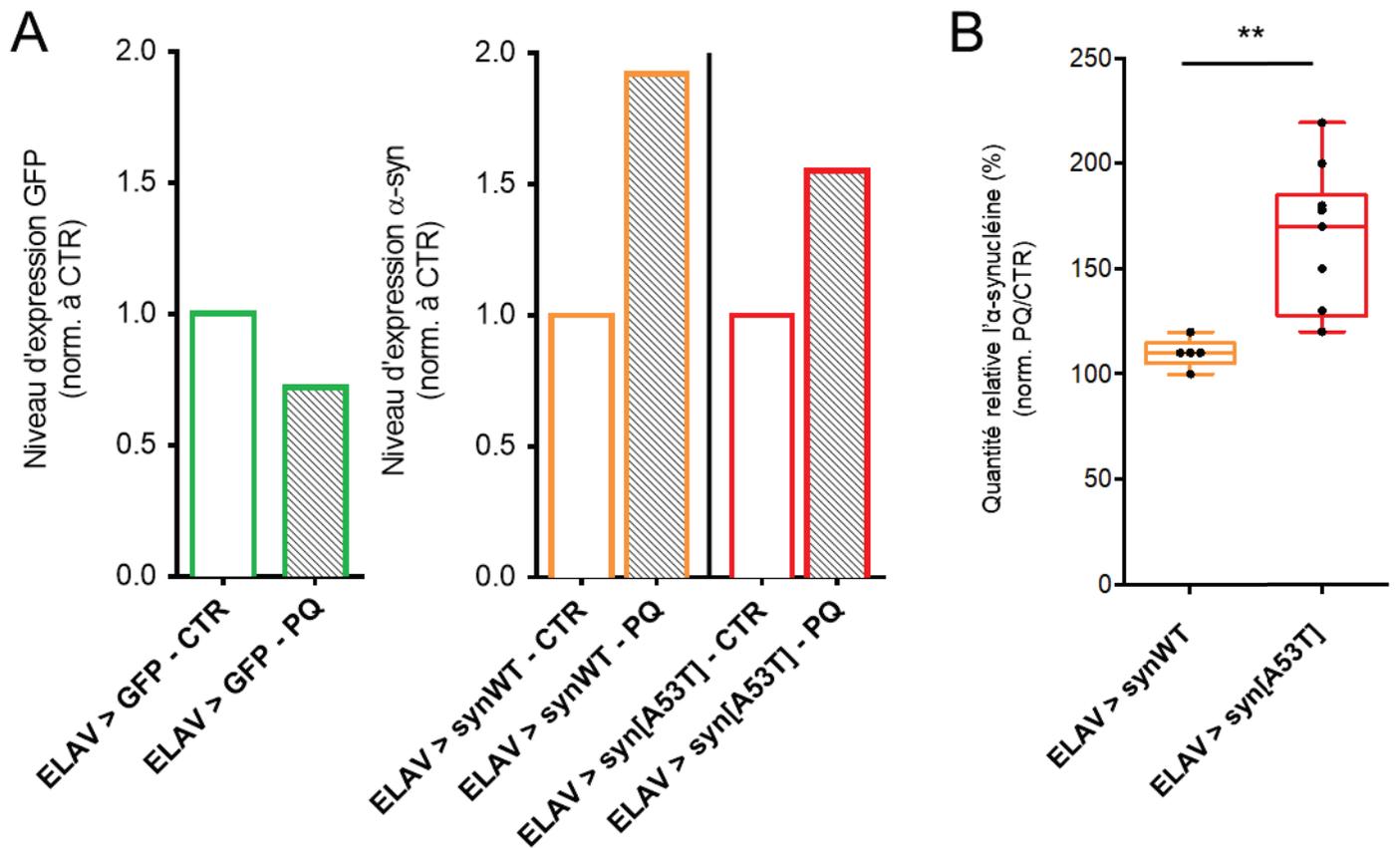


Figure 7. L'expression de l' α -synucléine [A53T], mais pas WT, augmente chez les Drosophiles exposées chroniquement au paraquat

(A). Niveau transcriptionnel du gène codant pour l' α -synucléine ou pour la GFP mesuré par qPCR dans les têtes de Drosophiles ELAV>synWT ou ELAV>[A53T], ou ELAV>GFP, après 15 jours d'exposition chronique à [0,75mM] PQ ou en condition CTR et normalisé par rapport à la condition CTR. Expérience préliminaire.

(B). Détection relative de l' α -synucléine monomérique, WT ou [A53T], en tampon d'extraction protéique A après 15 jours d'exposition chronique à [0,75mM] PQ mesurée par Western-blot avec l'anticorps MJFR1 et réalisée à partir de N=4 à 8 expériences indépendantes, avec 5x100 têtes ELAV>synWT, 8x100 têtes ELAV>syn[A53T] en condition CTR et 4x100 têtes ELAV>synWT et 7x100 têtes ELAV>syn[A53T] en condition [0,75mM] PQ.

Modifications des propriétés biochimiques de l' α -synucléine [A53T] dans les Drosophiles exposées chroniquement au PQ

Afin de déterminer l'effet d'une exposition chronique au PQ sur des modifications de l' α -syn en lien avec son agrégation, nous avons décrit le profil de digestion de l' α -syn, WT ou [A53T], par des doses croissantes de protéinase K (pK) (Figure 8). En effet, l' α -syn monomérique restée détectable après une digestion par la pK est considérée comme étant dans une conformation agrégée. Les protéines contenues dans la fraction soluble extraite de têtes de Drosophiles avec le tampon B ont été digérées par 0 à 2 μ M de pK et l' α -syn, WT (Figure 8A) ou [A53T] (Figure 8B), a été détectée avec l'anticorps MJFR1. On observe que l' α -syn WT est faiblement détectée après une digestion avec 1 μ M de pK et qu'elle ne l'est plus avec 1,5 μ M de pK (Figure 8A) alors que de l' α -syn [A53T] reste détectable après une digestion avec 1,5 μ M de pK (Figure 8B) en condition contrôle et cette différence est retrouvée en condition d'exposition chronique au PQ. Ces résultats indiquent que l' α -syn [A53T] est plus résistante à une digestion par une même concentration de pK que l' α -syn WT. A la concentration de 1 μ M de pK, l' α -syn WT est plus détectée en condition contrôle qu'en condition exposée au PQ. On peut conclure que l'exposition au PQ ne favorise pas l'agrégation de l' α -syn WT. L' α -syn [A53T] est détectée après une digestion avec 1,5 μ M de pK et ne l'est plus avec 2 μ M de pK, en condition contrôle comme en condition d'exposition chronique au PQ (Figure 8B et 8D). L'exposition au PQ ne modifie donc pas l'agrégation de l' α -syn [A53T]. On peut observer que le profil de digestion par des doses croissantes de pK de l' α -syn WT (Figure 8C) est différent de celui de l' α -syn [A53T] (Figure 8D) avec un effet rebond pour l' α -syn [A53T] à la dose de 0,5 μ M de pK. Ces résultats indiquent que la quantité d' α -syn [A53T] sous forme monomérique augmente à la suite d'une digestion par 0,5 μ M de pK, en condition contrôle comme en condition exposée, alors que la quantité d' α -syn WT diminue. En effet, à faible dose, la pK est également utilisée pour solubiliser les agrégats protéiques. On observe que la quantité d' α -syn [A53T] diminue seulement à partir d'une digestion par 1,5 μ M de pK alors que la quantité d' α -syn WT monomérique diminue dès une digestion par 0,5 μ M de pK. Une dose faible de pK permet de déstabiliser l' α -syn [A53T] agrégée et une dose plus élevée permet de digérer la forme monomérique.

Figure 8

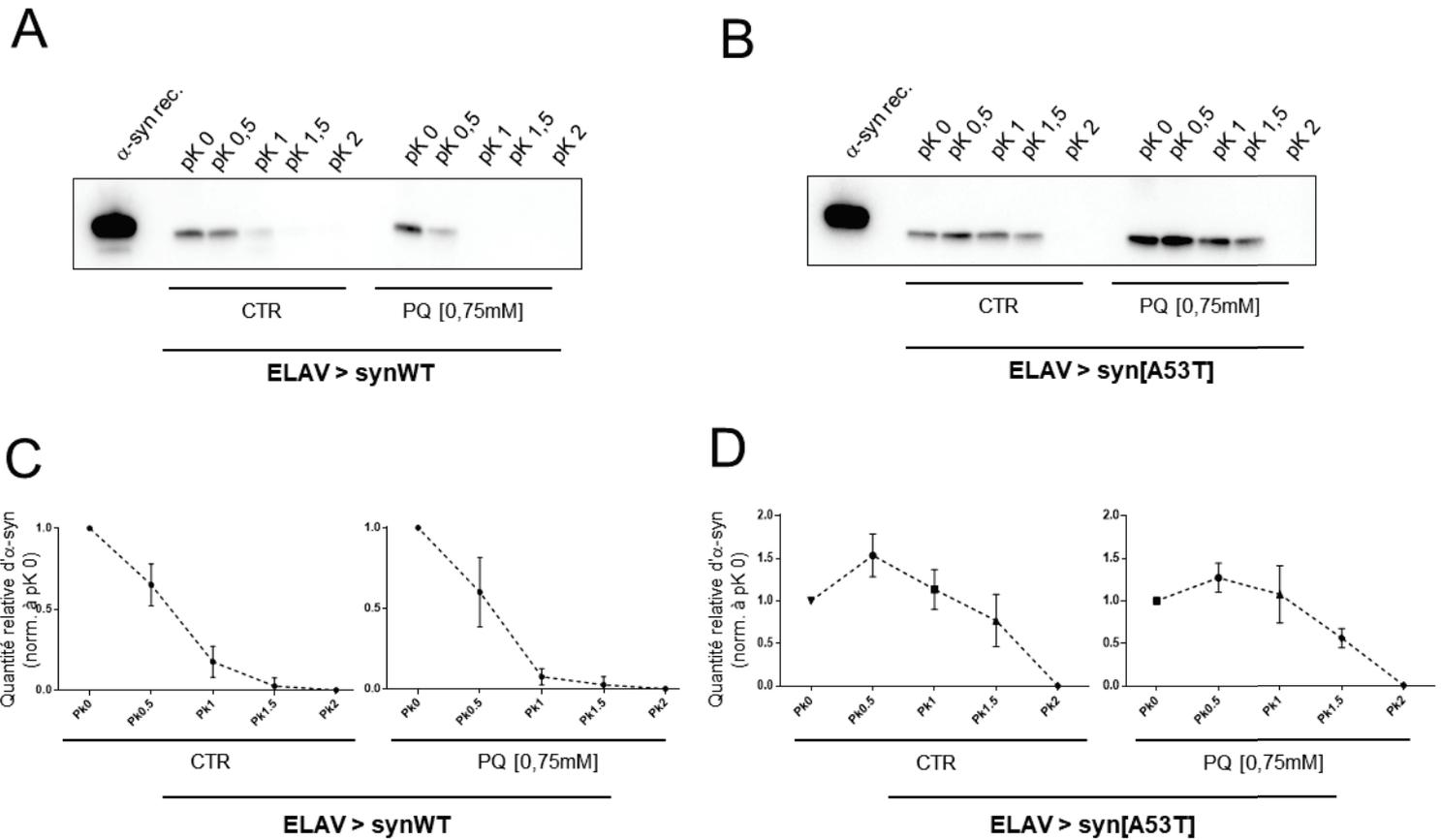


Figure 8. Une exposition chronique au paraquat ne modifie pas la résistance de l' α -synucléine, WT ou [A53T], à une digestion par la protéinase K

(A). Résistance de l' α -synucléine WT à une digestion par la protéinase K après 15 jours d'exposition chronique à [0,75mM] PQ ou en condition CTR en fonction de la concentration de protéinase K et mesurée par Western-blot avec l'anticorps MJFR1.

(B). Résistance de l' α -synucléine [A53T] à une digestion par la protéinase après 15 jours d'exposition chronique à [0,75mM] PQ ou en condition CTR en fonction de la concentration de protéinase K et mesurée par Western-blot avec l'anticorps MJFR1.

(C). Courbes de détection de l' α -synucléine WT en fonction de sa résistance à une digestion par la protéinase K après 15 jours d'exposition chronique à [0,75mM] PQ ou en condition CTR en fonction de la concentration de protéinase K et mesurée par Western-blot avec l'anticorps MJFR1. N=4 expériences indépendantes, avec 4x100 têtes ELAV>synWT en condition CTR et en condition [0,75mM] PQ.

(D). Courbes de détection de l' α -synucléine [A53T] en fonction de sa résistance à une digestion par la protéinase K après 15 jours d'exposition chronique à [0,75mM] PQ ou en condition CTR en fonction de la concentration de protéinase K et mesurée par Western-blot avec l'anticorps. N=7 expériences indépendantes, avec 7x100 têtes ELAV>syn[A53T] en condition CTR et en condition [0,75mM] PQ.

Après avoir suivi l'effet d'une exposition chronique au PQ sur un critère biochimique en lien avec l'agrégation de l' α -syn dans les têtes de Drosophiles, nous avons poursuivi cette description avec la détection éventuelle de l' α -syn phosphorylée en sérine 129 par IHC.

Identification de l' α -synucléine [A53T] phosphorylée en sérine 129 dans les Drosophiles exposées chroniquement au PQ

Nous avons tenté de détecter la forme l' α -syn Pser129 par la technique d'IHC avec deux anticorps différents, AB51253 et AB42906 sur des coupes de cerveaux de Drosophiles exposées chroniquement au PQ pendant 15 jours ou en condition contrôle (Figure 9). Ces deux anticorps spécifiques de l' α -syn phosphorylée permettent de mettre en évidence deux populations différentes d' α -syn Pser129 dans le cerveau des Drosophiles âgées (Figure 3, e' et f'). En condition contrôle et en condition d'exposition chronique au PQ, on observe un marquage de l' α -syn Pser129 dans le cerveau des Drosophiles avec l'anticorps 51253 (Figure 9, panel c). Ce marquage de l' α -syn Pser129 correspond aux structures neuronales où l' α -syn [A53T] est fortement détectée avec l'anticorps MFJR1 (Figure 9a), comme dans les ganglions sub-œsophagiens par exemple (Figure 3, panel c') ou dans les lobes antennaires (résultats non montrés). L' α -syn Pser129 est détectée dans les cerveaux de Drosophiles exposées chroniquement au PQ pendant 15 jours dans les mêmes structures neuronales (Figure 3, panel d) mais le marquage est plus dense, comme observée au niveau des ganglions sub-œsophagiens par exemple (Figure 3, panel d') ou dans les lobes antennaires (résultats non montrés). Il est à noter que le marquage obtenu dans les cerveaux de Drosophiles en condition contrôle ou exposées chroniquement au PQ pendant 15 jours est plus dense que le marquage observé dans les cerveaux de Drosophiles après 15 jours élevées sur un milieu nutritif composé d'agarose et de sucrose exposés ou non au PQ (Figure 9a) par rapport aux Drosophiles âgées de 10 jours élevées sur un milieu nutritif complet (Figure 3a). La détection de l' α -syn Pser129 avec l'anticorps AB42906 permet d'observer un marquage au niveau de la région péri-œsophagienne et dans le neuropil, dans une région arrière du cerveau des Drosophiles en condition contrôle (Figure 9, panels e et e'). Le marquage péri-œsophagien est similaire dans les cerveaux de Drosophiles exposées ou non au PQ pendant 15 jours (Figure 9, panels e' et f') mais il est plus dense que celui observé dans les cerveaux de Drosophiles âgées de 40 jours élevées sur milieu nutritif complet (Figure

3f). Le marquage dans le neuropil, dans une région arrière du cerveau des Drosophiles est plus large chez les Drosophiles exposées au PQ par rapport au marquage en condition contrôle (Figure 9, panels e' et f') et il rappelle celui observé dans le cerveau des Drosophiles âgées élevées sur milieu nutritif complet (Figure 3f). Ces résultats suggèrent que l'exposition chronique au PQ accélérerait l'apparition des deux populations d' α -syn Pser129

À la suite de la mise en évidence d'une surexpression l' α -syn [A53T] et de l'observation de formes phosphorylées en sérine 129 d' α -syn, WT ou [A53T], dans le cerveau de Drosophiles exposées chroniquement au PQ, nous avons souhaité comprendre si ces modifications de l' α -syn étaient en lien avec une altération de la voie de l'autophagie.

Figure 9

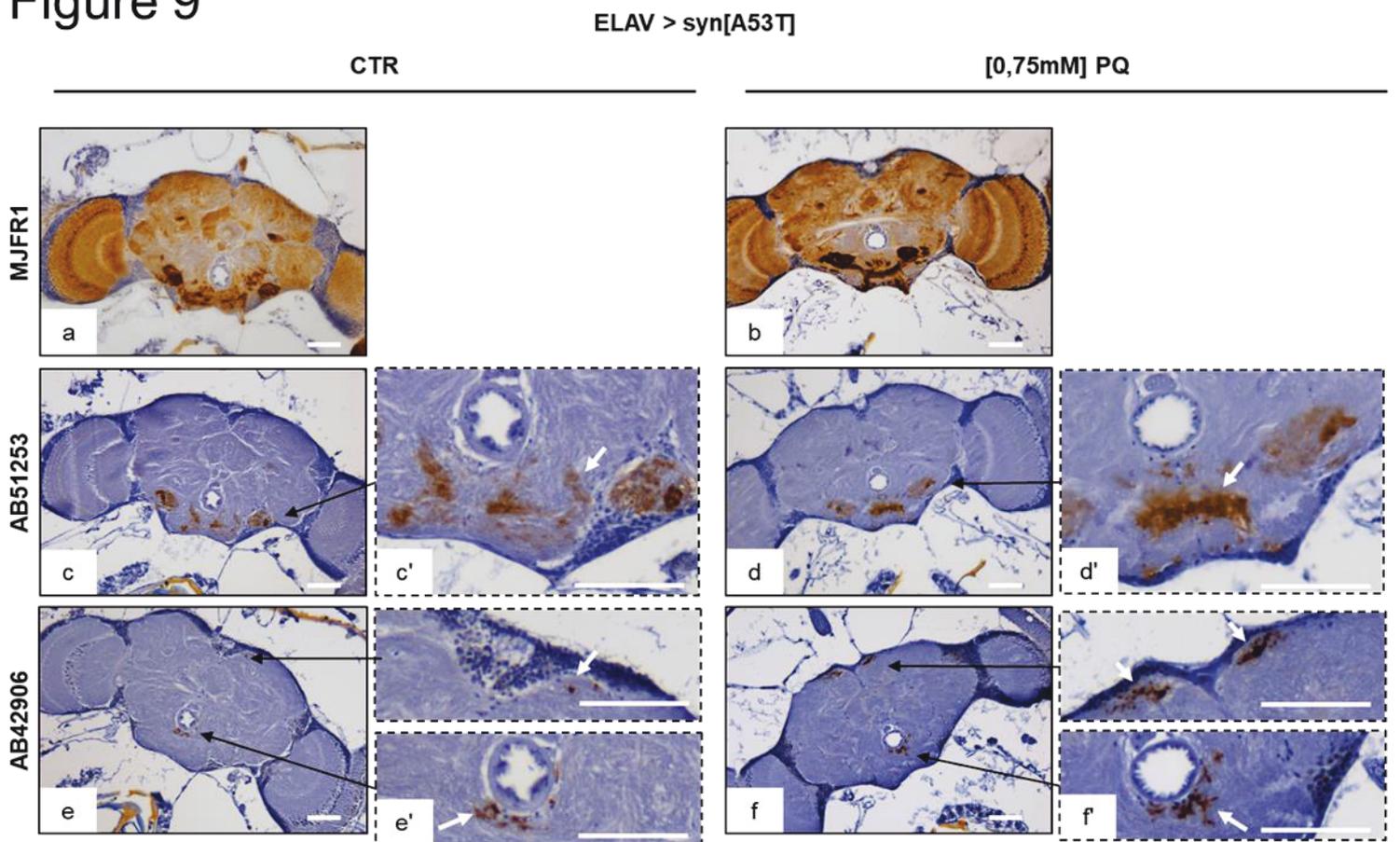


Figure 9. L' α -synucléine [A53T] est phosphorylée en sérine 129 chez les Drosophiles exposées au paraquat

Identification des structures neuronales exprimant le transgène UAS -syn[A53T] par immunohistochimie sous le contrôle du promoteur pan-neuronal ELAV dans les cerveaux de Drosophiles après 15 jours d'exposition chronique à [0,75mM] PQ (panels b, d et f) ou en condition contrôle (panels a, c et e) avec l'anticorps MJFR1 détectant l' α -synucléine totale (panels a et b) ou les anticorps Ab51253 (panels c et d) et Ab42906 (panels e et f) détectant l' α -synucléine phosphorylée en sérine 129. Observation au microscope optique, barre d'échelle = 50 μ m.

Altération de la voie de l'autophagie en lien avec l'expression de l' α -synucléine dans les Drosophiles exposées chroniquement au PQ

Nous avons pu observer des vacuoles d'autophagie dans les neurones photorécepteurs dans la rétine de Drosophiles exprimant l' α -syn, WT ou [A53T], ou la protéine GFP sous le contrôle du promoteur fort sGMR après 15 jours d'exposition chronique au PQ comme en condition contrôle par MET (Figure 10, astérisques rouges). Nous avons ensuite souhaité déterminer si la voie de l'autophagie était altérée sous l'effet d'une exposition chronique au PQ dans les rétines de notre modèle de Drosophile exprimant l' α -syn, WT ou [A53T], ou la protéine GFP sous le contrôle du promoteur ELAV (Figure 11). Pour cela nous avons détecté par immunofluorescence afin de déterminer si la protéine Ref(2)-P/p62 s'accumulait dans les rétines de Drosophiles (Figure 11A). Cette expérience permet d'observer une accumulation de la protéine Ref(2)-p/p62 dans les rétines des Drosophiles exposées de manière chronique au PQ par rapport à la condition contrôle (Figure 11B). En plus de la quantification de Ref(2)-p/p62 dans les rétines, ces expériences d'immunofluorescence ont permis d'observer que les marquages délimitent des structures de type organites dans les rétines de Drosophiles exprimant l' α -syn [A53T] en condition d'exposition chronique au PQ. Ce type de marquage qui pourrait correspondre à des vacuoles d'autophagie est uniquement observé pour cette condition et est représentatif de l'ensemble des échantillons étudiés (Figure 11A, zoom). Nous avons également réalisé une immuno-détection de la protéine Ref(2)-p/p62 extraite de têtes entières de Drosophiles exprimant l' α -syn, WT ou [A53T], et exposées chroniquement au PQ ou en condition contrôle (Figure 11C). Ce résultat conforte les observations d'immunofluorescence avec une accumulation de Ref(2)-p/p62 chez les Drosophiles exprimant l' α -syn, WT ou [A53T], en condition d'exposition au PQ par rapport à la condition contrôle. On peut également observer une accumulation de formes de hauts poids moléculaires détectées par western blot avec l'anti-Ref(2)-p dans les conditions PQ par rapport aux conditions contrôles, et d'autant plus pour les Drosophiles qui expriment la forme [A53T] par rapport à la forme WT de l' α -syn (Figure 11C).

Après avoir mis en évidence une accumulation de l' α -syn, totale et phosphorylée en sérine 129 mais également de Ref(2)-p/p62 sous l'effet d'une exposition chronique au PQ, nous avons souhaité comprendre si cela impactait le fonctionnement des neurones dopaminergiques ainsi que la locomotion des Drosophiles.

Figure 10

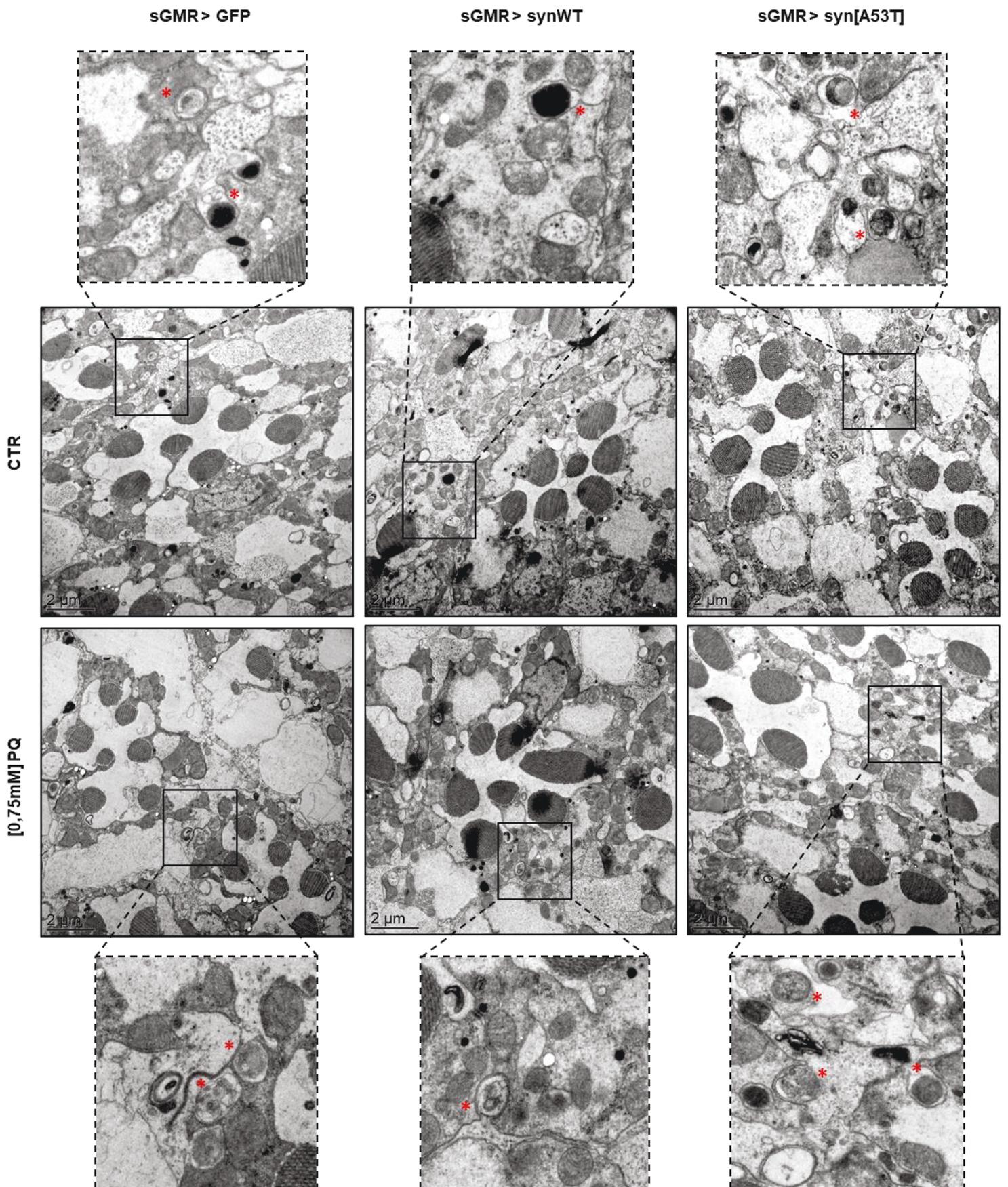


Figure 10. Des vésicules d'autophagie sont détectables chez les Drosophiles exposées chroniquement au paraquat

Observation de vésicules d'autophagie dans la rétine de Drosophiles exprimant le transgène ;UAS-GFP; ou ;;UAS-synWT ou ;;UAS-syn[A53T] dans les cellules des rétines sous le contrôle du promoteur sGMR-Gal4 après 15 jours d'exposition chronique à [0,75mM] PQ ou en condition contrôlée. Observation au microscope électronique à transmission, grossissement x2 650.

Figure 11

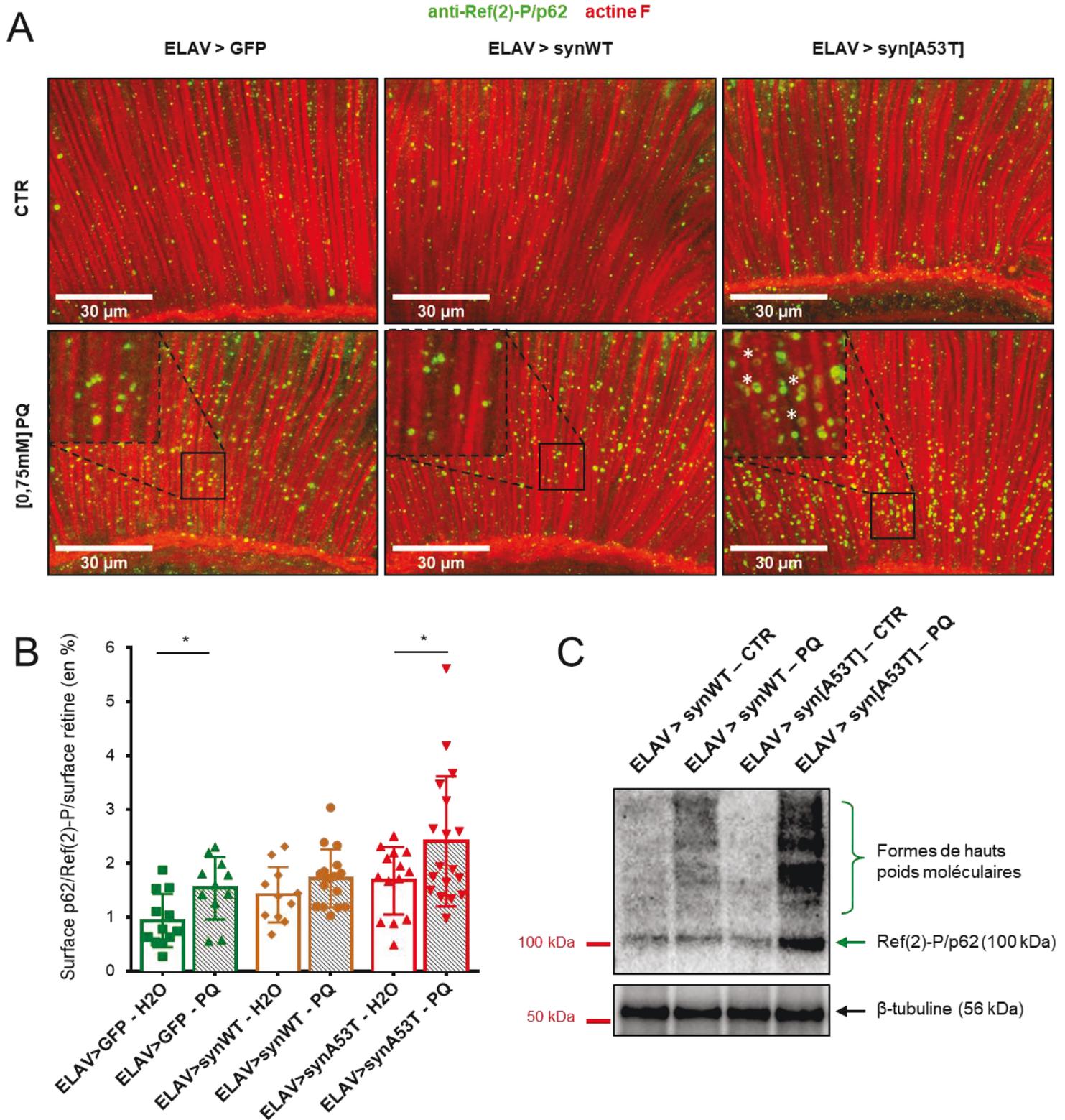


Figure 11. Des vésicules d'autophagie et la protéine Ref(2)-P/p62 s'accumulent chez les Drosophiles exprimant l' α -synucléine [A53T], mais pas WT, et exposées chroniquement au paraquat

(A). Détection de Ref(2)-P/p62 par immunofluorescence dans les rétines de Drosophiles exprimant le transgène UAS-GFP ou UAS-synWT ou UAS-syn[A53T] de manière pan-neuronale sous le contrôle du promoteur ;;ELAV-Gal4. Observation en microscopie confocale, grossissement x630.

(B). Quantification du panel B. Surface du marquage Ref(2)-P/p62 sur la surface de rétines de Drosophiles. Test statistique Mann-Whitney réalisé sur n=3 expériences indépendantes avec 11-18 rétines par condition.

(C). Détection de Ref(2)-P/p62 par Western-blot dans des extraits protéiques de têtes de Drosophiles ELAV>synWT ou ELAV>syn[A53T] après 15 jours d'exposition chronique à [0,75mM] PQ ou en condition CTR .

Altération du fonctionnement des neurones dopaminergiques et de la locomotion chez les Drosophiles exposées chroniquement au PQ

Parmi les marqueurs phénotypiques en lien avec la modélisation de la maladie de Parkinson chez la Drosophile, il est d'usage de mettre en évidence une atteinte de la locomotion en lien avec la perte ou le dysfonctionnement des neurones dopaminergiques (Feany et Bender 2000) (Cassar, et al. 2015) (Ordonez, Lee et Feany 2018) (Robin, et al. 2019). Nous avons d'abord suivi le fonctionnement des neurones dopaminergiques par qPCR en mesurant l'expression du gène qui code pour le transporteur responsable de l'entrée de la dopamine dans les vésicules synaptiques, *vmat* (vesicular mono-amine transporter) (Figure 12A). Cette expérience permet d'observer une diminution de l'expression de l'ARNm *vmat* après 15 jours d'exposition chronique au PQ par rapport aux conditions contrôles, que les Drosophiles expriment l' α -syn ou la GFP. Cette expérience met également en évidence que le niveau d'expression du gène *vmat* diminue significativement en condition contrôle chez les Drosophiles exprimant l' α -syn WT et encore plus pour l' α -syn [A53T] par rapport aux Drosophiles exprimant la protéine GFP (Figure 12A). Ces résultats sont en faveur d'une absence d'effets additifs entre l'expression de l' α -syn et d'une exposition chronique au PQ sur l'expression de l'ARN *vmat*. Pour identifier l'impact d'une exposition chronique au PQ sur le développement de potentiels symptômes moteurs, nous avons testé la locomotion des Drosophiles. Les résultats des tests de géotaxie négative indiquent que les Drosophiles exposées chroniquement au PQ ont un index de géotaxie négative réduit par rapport aux Drosophiles en condition contrôle, que les Drosophiles expriment l' α -syn ou la GFP. Ces résultats permettent également d'observer que les Drosophiles qui expriment l' α -syn WT et encore pour l' α -syn [A53T] ont un index de géotaxie négative plus élevé que celui des Drosophiles exprimant la protéine GFP en condition contrôle et également après 15 jours d'exposition chronique au PQ (Figure 12B). Dans ces conditions, il n'y a pas d'effets additifs entre l'expression de l' α -syn et d'une exposition chronique au PQ sur la locomotion des Drosophiles.

Figure 12

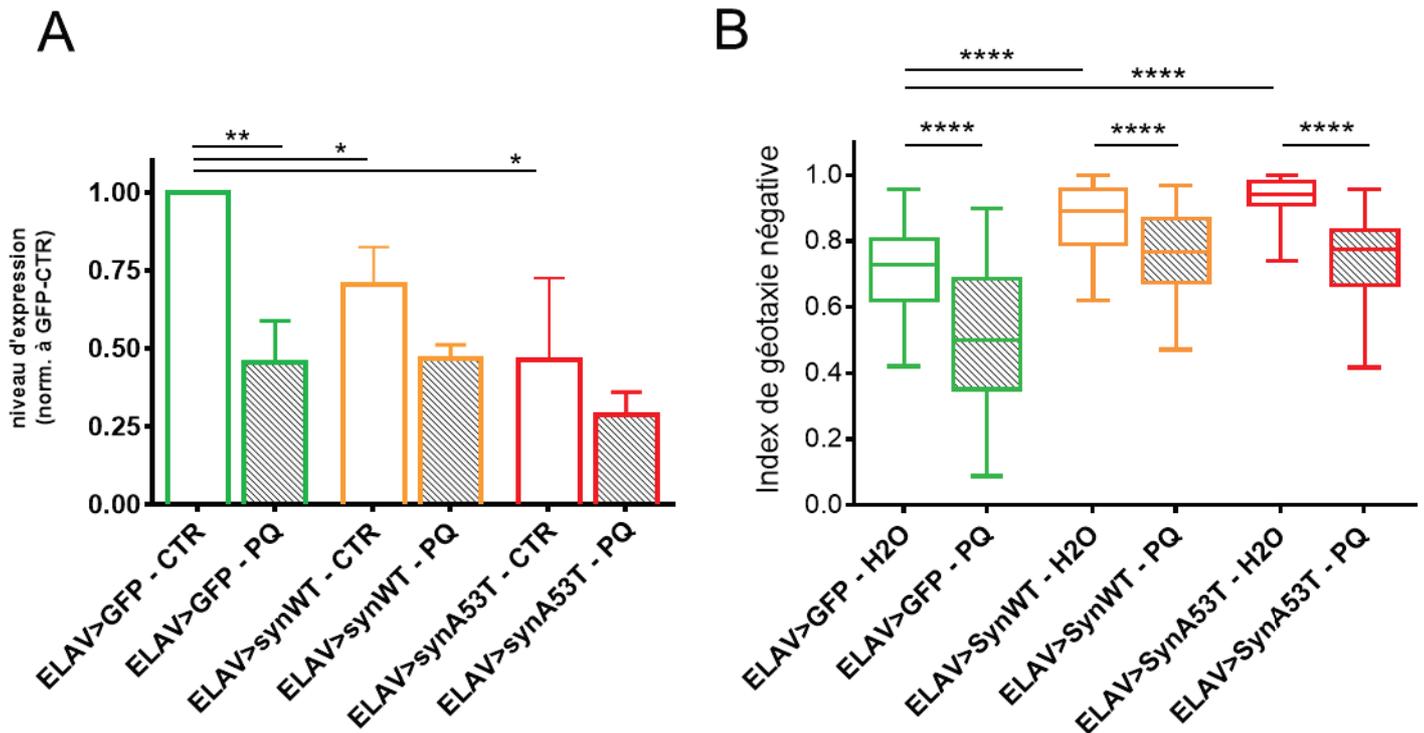


Figure 12. L'expression du gène *vmat* et la locomotion diminuent chez les Drosophiles exposées chroniquement au paraquat

(A) Niveau transcriptionnel du gène *vmat* qui code pour un transporteur de la dopamine mesuré par qPCR exprimé dans les têtes de Drosophiles ELAV>GFP ou ELAV>synWT ou ELAV>[A53T] après 15 jours d'exposition chronique à [0,75mM] PQ ou en condition contrôle et normalisé par rapport à la condition contrôle (n=3). T-test : * p-value < 0,1 ** p-value < 0.001

(B) Activité locomotrice des Drosophiles mesurée par test de géotaxie négative après 15 jours d'exposition chronique à [0,75mM] PQ et réalisée à partir de N=3 expériences indépendantes, avec 50 tests ELAV>GFP, 100 tests ELAV>synWT, 110 tests ELAV>syn[A53T] en condition contrôle et 50 tests ELAV>GFP, 90 tests ELAV>synWT et 210 tests ELAV>syn[A53T] en condition [0,75mM] PQ, avec 8 à 25 Drosophiles par test.

Test statistique Kruskal-Wallis : **** = p-value < 0.0001 et *** = p-value = 0.0001

Discussion

La mise en place d'un modèle mixte d'induction de la maladie de Parkinson avait pour but d'étudier l'impact d'une exposition chronique au PQ sur des Drosophiles exprimant la forme WT ou mutée [A53T] de l' α -syn humaine. Pour cela, nous avons étudié les marqueurs principaux de la maladie de Parkinson avec les méthodes utilisées dans les modèles d'induction génétique pour détecter l'agrégation et la forme phosphorylée en sérine 129 de l' α -syn, ainsi qu'avec les méthodes utilisées dans les modèles d'induction chimique au paraquat pour mesurer la survie des Drosophiles exposées. Grâce à ces méthodes, nous avons pu mettre en évidence que les Drosophiles exprimant l' α -syn [A53T] ont une durée de vie moyenne réduite et donc qu'elles sont plus sensibles au PQ. Ces méthodes nous ont également permis d'observer que ces Drosophiles présentent dans leurs neurones une accumulation d' α -syn, de sa forme phosphorylée en sérine 129 et d'inclusions cytoplasmiques à la suite d'une exposition chronique au PQ et pour la première fois, l' α -syn Pser129 a été révélé après démasquage antigénique par IHC chez la Drosophile. Ces résultats montrent que l'exposition chronique au PQ promeut l'accumulation globale et de la forme pathologique Pser129 de d' α -syn. De manière intéressante, l'accumulation d' α -syn phosphorylée induite par le PQ détectée par IHC est mise en évidence dans des régions différentes du cerveau avec deux anticorps. Cette accumulation est similaire entre les Drosophiles âgées de 40 jours et celles exposées au PQ pendant 15 jours, ce qui suggère que le PQ pourrait accélérer l'évolution de la pathologie induite par l'expression de l' α -syn [A53T]. Nous pouvons également conclure que la survie des Drosophiles, la détection de l' α -syn totale et phosphorylée en sérine 129 par immunohistochimie et de l'accumulation de Ref(2)-P/p62 par immunofluorescence sont des bons marqueurs pour suivre l'impact d'une exposition chronique au PQ sur des Drosophiles exprimant l' α -syn humaine. L'identification de ces marqueurs valide ainsi l'utilisation du modèle mixte d'induction de la maladie de Parkinson que nous avons mis en place et conforte la poursuite de notre étude afin d'identifier des mécanismes pathologiques sous-jacents.

Survie des Drosophiles exprimant l' α -synucléine [A53T] et exposées chroniquement au paraquat

La cinétique de survie des Drosophiles exposées chroniquement à 0,75 mM de PQ nous a permis d'observer une durée de vie moyenne plus réduite pour les Drosophiles exprimant l' α -syn [A53T] que pour celles exprimant l' α -syn WT ou la GFP (Figure 7B). Nous pouvons conclure que l'expression de l' α -syn [A53T] rend les Drosophiles plus sensibles à une exposition chronique au PQ. La mise en évidence de cette sensibilité accrue valide l'utilisation de la survie en tant que marqueur pour évaluer l'effet d'une exposition chronique au PQ sur les Drosophiles exprimant l' α -syn. Cette expérience est fondamentale pour valider l'utilité de ce modèle d'induction mixte et son apport par rapport aux modèles d'induction génétique ou chimique. En effet, elle met en évidence un effet synergique entre l'expression de l' α -syn [A53T] et d'une exposition chronique au PQ. Plus précisément, l'expression seule de l' α -syn [A53T] n'a pas d'effet sur la durée de vie moyenne des Drosophiles, comme l'expression seule de la GFP (Figure 6A), mais une exposition chronique au PQ affecte davantage les Drosophiles exprimant l' α -syn [A53T]. Ce résultat est d'autant plus fort que cette sensibilité accrue de la population de Drosophiles exprimant l' α -syn [A53T] est très homogène avec une valeur de pente de la courbe de survie qui est plus forte que celles des Drosophiles exprimant l' α -syn WT ou la GFP (Figure 6C). Ce résultat permet d'attester de la robustesse du protocole d'induction mixte que nous avons mis en place car les résultats varient très peu entre et au sein des expériences indépendantes que nous avons menées sur un nombre élevé de Drosophiles. Les résultats que nous avons obtenus pourraient être interprétés dans le cadre d'une étude qui pointent le rôle du récepteur DAMB pour *D1-like dopamine receptor* dans la toxicité d'une exposition aiguë à 20 mM de PQ avec une durée de survie rallongée chez les Drosophiles déficientes pour ce récepteur (Cassar, et al. 2015). L'implication du récepteur DAMB dans la sensibilité accrue des Drosophiles exprimant l' α -syn [A53T] à une exposition chronique à 0,75 mM de PQ pendant 15 jours pourrait être testée avec des Drosophiles déficientes pour DAMB et exprimant une des formes WT ou [A53T] de l' α -syn.

Surexpression de l' α -synucléine [A53T] dans les Drosophiles exposées chroniquement au paraquat

La détection de l' α -syn [A53T] est plus étendue dans le cerveau des Drosophiles en condition contrôle élevées sur un milieu composé d'agarose et de sucrose pendant 15 jours (Figure 9a) que dans le cerveau des Drosophiles âgées de 40 jours et élevées sur un milieu nutritif complet (Figure 3b). Il semble donc que la composition du milieu nutritif des Drosophiles soit directement impliquée dans l'accumulation de l' α -syn [A53T]. Cette observation pourrait être en lien avec une modification du métabolisme des Drosophiles en fonction de leur régime alimentaire. En effet, la composition, et notamment en glucose, du milieu nutritif serait un facteur aggravant lors d'une exposition chronique au PQ comme cela été démontré chez la souris (Anandhan, et al. 2017).

De manière intéressante, l'augmentation du niveau de l'ARNm de syn WT n'est pas retrouvée au niveau protéique après 15 jours d'exposition chronique au PQ alors que ces niveaux d'ARNm et de protéine sont retrouvés de manière similaire pour l' α -syn [A53T] (Figure 7A et 7B). Ce résultat n'est pas retrouvé chez les Drosophiles exprimant la protéine contrôle GFP dont le niveau d'ARNm diminue lors d'une exposition chronique au PQ (résultats non montrés). Ces résultats semblent indiquer que des mécanismes de régulation de l'ARNm et/ou de dégradations protéiques tels que le protéasome ou l'autophagie parviennent à maintenir le niveau protéique de l' α -syn WT mais pas de l' α -syn [A53T] lors d'une exposition chronique au PQ. Bien que ce résultat préliminaire nécessite de répéter la mesure des niveaux d'ARNm par qPCR, il est cohérent avec l'effet direct du PQ sur l'accumulation d' α -syn [A53T] qui a été mis en évidence dans un modèle de souris exposée chroniquement (Norris, et al. 2007). Afin de s'assurer que les sites d'insertion des transgènes codant pour la GFP, sur le chromosome 2, ou pour l' α -syn, sur le chromosome 3, n'interviennent pas dans cette modulation de la transcription, il serait nécessaire de réaliser cette même expérience mais sur des Drosophiles dont le transgène aura été inséré au même site dans leur génome.

Agrégation de l' α -synucléine dans les Drosophiles exposées chroniquement au paraquat

Nous avons pu mettre en évidence une agrégation de l' α -syn [A53T] dans les cerveaux de Drosophiles âgées en observant une perte de son immuno-détection par immunofluorescence (Figure 2A) ainsi qu'une insolubilité (Figure 2B) et un profil de résistance à une digestion par la pK (Figure 2C) augmentés par rapport aux Drosophiles jeunes. Une exposition chronique au PQ n'induit pas de modification significative de la résistance à une digestion par la pK de l' α -syn [A53T] (Figure 8C). A l'échelle de l'organisme entier, et plus particulièrement de la tête des Drosophiles, l'agrégation de l' α -syn [A53T] n'est pas modifiée sous l'effet d'une exposition chronique au PQ. Une autre étude met également en évidence une absence d'effet d'une exposition à une dose aigüe de roténone sur l'agrégation de l' α -syn chez la Drosophile (Prasad, et al. 2019). Cependant, nos résultats sont contradictoires avec d'autres études qui suggèrent que le PQ induit une accélération de l'agrégation de l' α -syn *in vitro* et la détection d'agrégats chez la souris avec un co-marquage de l' α -syn et de la thioflavine S (Manning-Bog, et al. 2002). Dans ce contexte où des résultats contradictoires sont obtenus en fonction des modèles animaux et des doses d'inducteurs chimiques de la MP, il est important de rappeler que plusieurs études récentes supportent l'effet toxique de formes solubles, monomériques ou oligomériques, de l' α -syn plutôt que l'implication des corps de Lewy et des formes insolubles agrégées (Bengoa-Vergniory, et al. 2017). Cette absence de modification de la résistance à une digestion par la pK dans notre modèle exposée par rapport au modèle de vieillissement pourrait être le reflet d'une déstabilisation des agrégats d' α -syn [A53T] en faveur de formes solubles. D'autre part, ce résultat pourrait également reposer sur une relocalisation de l' α -syn [A53T] qui serait alors plus accessible par la pK sous l'effet d'une exposition au PQ que lors d'un vieillissement des Drosophiles. En effet, la toxicité du PQ vient de sa capacité à provoquer la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) de type anions superoxydes lors de son recyclage redox. Ces ROS provoquent des dégâts cellulaires avec, par exemple, la peroxydation des lipides membranaires. L' α -syn qui a la capacité d'interagir avec les lipides membranaires via son domaine amphipatique en région N-terminale serait alors relocalisée dans le cytoplasme, sous forme soluble. L'implication des ROS dans notre modèle n'est pas à négliger car elles induisent la peroxydation des lipides ainsi que l'accumulation de protéines mal conformées qui peuvent activer la voie de l'autophagie, voire la saturer. Ces ROS pourraient également avoir un effet inhibiteur direct sur la voie de l'autophagie. En effet,

il serait intéressant de tester la prise en charge de l' α -syn [A53T] par l'autophagie dans notre modèle de Drosophiles exposées chroniquement à une dose faible de PQ. Il est à noter que chez la Drosophile, la CMA n'existe pas car la protéine LAMP-2A n'est pas exprimée. Il a été montré que l'eMI, pour *endosomal microautophagy*, est capable de prendre en charge la dégradation de l' α -syn humaine (Issa, et al. 2018). Une expérience de sauvetage du phénotype de notre modèle de Drosophiles exposées chroniquement au PQ avec l'induction de la eMI ou de la CMA, grâce à l'expression du transgène humain LAMP-2A, pourrait nous informer sur les conséquences de l'expression de l' α -syn [A53T] et d'une exposition au PQ sur la dégradation de la protéine par ces voies.

Détection de la forme phosphorylée en sérine 129 de l' α -synucléine [A53T] dans les Drosophiles exposées chroniquement au paraquat

Pour la première fois chez la Drosophile, nous avons mis en évidence par IHC la présence d' α -syn phosphorylée en sérine 129 dans les cerveaux (Figure 9). La détection de la forme phosphorylée en sérine 129 de l' α -syn est un critère important pour la modélisation de la MP en laboratoire, ce qui valide notre modèle et nos méthodes d'induction et de détection. En effet, la détection de la Pser129 α -syn est un des critères principaux d'identification des corps de Lewy chez l'Homme. Cette α -syn pathologique est également retrouvée dans d'autres modèles d'induction de la MP chez la Drosophile par Western blot mais elle n'avait pas été mise en évidence *in situ* par immunohistochimie (Chen et Feany 2005). L' α -syn phosphorylée en sérine 129 est détectée dans les cerveaux de Drosophiles, et notamment au niveau des lobes antennaires, des ganglions sub-œsophagiens et des « mushroom bodies » avec l'anticorps AB51253 (Figure 9). Ces structures neuronales sont des lieux d'accumulation de l' α -synucléine totale, ce qui suggère qu'une forte concentration d' α -synucléine pourrait favoriser sa phosphorylation en sérine 129. Cette phosphorylation en lien avec l'accumulation d' α -syn pourrait correspondre à un signal d'adressage vers les systèmes de dégradation des protéines et notamment vers le protéasome comme le suggère plusieurs études (Bennett, et al. 1999) (Azeredo da Silveira, et al. 2009) (Xilouri, Brekk et Stefanis 2012). Une autre population d' α -syn phosphorylée en sérine 129 a été détectée avec l'anticorps AB42906 dans la région péri-œsophagienne et dans le neuropil, dans une région dorso-latérale du cerveau des Drosophiles (Figure 9). Cette région dorso-latérale pourrait correspondre aux

neurones DN1a et DN1p qui sont des neurones « clock », impliqués dans le contrôle du cycle circadien (Nässel 2018). Afin d'identifier la nature des neurones où s'accumule cette population d' α -syn Pser129, il sera nécessaire de réaliser des co-marquages par IHC entre la Pser 129 et un des marqueurs spécifiques de ces neurones « clock », le marqueur *period*. Le cluster de neurones DN1p est associé à des neurones exprimant la cycline A qui est principalement décrite pour son implication dans le contrôle du cycle cellulaire mais qui est également impliquée dans la régulation du sommeil dans les neurones post-mitotiques chez la Drosophile (Rogulja et Young 2012). Il a été mis en évidence, chez l'Homme comme chez la Drosophile, que le sommeil est affecté chez les patients dès la phase pré-symptomatique et dans des modèles d'inductions génétiques ou chimiques de la MP chez la Drosophile (Barber, et al. 2017) (Gajula Balija, et al. 2011). Mesurer les cycles de veille et de sommeil des Drosophiles de notre modèle pourrait compléter sa caractérisation. L'existence de plusieurs populations d' α -syn phosphorylée en sérine 129 est supportée par une étude de 2016 qui a mis en évidence différentes « souches » d' α -syn Pser129 extraite de cerveau de souris et dont l'interaction avec les lipides membranaires, la localisation cellulaire ou la toxicité étaient spécifiques pour chaque souche (Ma, et al. 2016). La détection plus importante de l' α -syn Pser129 avec l'anticorps AB51253 dans les cerveaux de Drosophiles de 15 jours exposées chroniquement au PQ (Figure 9d') par rapport aux Drosophiles de 40 jours (Figure 3d') pourrait suggérer une accélération du phénomène sous l'effet du PQ. Il est également plausible que l'augmentation du marquage Pser129 repose uniquement sur l'accumulation de l' α -syn [A53T] lors d'une exposition chronique au PQ et non sur une accélération de l'apparition de cette phosphorylation en sérine 129.

Fonctionnement de l'autophagie dans les Drosophiles exprimant l' α -synucléine [A53T] et exposées chroniquement au paraquat

Nous avons mis en évidence qu'une exposition au PQ induisait la surexpression de l' α -syn [A53T] et l'accumulation de la forme phosphorylée en sérine 129 dans le cerveau des Drosophiles. Ces résultats suggèrent que le fonctionnement de l'autophagie pourrait être impacté négativement dans les neurones de Drosophiles exposées chroniquement au PQ. Afin de tester cette hypothèse, nous avons évalué le flux de l'autophagie qui peut être suivi avec l'accumulation de la protéine Ref(2)-P/p62, un récepteur de l'autophagie

qui est dégradé en condition de flux fonctionnel de l'autophagie (Nezis, et al. 2008) (Nilangekar, et al. 2019) (Jacomín et Nezis 2019). L'accumulation de Ref(2)-P/p62 observée par immunofluorescence (Figure 11B) et par Western-blot (Figure 11C) chez les *Drosophiles* exprimant l' α -syn [A53T] après 15 jours d'exposition chronique au PQ suggère que l'expression de la forme [A53T] de l' α -syn impacte négativement le flux de l'autophagie dans des conditions d'exposition chronique au PQ. Les vacuoles d'autophagie que nous avons observées par MET suggère à minima l'activation de l'autophagie basale chez les *Drosophiles* exposées chroniquement au PQ (Figure 10). Bien que la MET soit une méthode principalement qualitative pour une observation ultra-structurale, il serait nécessaire de réaliser une quantification des vacuoles d'autophagie en fonction des conditions de génotypes et d'exposition au PQ. Les vacuoles d'autophagie observées au MET ne nous permettent pas de déterminer à quel niveau l'autophagie serait inhibée. L'étape limitante pourrait être son initiation, la fusion entre les lysosomes et autophagosomes ou encore l'activité des enzymes lysosomales. En effet, un blocage de l'autophagie a été mis en évidence dans la rétine d'un modèle de souris TgM83 exprimant l' α -syn [A53T] humaine et de manière corrélée avec l'accumulation de la forme Pser129 de l' α -syn (Mammadova, et al. 2019). Ce blocage a également été mis en évidence dans des modèles de lignée cellulaire et chez la souris où l'expression de l' α -syn induisait une inhibition de la protéine Rab1, impliquée dans le trafic des vésicules intracellulaires dont les lysosomes (Winslow, et al. 2010) (Shi, Shi et Xu 2017). De plus, un blocage de l'autophagie par la bafilomycine A a été associé à une sécrétion d' α -syn oligomérique, induisant ainsi un micro-environnement pro-inflammatoire délétère pour la lignée cellulaire de neurogliome H4 et favorisant la transmission « prion-like » de l' α -syn (Poehler, et al. 2014). La diminution du nombre de lysosomes dans le cytoplasme des neurones dopaminergiques de souris exposées au MPTP mais également la perméabilisation de ces membranes lysosomales sous l'effet des ROS induites par le MPTP dans un modèle de la MP a induit une diminution de l'efficacité des enzymes lysosomales ainsi que leur relargage dans le cytoplasme (Dehay, et al. 2010). De plus, de nombreux niveaux de régulations sont impliqués dans le processus d'autophagie qui est crucial pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. Pour cette raison, il serait nécessaire d'étudier la régulation des nombreux acteurs cellulaires qui sont responsables de l'activation de l'autophagie avec l'expression de la protéine Ref(2)-P/p62 par exemple (Du, Wooten et Wooten 2009) (Song, et al. 2017), du flux (Jacomín, Bescond, et al. 2015)

(Navarro-Yepes, et al. 2016) (Pascua-Maestro, et al. 2017) mais également de l'arrêt de ce processus (Jacomin, Taillebourg et Fauvarque 2018). Afin de compléter ces résultats et de tester l'activité lysosomale dans les vésicules d'autophagie, il faudra utiliser la construction génétique mCherry-GFP-LC3 (Robin, et al. 2019) (Maruzs, et al. 2019). Cette protéine de fusion est composée de deux protéines fluorescentes et de la protéine LC3/Atg8 qui est localisée à la membrane des vésicules d'autophagie. Cette protéine de fusion émet dans le vert avec la protéine GFP et dans le rouge avec la protéine mCherry donc la protéine de fusion apparaît en jaune à la membrane des autophagosomes. La fluorescence de la protéine GFP est perdue sous l'effet des conditions de pH où les enzymes lysosomales sont actives donc la protéine de fusion apparaît en rouge à la membrane des autolysosomes fonctionnels. Une fluorescence rouge de la protéine de fusion mCherry-GFP-LC3 révèle une bonne fusion entre l'autophagosome et le lysosome ainsi qu'une bonne activité lysosomale. A l'inverse, une fluorescence jaune révèle que la vésicule d'autophagie est restée au stade d'autophagosome, avant la fusion avec le lysosome, ou bien que la vésicule d'autophagie soit au stade d'autolysosome mais dont l'activité lysosomale est altérée.

Expression transcriptionnelle du transporteur de la dopamine, *vmat*, et activité locomotrice des Drosophiles exprimant l' α -synucléine et exposées chroniquement au paraquat

Nos résultats de qPCR ont permis de mettre en évidence qu'une diminution de l'expression du gène *vmat* était mesurée sous l'effet d'une exposition chronique au PQ et que cela était corrélé avec une diminution de l'index de géotaxie négative des Drosophiles (Figure 12). Nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence d'effet additif entre l'expression de l' α -syn et une exposition chronique au PQ des Drosophiles sur les niveaux d'ARNm de *vmat*. Cette absence d'effet additif pourrait être due au fait que notre analyse a été effectuée chez des Drosophiles seulement âgées de 15 jours, âge auquel les effets de l'expression de l' α -syn ne sont pas encore détectés (Fouillet, et al. 2012). Le suivi de la perte des neurones dopaminergiques avec la diminution de l'expression du transporteur de la dopamine *vmat* par qPCR ne permet pas de déterminer si son expression est réduite dans l'ensemble des neurones dopaminergiques ou bien si son expression reste constante mais que la quantité d'ARNm totale diminue du fait d'une mortalité d'une partie de ces

neurones. Des expériences de détection des neurones dopaminergiques par immunofluorescence permettraient de dénombrer directement les neurones dopaminergiques dans les cerveaux de Drosophiles (Navarro, et al. 2014). Les expériences de locomotion des Drosophiles en condition d'exposition chronique au PQ n'ont pas permis de mettre en évidence un effet additif entre l'expression de l' α -syn et l'effet du PQ. Comme précédemment publié, un test de géotaxie négative réalisé après 15 jours n'avait pas permis de mettre en évidence l'effet de l'expression de l' α -synucléine seule dans un modèle de Drosophile mais seulement à partir de 3 semaines (Fouillet, et al. 2012). Effectuer une cinétique plus tardivement qu'à la survie moyenne des Drosophiles pourrait permettre de mettre en évidence une vitesse d'apparition des défauts locomoteurs différentielle en fonction du génotype des Drosophiles exposées chroniquement au PQ. Il est également à noter que le résultat de ces expériences de géotaxie négative met en évidence que la locomotion des Drosophiles exprimant l' α -syn, WT ou [A53T], est meilleure que celles des Drosophiles exprimant la GFP en condition contrôle à 15 jours. Ce niveau de base qui est plus haut pour les Drosophiles exprimant l' α -syn, WT ou [A53T], pourrait expliquer l'absence de détection d'un effet de l' α -syn par rapport à la GFP sur la locomotion en condition exposée au PQ à 15 jours. Ce niveau de base est plus haut pour les Drosophiles exprimant l' α -syn, WT ou [A53T], pourrait être dû à une meilleure activité neuronale supportée par l' α -syn. En effet, l' α -syn est impliquée dans la stabilisation et le recyclage des vésicules contenant les neurotransmetteurs, et notamment la dopamine, dans les neurones présynaptiques (Burré 2015) (Butler, Sambo et Khoshbouei 2017) (Sulzer et Edwards 2019).

Perspectives

Nos résultats montrent l'accumulation de forme phosphorylée de l' α -syn [A53T] en présence de PQ mais pas l'accumulation de formes agrégées résistantes à une digestion par la pK. Cela pourrait être due à l'apparition locale de forme pK résistantes qui ne seraient pas détectées par une approche western blot sur des extraits protéiques réalisés à partir de têtes entières. L'agrégation de l' α -syn sur le critère de sa résistance à une digestion par la protéinase K pourrait ainsi être évaluée localement sur des coupes de cerveaux par IHC afin de mettre en évidence différentes populations locales d' α -syn. Ces différentes populations d' α -syn pourrait également être caractérisée sur la présence d'une phosphorylation en sérine 129 par exemple (Manning-Bog, et al. 2002) (Ma, et al. 2016).

L'implication du blocage de l'autophagie dans le développement de marqueurs de la maladie de Parkinson chez ces Drosophiles pourrait être testée avec une mutation nulle des gènes Atg8/LC3 ou Atg1 qui serait combinée à la construction génétique initiale et exposée chroniquement au PQ. En effet, dans le cas où le développement de marqueurs de la MP reposerait sur le blocage de l'autophagie, les mutations nulles Atg8/LC3 ou Atg1 n'induiraient pas d'accumulation supplémentaire de Ref(2)-P/p62 lors d'une exposition chronique au PQ de Drosophiles exprimant la forme mutée [A53T] de l' α -syn. Cette stratégie pourrait permettre d'identifier les mécanismes cellulaires sur lesquels repose la toxicité d'une exposition chronique au PQ en parallèle de l'expression de l' α -syn (Huang, et al. 2012) (Nagy, et al. 2015) (C. Chen, et al. 2019).

Ce modèle d'induction mixte chez la Drosophiles pourrait être décliné avec d'autres inducteurs chimiques de la maladie de Parkinson qui ont été identifiés à ce jour. En effet, certains mécanismes ont été décrits pour leur implication dans le développement de la MP grâce à l'utilisation de doses aiguës de PQ, de roténone ou encore de MPTP mais les mécanismes mis en jeu lors d'une exposition chronique et faible pourraient être différents (Richardson, et al. 2005). Pour aller plus loin, ce modèle mixte avec une exposition faible et chronique pourrait être utilisé en tant que test de toxicité afin de s'assurer de la faible toxicité de nouveaux produits phytosanitaires avant leur mise sur le marché. En effet, notre étude avait également pour objectif de proposer un

modèle de Drosophiles et des méthodes pour l'évaluation de la toxicité de molécules phytosanitaires en lien avec l' α -syn. Parmi les produits que nos collaborateurs de l'Anses ont pour but de tester dans notre modèle, on peut citer le glyphosate, la roténone, le cyprodinil, le pyriméthanil ou le fludioxonil (Coleman, et al. 2012). A l'inverse, des molécules pourraient être testées afin d'évaluer leur action potentiellement thérapeutique ou modificatrice de la MP. Ces criblages de première intention pourraient être mis en place à moyenne échelle sur la Drosophile avant d'être validés sur un modèle Mammifère.

RESUME DE THESE

La maladie de Parkinson (MP) est caractérisée par l'agrégation de l' α -synucléine (α -syn) et la dégénérescence sélective des neurones dopaminergiques associée à des défauts locomoteurs. L'étiologie de la MP reste incomplète à ce jour mais ses origines multifactorielles impliquent à la fois des facteurs génétiques et environnementaux. La caractérisation de modèles d'induction mixte de la MP permettrait d'élucider les effets toxiques d'une exposition chronique à un agent chimique sur les mécanismes favorisant l'agrégation de l' α -syn. Dans cette étude, notre objectif était de caractériser les effets d'une exposition chronique au paraquat (PQ) de Drosophiles exprimant une des formes, WT ou mutée [A53T], de l' α -syn humaine dans l'ensemble des neurones.

Nous avons mis en évidence que les Drosophiles exprimant l' α -syn [A53T] sont plus sensibles à une exposition chronique au PQ et que cette sensibilité accrue reposerait sur une accumulation d' α -syn et notamment de sa forme pathologique, phosphorylée en sérine 129. La détection de vacuoles d'autophagie et l'accumulation de la protéine Ref(2)-P/p62 reflèteraient un blocage du flux de l'autophagie chez les Drosophiles exprimant l' α -syn [A53T] en condition d'exposition chronique au PQ.

La prise en compte les aspects génétiques et environnementaux impliqués dans le développement de la maladie de Parkinson permet de modéliser les cas sporadiques qui représentent près de 90% des patients. Des études plus approfondies utilisant ce modèle mixte permettraient de décrire les mécanismes cellulaires mis en jeu lors d'une exposition chronique à un contaminant de l'environnement et donc d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour lutter contre la maladie de Parkinson.

Mots-clés : maladie de Parkinson, Drosophiles, α -synucléine WT, α -synucléine [A53T], paraquat, exposition chronique, induction mixte, α -synucléine Pser129.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is mainly characterized by the aggregation of α -synuclein (α -syn) into Lewy bodies and the selective degeneration of dopaminergic neurons associated with locomotor defects. The etiology of PD is still incomplete, but its multifactorial origins involve genetic and environmental stress factors. The characterization of animal models expressing human α -syn exposed to pesticides is essential for the identification of the mechanisms underlying the aggregation of α -syn upon chemical exposure. In this study, our goal was to characterize the effects of chronic paraquat (PQ) exposure on *Drosophila* expressing the WT or mutated [A53T] form of α -syn in all neurons.

We showed that the expression of α -syn [A53T] increased the sensitivity to chronic exposure to PQ. In addition, PQ induced α -syn accumulation, especially the pathological form, phosphorylated on serine 129. We also found autophagic vacuoles associated with Ref(2)-P/p62 protein accumulation suggesting an impaired autophagic flux in *Drosophila* expressing α -syn [A53T] under chronic PQ exposure.

By taking into account the genetic and environmental aspects, our approach will allow to identify the main factors responsible for the development of PD in the sporadic cases that represent nearly 90% of patients. Further studies based on this model will allow to explore potential therapies for PD treatment.

Keywords: Parkinson's disease, *Drosophila*, α -synuclein WT, α -synuclein [A53T], paraquat, chronic exposure, mixed induction, α -synuclein Pser129.

Bibliographie

- Abdollahi, M., A. Ranjbar, S. Shadnia, S. Nikfar, et A. Rezaie. «Pesticides and oxidative stress: a review.» *Medical Science Monitor*, 2004: 10(6), Jun,pp. RA141-147.
- Adams, MD, et al. «The genome sequence of *Drosophila melanogaster*.» *Science*, 2000: Mar 24;287(5461):2185-95.
- Afsari, F, et al. «Abnormal visual gain control in a Parkinson's disease model.» *Human Molecular Genetics*, 2014: Sep 1;23(17):4465-78. .
- Aharon-Peretz, J, H Rosenbaum, et R Gershoni-Baruch. «Mutations in the Glucocerebrosidase Gene and Parkinson's Disease in Ashkenazi Jews.» *N Engl J Med.*, 2004: 351:1972-1977.
- Ahmed, H, AI Abushouk, M Gabr, A Negida, et MM Abdel-Daim. «Parkinson's disease and pesticides: A meta-analysis of disease connection and genetic alterations.» *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2017: Jun;90:638-649.
- Alexopoulou, Z, et al. «Deubiquitinase Usp8 regulates α -synuclein clearance and modifies its toxicity in Lewy body disease.» *PNAS*, 2016: Aug 9; 113(32): E4688–E4697.
- Anandhan, A, et al. «Glucose Metabolism and AMPK Signaling Regulate Dopaminergic Cell Death Induced by Gene (α -Synuclein)-Environment (Paraquat) Interactions.» *Journal of Molecular Neuroscience*, 2017: 54(5):3825-3842.
- Andersen, J.K. «Does neuronal loss in Parkinson's disease involve programmed cell death?» *Bioessays*, 2001: 23(7), Jul,pp. 640-646.
- Anglade, P., et al. «Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease.» *Histology & Histopathology*, 1997: 12(1), Jan,pp. 25-31.
- Auluck, PK, HY Chan, JQ Trojanowski, VM Lee, et NM Bonini. «Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease.» *Science*, 2002: Feb 1;295(5556):865-8. Epub 2001 Dec 20.
- Azeredo da Silveira, S, et al. «Phosphorylation does not prompt, nor prevent, the formation of alpha-synuclein toxic species in a rat model of Parkinson's disease.» *Human Molecular Genetics*, 2009: Mar 1;18(5):872-87.
- Baba, M., K. Takeshige, N. Baba, et Y. Ohsumi. «Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization.» *Journal of Cell Biology*, 1994: 124 (6), Mar,pp. 903.

- Bagchi, D., M. Bagchi, E.A. Hassoun, et S.J. Stohs. «In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides.» *Toxicology*, 1995: 104(1-3), Dec 15,pp. 129-140.
- Ball, N, WP Teo, S Chandra, et Chapman J. «Parkinson's Disease and the Environment.» *Frontiers in Neurology*, 2019: Mar 19;10:218.
- Bandyopadhyay, U., et A.M. Cuervo. «Chaperone-mediated autophagy in aging and neurodegeneration: lessons from alpha-synuclein.» *Experimental Gerontology*, 2007: 42(1-2), Jan-Feb,pp. 120-128.
- Barber, TR, JC Klein, CE Mackay, et MTM Hu. «Neuroimaging in pre-motor Parkinson's disease.» *NeuroImage: Clinical*, 2017: Apr 21;15:215-227.
- Barrett, PJ, et TJ Greenamyre. «Post-translational modification of α -synuclein in Parkinson's disease.» *Brain Research*, 2015: Dec 2;1628(Pt B):247-253. .
- Bengoia-Vergniory, N, RF Roberts, R Wade-Martins, et J Alegre-Abarrategui. «Alpha-synuclein oligomers: a new hope.» *Acta Neuropathologica*, 2017: 134(6): 819-838.
- Bennett, MC, JF Bishop, Y Leng, PB Chock, TN Chase, et MM Mouradian. «Degradation of alpha-synuclein by proteasome.» *Journal of Biological Chemistry*, 1999: Nov 26;274(48):33855-8.
- Betzer, C, et al. «Alpha - synuclein aggregates activate calcium pump SERCA leading to calcium dysregulation.» *EMBO Rep.*, 2018: May; 19(5): e44617. .
- Bhattacharjee, A, Á Szabó, T Csizmadia, H Laczkó-Dobos, et G Juhász. «Understanding the importance of autophagy in human diseases using *Drosophila*.» *Journal of Genetics and Genomics*, 2019: Volume 46, Issue 4, 20 April 2019, Pages 157-169.
- Bialik, S, SK Dasari, et A Kimchi. «Autophagy-dependent cell death – where, how and why a cell eats itself to death.» *Journal of Cell Science*, 2018: 131: jcs215152.
- Bonneh-Barkay, D., W. J. Langston, et D. A. Di Monte. «Toxicity of redox cycling pesticides in primary mesencephalic cultures.» *Antioxidants & Redox Signaling*, 2005: 7(5-6), May-Jun,pp. 649-653.
- Breydo, L, JW Wu, et VN Uversky. «A-synuclein misfolding and Parkinson's disease.» *Biochim Biophys Acta*, 2012: Feb;1822(2):261-85. d.
- Burré, J. «The Synaptic Function of α -Synuclein.» *Journal of Parkinson's Disease*, 2015: 2015;5(4):699-713.

- Bus, J.S., et J.E. Gibson. «Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity.» *Environmental Health Perspectives*, 1984: 55Apr,pp. 37-46.
- Butler, B, D Sambo, et H Khoshbouei. «Alpha-synuclein modulates dopamine neurotransmission.» *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2017: Oct;83-84:41-49.
- Butler, D., et B.A. Bahr. «Oxidative stress and lysosomes: CNS-related consequences and implications for lysosomal enhancement strategies and induction of autophagy.» *Antioxidants & Redox Signaling*, 2006: 8(1-2), Jan-Feb,pp. 185-196.
- Cannon, JR, V Tapias, HM Na, AS Honick, RE Drolet, et JT Greenamyre. «A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease.» *Neurobiology of Disease*, 2009: May;34(2):279-90.
- Cappelletti, G., M.G. Maggioni, et R. Maci. «Apoptosis in human lung epithelial cells: triggering by paraquat and modulation by antioxidants.» *Cell Biology International*, 1998: 22(9-10), 671-678.
- Cassar, M, et al. «A dopamine receptor contributes to paraquat-induced neurotoxicity in *Drosophila*.» *Human Molecular Genetics*, 2015: 1;24(1):197-212.
- Cavallarin, N, M Vicario, et A Negro. «The role of phosphorylation in synucleinopathies: focus on Parkinson's disease.» *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2010: Aug;9(4):471-81.
- Chartier-Harlin, MC, et al. «Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease.» *Lancet*, 2004: Sep 25-Oct 1;364(9440):1167-9.
- Chaudhuri, A, et al. «Interaction of genetic and environmental factors in a *Drosophila* parkinsonism model.» *Journal of Neuroscience*, 2007: Mar 7;27(10):2457-67.
- Chen, AY, P Wilburn, X Hao, et T Tully. «Walking deficits and centrophobism in an α -synuclein fly model of Parkinson's disease.» *Genes, Brain and Behavior*, 2014: Nov;13(8):812-20. .
- Chen, AY, S Xia, P Wilburn, et T Tully. «Olfactory deficits in an alpha-synuclein fly model of Parkinson's disease.» *PLoS One*, 2014: May 30;9(5):e97758.
- Chen, C, et al. «Echinacoside protects against MPTP/MPP+-induced neurotoxicity via regulating autophagy pathway mediated by Sirt1.» *Metabolic Brain Disease*, 2019: Feb;34(1):203-212.
- Chen, L, et MB Feany. «Alpha-synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a *Drosophila* model of Parkinson disease.» *Nature Neuroscience*, 2005: May;8(5):657-63. Epub 2005 Apr 17.

- Chinta, S.J., A. Rane, K.S. Poksay, D.E. Bredesen, J.K. Andersen, et R.V. Rao. «Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program in dopaminergic cells: effect of paraquat.» *NeuroMolecular Medicine*, 2008: 10(4), 333-342.
- Choi, W.S., S.Y., Yoon, T.H., Oh, E.J., Choi, K.L., O'Malley, et Y.J. Oh. «Two distinct mechanisms are involved in 6-hydroxydopamine- and MPP⁺-induced dopaminergic neuronal cell death: role of caspases, ROS, and JNK.» *Journal of Neuroscience Research*, 1999: 57(1), Jul 1, pp. 86-94.
- Chorfa, A, et al. «Specific pesticide-dependent increases in α -synuclein levels in human neuroblastoma (SH-SY5Y) and melanoma (SK-MEL-2) cell lines.» *Toxicol Sci*, 2013: Jun;133(2):289-97. .
- Coleman, MD, et al. «A Preliminary Investigation into the Impact of a Pesticide Combination on Human Neuronal and Glial Cell Lines In Vitro.» *Plos One*, 2012: 7(8): e42768.
- Colla, E, et al. «Endoplasmic Reticulum Stress Is Important for the Manifestations of α -Synucleinopathy In Vivo.» *J Neurosci*, 2012: Mar 7; 32(10): 3306–3320. .
- Costello, S., M. Cockburn, J. Bronstein, X. Zhang, et B. Ritz. «Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California.» *American Journal of Epidemiology*, 2009: 169(8), Apr 15, pp. 919-926.
- Coulom, H, et S Birman. «Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*.» *Journal of Neuroscience*, 2004: Dec 1;24(48):10993-8.
- Cuervo, AM, L Stefanis, R Fredenburg, PT Lansbury, et D Sulzer. «Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy.» *Science*, 2004: Aug 27;305(5688):1292-5.
- Dehay, B, et al. «Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease.» *J Neurosci*, 2010: 2010 Sep 15;30(37):12535-44. .
- Dettmer, U, AJ Newman, VE von Saucken, T Bartels, et D Selkoe. «KTKEGV repeat motifs are key mediators of normal α -synuclein tetramerization: Their mutation causes excess monomers and neurotoxicity.» *PNAS*, 2015: Aug 4; 112(31): 9596–9601. .
- Di Maio, R, et al. « α -Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease.» *Sci Transl Med*, 2016: Jun 8;8(342):342ra78. .

- Di Monte, D., M. S. Sandy, G. Ekstrom, et M.T. Smith. «Comparative studies on the mechanisms of paraquat and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) cytotoxicity.» *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1986: 137(1), May 29,pp. 303-309.
- Dikiy, I, et D Eliezer. «Folding and misfolding of alpha-synuclein on membranes.» *Biochim Biophys Acta*, 2012: Apr;1818(4):1013-8.
- Ding, Q., et J. N. Keller. «Proteasome inhibition in oxidative stress neurotoxicity: implications for heat shock proteins.» *Journal of Neurochemistry*, 2001: 77(4), May,pp. 1010-1017.
- Dinis-Oliveira, R.J., et al. «Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease.» *Neurotoxicology*, 2006: 27(6), Dec,pp. 1110-1122.
- Dinis-Oliveira, R.J., J.A. Duarte, A. Sanchez-Navarro, F. Remiao, M.L. Bastos, et F. Carvalho. «Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment.» *Critical Reviews in Toxicology*, 2008: 38(1), 13-71.
- Dinis-Oliveira, R.J., J.A. Duarte, A. Sanchez-Navarro, F. Remiao, M.L. Bastos, et F. Carvalho. «Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment.» *Critical Reviews in Toxicology*, 2008: 38(1), 13-71.
- Dinov, ID, et al. «Predictive Big Data Analytics: A Study of Parkinson's Disease Using Large, Complex, Heterogeneous, Incongruent, Multi-Source and Incomplete Observations.» *PLoS One*, 2016: Aug 5;11(8):e0157077.
- Drechsel, D. A., et M. Patel. «Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease.» *Free Radical Biology and Medicine*, 2008: 44(11), Jun 1,pp. 1873-1886.
- Du, Y, MC Wooten, et MW Wooten. «Oxidative damage to the promoter region of SQSTM1/p62 is common to neurodegenerative disease.» *Neurobiology of Disease*, 2009: Aug;35(2):302-10.
- Dyllick-Brenzinger, M., C. A. D'Souza, B. Dahlmann, P.M. Kloetzel, et A. Tandon. «Reciprocal effects of alpha-synuclein overexpression and proteasome inhibition in neuronal cells and tissue.» *Neurotoxicity Research*, 2010: 17(3), Apr,pp. 215-227.
- Emamzadeh, FN. «Alpha-synuclein structure, functions, and interactions.» *Journal of Research in Medical Sciences*, 2016: 2016; 21: 29.

- Ethell, D.W., et L.A. Buhler. «Fas ligand-mediated apoptosis in degenerative disorders of the brain.» *Journal of Clinical Immunology*, 2003: 23(6), Nov,pp. 439-446.
- Fabisiak, J.P., V.E. Kagan, V.B. Ritov, D.E. Johnson, et J.S. Lazo. «Bcl-2 inhibits selective oxidation and externalization of phosphatidylserine during paraquat-induced apoptosis.» *American Journal of Physiology*, 1997: 272(2 Pt 1), Feb,pp. C675-684.
- Fahn, S, et D Sulzer. «Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease.» *NeuroRX*, 2004: Jan;1(1):139-54.
- Fall, C.P., et J.P.,Jr. Bennett. «Characterization and time course of MPP+ -induced apoptosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells.» *Journal of Neuroscience Research*, 1999: 55(5), Mar 1,pp. 620-628.
- Faludi, B, J Janszky, S Komoly, et N Kovács. «Sleep disturbances in Parkinson's disease: characteristics, evaluation and therapeutic approaches.» *Orvost Hetilap Journal*, 2015: Jul 5;156(27):1091-9.
- Farrer, M, et al. «Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications.» *Annals of Neurology*, 2004: Feb;55(2):174-9.
- Feany, MB, et WW Bender. «A Drosophila model of Parkinson's disease.» *Nature*, 2000: Mar 23;404(6776):394-8.
- Fei, Q., A.L. McCormack, D.A. Di Monte, et D.W. Ethell. «Paraquat neurotoxicity is mediated by a Bak-dependent mechanism.» *Journal of Biological Chemistry*, 2008: 283(6), Feb 8,pp. 3357-3364.
- Felice, VD, EM Quigley, AM Sullivan, GW O'Keeffe, et SM O'Mahony. «Microbiota-gut-brain signalling in Parkinson's disease: Implications for non-motor symptoms.» *Parkinsonism & Related Disorders*, 2016: Jun;27:1-8.
- Fengsrud, M., N. Roos, T. Berg, W. Liou, J.W. Slot, et P.O. Seglen. «Ultrastructural and immunocytochemical characterization of autophagic vacuoles in isolated hepatocytes: effects of vinblastine and asparagine on vacuole distributions.» *Experimental Cell Research*, 1995: 221 (2), Dec, pp. 504-519.
- Fernández-Hernández, I, E Scheenaard, G Pollarolo, et C Gonzalez. «The translational relevance of Drosophila in drug discovery.» *EMBO Reports*, 2016: Apr;17(4):471-2.
- Flagmeiera, P, et al. «Mutations associated with familial Parkinson's disease alter the initiation and amplification steps of α -synuclein aggregation.» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016: Sep 13;113(37):10328-33.

- Fouillet, A, et al. «ER stress inhibits neuronal death by promoting autophagy.» *Autophagy*, 2012: Jun 1; 8(6): 915–926. .
- Freude, B., et al. «Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion.» *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2000: 32(2), Feb,pp. 197-208.
- Fujiwara, H, et al. «alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions.» *Nature Cell Biology*, 2002: Feb;4(2):160-4.
- Fukushima, T., K. Yamada, A. Isobe, K. Shiwaku, et Y. Yamane. «Mechanism of cytotoxicity of paraquat. I. NADH oxidation and paraquat radical formation via complex I.» *Experimental and Toxicologic Pathology*, 1993: 45(5-6), Oct,pp. 345-349.
- Gajula Balija, MB, C Griesinger, A Herzig, M Zweckstetter, et H Jäckle. «Pre-fibrillar α -synuclein mutants cause Parkinson's disease-like non-motor symptoms in *Drosophila*.» *PLoS One*, 2011: 2011;6(9):e24701. .
- Galvagnion, C, et al. «Lipid vesicles trigger α -synuclein aggregation by stimulating primary nucleation.» *Nat Chem Biol.*, 2015: Mar;11(3):229-34. .
- Garcia-Garcia, A, A Anandhan, M Burns, H Chen, Y Zhou, et R Franco. «Impairment of Atg5-Dependent Autophagic Flux Promotes Paraquat- and MPP+-Induced Apoptosis But Not Rotenone or 6-Hydroxydopamine Toxicity.» *Toxicol Sci.*, 2013: Nov; 136(1): 166–182. .
- Gasser, T. «Usefulness of Genetic Testing in PD and PD Trials: A Balanced Review.» *Journal of Parkinson's Disease*, 2015: vol. 5, no. 2, pp. 209-215, 2015.
- Gegg, M.E., J.M. Cooper, A.H. Schapira, et J.W. Taanman. «Silencing of PINK1 expression affects mitochondrial DNA and oxidative phosphorylation in dopaminergic cells.» *PLoS One*, 2009: 4(3), e4756.
- George, JM. «The synucleins.» *Genome Biol.* , 2002: 2002;3(1):REVIEWS3002.
- Goers, J., et al. «Nuclear localization of alpha-synuclein and its interaction with histones.» *Biochemistry*, 2003: 42(28), Jul 22,pp. 8465-8471.
- Gomez-Sanchez, R., J.M. Bravo-San Pedro, M. Niso-Santano, G. Soler, J.M. Fuentes, et R.A. Gonzalez-Polo. «The neuroprotective effect of talipexole from paraquat-induced cell death in dopaminergic neuronal cells.» *Neurotoxicology*, 2010: 31(6), Dec,pp. 701-708.
- Gonzalez-Polo, R, et al. «Silencing DJ-1 reveals its contribution in paraquat-induced autophagy.» *Journal of Neurochemistry*, 2009: 109(3), May,pp. 889-898.

- Gonzalez-Polo, R.A., A. Rodriguez-Martin, J.M. Moran, M. Niso, G. Soler, et J.M. Fuentes. «Paraquat-induced apoptotic cell death in cerebellar granule cells.» *Brain Research*, 2004: 1011(2), Jun 18,pp. 170-176.
- Gonzalez-Polo, R.A., et al. «Inhibition of paraquat-induced autophagy accelerates the apoptotic cell death in neuroblastoma SH-SY5Y cells.» *Toxicological Sciences*, 2007a: 97(2), Jun,pp. 448-458.
- Gonzalez-Polo, R.A., et al. «Relationship between autophagy and apoptotic cell death in human neuroblastoma cells treated with paraquat: could autophagy be a "brake" in paraquat-induced apoptotic death?» *Autophagy*, 2007b: 3(4), Jul-Aug,pp. 366-367.
- Grant, H., P.L. Lantos, et C. Parkinson. «Cerebral damage in paraquat poisoning.» *Histopathology*, 1980: 4(2), Mar,pp. 185-195.
- Gray, J.P., et al. «Paraquat increases cyanide-insensitive respiration in murine lung epithelial cells by activating an NAD(P)H:paraquat oxidoreductase: identification of the enzyme as thioredoxin reductase.» *Journal of Biological Chemistry*, 2007: 282(11), Mar 16,pp. 7939-7949.
- Hariri, M., G. Millane, M.P. Guimond, G. Guay, J.W. Dennis, et I.R. Nabi. «Biogenesis of multilamellar bodies via autophagy.» *Molecular Biology of the Cell*, 2000: 11 (1), Jan,pp. 255-268.
- Hartmann, A., et al. «Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease.» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000: 97(6), Mar 14,pp. 2875-2880.
- Hasegawa, T, N Sugeno, A Kikuchi, T Baba, et M Aoki. «Membrane Trafficking Illuminates a Path to Parkinson's Disease.» *THE TOHOKU JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE*, 2017: May;242(1):63-76.
- Healey, MA, MT Woodside, et JA Tuszynski. «Phase transitions and structure analysis in wild-type, A30P, E46K, and A53T mutants of α -synuclein.» *Eur Biophys J.*, 2016: May;45(4):355-64. .
- Hernandez, DG, X Reed, et AB Singleton. «Genetics in Parkinson disease: Mendelian versus non-Mendelian inheritance.» *Journal of Neurochemistry*, 2016: Oct;139 Suppl 1:59-74.

- Hertzman, C., M. Wiens, D. Bowering, B. Snow, et D. Calne. «Parkinson's disease: a case-control study of occupational and environmental risk factors.» *American Journal of Industrial Medicine*, 1990: 17 (3), 349-355.
- Hertzman, C., M. Wiens, D. Bowering, B. Snow, et D. Calne. «Parkinson's disease: a case-control study of occupational and environmental risk factors.» *American Journal of Industrial Medicine*, 1990: 17(3), 349-355.
- Hirsch, EC, A Mouatt, M Thomasset, F Javoy-Agid, Y Agid, et AM Graybiel. «Expression of calbindin D28k-like immunoreactivity in catecholaminergic cell groups of the human midbrain: normal distribution and distribution in Parkinson disease.» *Neurodegeneration*, 1992: 1 (1992), pp. 83-93.
- Holtz, W.A., et K.L. O'Malley. «Parkinsonian mimetics induce aspects of unfolded protein response in death of dopaminergic neurons.» *Journal of Biological Chemistry*, 2003: 278(21), May 23, pp. 19367-19377.
- <https://flybase.org/>. «<https://flybase.org/>» s.d.
- Huang, Y, F Chegini, G Chua, K Murphy, W Gai, et GM Halliday. «Macroautophagy in sporadic and the genetic form of Parkinson's disease with the A53T α -synuclein mutation.» *Translational Neurodegeneration*, 2012: Jan 13;1(1):2.
- Ibáñez, P, et al. «Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease.» *Lancet*, 2004: Sep 25-Oct 1;364(9440):1169-71.
- Igney, F.H., et P.H. Krammer. «Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis.» *Nature Reviews Cancer*, 2002: 2(4), Apr, pp. 277-288.
- Ikuno, M, et al. «GBA-haploinsufficiency accelerates alpha-synuclein pathology with altered lipid metabolism in a prodromal model of Parkinson's disease.» *Human Molecular Genetics*, 2019: Vol. 28, No. 111894-1904.
- Issa, AR, et al. «The lysosomal membrane protein LAMP2A promotes autophagic flux and prevents SNCA-induced Parkinson disease-like symptoms in the Drosophila brain.» *Autophagy*, 2018: 14(11): 1898-1910.
- Iwata, A., et al. «Increased susceptibility of cytoplasmic over nuclear polyglutamine aggregates to autophagic degradation.» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005: 102(37), Sep 13, pp. 13135-13140.
- Iyer, A, N Schilderink, MMAE Claessens, et V Subramaniam. «Membrane-Bound Alpha Synuclein Clusters Induce Impaired Lipid Diffusion and Increased Lipid Packing.» *Biophys J.*, 2016: Dec 6;111(11):2440-2449. .

- Jacomin, AC, E Taillebourg, et MO Fauvarque. «Deubiquitinating Enzymes Related to Autophagy : New Therapeutic Opportunities?» *Cells*, 2018: Aug 19;7(8). pii: E112.
- Jacomin, AC, et al. «The Deubiquitinating Enzyme UBPY Is Required for Lysosomal Biogenesis and Productive Autophagy in Drosophila.» *PLoS One*, 2015: Nov 16;10(11):e0143078.
- Jacomin, AC, et IP Nezis. «Assays to Monitor Aggrephagy in Drosophila Brain.» *Methods in Molecular Biology*, 2019: 2019;1854:147-157. .
- Jha, NN, et al. «Complexation of NAC-Derived Peptide Ligands with the C-Terminus of α -Synuclein Accelerates Its Aggregation.» *Biochemistry*, 2018: Feb 6;57(5):791-804.
- .
- Jucker, M, et LC Walker. «Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases.» *Nature*, 2013: Sep 5;501(7465):45-51.
- Julienne, H, E Buhl, DS Leslie, et JLL Hodge. «Drosophila PINK1 and parkin loss-of-function mutants display a range of non-motor Parkinson's disease phenotypes.» *Neurobiology of Disease*, 2017: Aug;104:15-23. .
- Kalia, LV, et AE Lang. «Parkinson's disease.» *Lancet*, 2015: Aug 29;386(9996):896-912. .
- Kannarkat, GT, et al. «Common genetic variant association with altered HLA expression, synergy with pyrethroid exposure, and risk for Parkinson's disease: an observational and case-control study.» *npj Parkinson's Disease*, 2015: 2015; 1: 15002.
- Kawaguchi, Y, JJ Kovacs, A McLaurin, JM Vance, A Ito, et TP Yao. «The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress.» *Cell*, 2003: Dec 12;115(6):727-38.
- Kegel, K.B., et al. «Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy.» *The Journal of Neuroscience*, 2000: 20(19), Oct 1,pp. 7268-7278.
- Kerr, J.F., C.M. Winterford, et B.V. Harmon. «Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy.» *Cancer*, 1994: 73(8), Apr 15,pp. 2013-2026.
- Khalaf, O, et al. «The H50Q mutation enhances α -synuclein aggregation, secretion, and toxicity.» *J Biol Chem.*, 2014: Aug 8;289(32):21856-76.

- Ki, CS, et al. «The Ala53Thr mutation in the α - synuclein gene in a Korean family with Parkinson disease.» *Clinical Genetics*, 2007: May, Volume71, Issue5, pages 471-473.
- Kikuchi, T, et al. «Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model.» *Nature*, 2017: Aug 30;548(7669):592-596.
- Kim, TD, E Choi, H Rhim, SR Paik, et CH Yang. «Alpha-synuclein has structural and functional similarities to small heat shock proteins.» *Biochem Biophys Res Commun.*, 2004: Nov 26;324(4):1352-9.
- Kitazawa, Y., M. Matsubara, N. Takeyama, et T. Tanaka. «The role of xanthine oxidase in paraquat intoxication.» *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1991: 288(1), Jul,pp. 220-224.
- Klingelhoefer, L, et H Reichmann. «The Gut and Nonmotor Symptoms in Parkinson's Disease.» *International Review of Neurobiology*, 2017: 2017;134:787-809.
- Klintworth, H, K Newhouse, T Li, W.S Choi, R Faigle, et Z Xia. «Activation of c-Jun N-terminal protein kinase is a common mechanism underlying paraquat- and rotenone-induced dopaminergic cell apoptosis.» *Toxicological Sciences*, 2007: 97(1), May,pp. 149-162.
- Klionsky, D.J., et S.D. Emr. «Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation.» *Science*, 2000: 290 (5497), Dec 1,pp. 1717-172.
- Klionsky, DJ, AM Cuervo, WA Jr Dunn, B Levine, I van der Klei, et PO Seglen. «How shall I eat thee?» *Autophagy*, 2007: 3(5), Sep-Oct,pp. 413-416.
- Kocaturk, NM, et D Gozuacik. «Crosstalk Between Mammalian Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System.» *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2018: Oct 2;6:128.
- Kondo, Y., et S. Kondo. «Autophagy and cancer therapy.» *Autophagy*, 2006: 2(2), Apr-Jun,pp.85-90.
- Koushika, SP, MJ Lisbi, et K White. «ELAV, a Drosophila neuron-specific protein, mediates the generation of an alternatively spliced neural protein isoform.» *Current Biology*, 1996: Vol 6 No 12:1634–1641.
- Lam, Y.A., T.G. Lawson, M. Velayutham, J.L. Zweier, et C.M. Pickart. «A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal.» *Nature*, 2002: 416(6882), Apr 18,pp. 763-767.

- Lashuel, HA, et al. «Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils.» *J Mol Biol.*, 2002: Oct 4;322(5):1089-102.
- Lawal, HO, et al. «The Drosophila vesicular monoamine transporter reduces pesticide-induced loss of dopaminergic neurons.» *Neurobiology of Disease*, 2010: Oct;40(1):102-12.
- Leist, M., et M. Jaattela. «Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms.» *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2001: 2(8), Aug,pp. 589-598.
- Lewis, KA, A Yaeger, GN DeMartino, et PJ Thomas. «Accelerated formation of α -synuclein oligomers by concerted action of the 20S proteasome and familial Parkinson mutations.» *J Bioenerg Biomembr.*, 2010: Feb, Vol. 42, Issue 1, pp 85–95.
- Li, C.J., Friedman, D.J., Wang, C., Metelev, V., & Pardee, A.B. «Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein.» *Science*, 1995: 268(5209), Apr 21,pp. 429-431.
- Li, X., et A.Y. Sun. «Paraquat induced activation of transcription factor AP-1 and apoptosis in PC12 cells.» *Journal of Neural Transmission*, 1999: 106(1), 1-21.
- Liddle, RA. «Parkinson's disease from the gut.» *Brain Research*, 2018: Aug 15;1693(Pt B):201-206.
- Linhart, R, et al. «Vacuolar protein sorting 35 (Vps35) rescues locomotor deficits and shortened lifespan in Drosophila expressing a Parkinson's disease mutant of Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2).» *Molecular Neurodegeneration*, 2014: Jun 11;9:23.
- Liochev, S. I., A. Hausladen, W.F.Jr. Beyer, et I. Fridovich. «NADPH: ferredoxin oxidoreductase acts as a paraquat diaphorase and is a member of the soxRS regulon.» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994: 91(4), Feb 15,pp. 1328-1331.
- Liou, H. H., Tsai, M. C., Chen, C. J., Jeng, J. S., Chang, Y. C., Chen, S. Y., & Chen, R. C. «Environmental risk factors and Parkinson's disease : a case-control study in Taiwan.» *Neurology*, 1997: 48(6), Jun,pp. 1583-1588.
- Liou, H.H., et al. «Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan.» *Neurology*, 1997: 48(6), Jun,pp. 1583-1588.
- Loo, D.T., A. Copani, C.J. Pike, E.R. Whittemore, A.J. Walencewicz, et C.W. Cotman. «Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system

- neurons.» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993: 90(17), Sep 1, pp. 7951-7955.
- Lub, S, K Maes, E Menu, E De Bruyne, K Vanderkerken, et E Van Valckenborgh. «Novel strategies to target the ubiquitin proteasome system in multiple myeloma.» *Oncotarget.*, 2016: 7:6521-6537.
- Ma, MR, ZW Hu, YF Zhao, YX Chen, et YM Li. «Phosphorylation induces distinct alpha-synuclein strain formation.» *Scientific Reports*, 2016: Nov 17;6:37130.
- MacLeod, DA, et al. «RAB7L1 interacts with LRRK2 to modify intraneuronal protein sorting and Parkinson's disease risk.» *Neuron*, 2013: Feb 6; 77(3): 425-439.
- Mammadova, N, et al. «Accelerated accumulation of retinal α -synuclein (pSer129) and tau, neuroinflammation, and autophagic dysregulation in a seeded mouse model of Parkinson's disease.» *Neurobiol Dis.*, 2019: 2019 Jan;121:1-16. .
- Manning-Bog, A.B., A.L. McCormack, J. Li, V.N. Uversky, A.L. Fink, et D.A. Di Monte. «The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein.» *Journal of Biological Chemistry*, 2002: 277(3), Jan 18, pp. 1641-1644.
- Mao, Z, et RL Davis. «Eight different types of dopaminergic neurons innervate the Drosophila mushroom body neuropil: anatomical and physiological heterogeneity.» *Frontiers in Neural Circuits*, 2009: Jul 1;3:5.
- Martinez, A, N Lopez, C Gonzalez, et C Hetz. «Targeting of the unfolded protein response (UPR) as therapy for Parkinson's disease.» *Biology of the Cell*, 2019: Jun;111(6):161-168.
- Martinez-Vicente, M., et A.M. Cuervo. «Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike.» *Lancet Neurology*, 2007: 6(4), Apr, pp. 352-361.
- Maruzs, T, Z Simon-Vecsei, V Kiss, T Csizmadia, et G Juhász. «On the Fly: Recent Progress on Autophagy and Aging in Drosophila.» *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2019: Jul 24;7:140.
- Maslah, E., et al. «Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders.» *Science*, 2000: 287(5456), Feb 18, pp. 1265-1269.
- Massey, AC, S Kaushik, G Sovak, R Kiffin, et AM Cuervo. «Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy.» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006: 103(15), Apr 11, pp. 5805-5810.

- Mattson, M.P. «Neuronal life-and-death signaling, apoptosis, and neurodegenerative disorders.» *Antioxidants & Redox Signaling*, 2006: 8(11-12), Nov-Dec,pp. 1997-2006.
- McCarthy, S., M. Somayajulu, M. Sikorska, H. Borowy-Borowski, et S. Pandey. «Paraquat induces oxidative stress and neuronal cell death; neuroprotection by water-soluble Coenzyme Q10.» *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004: 201(1), Nov 15,pp. 21-31.
- McCormack, A.L., et al. «Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat.» *Neurobiology of Disease*, 2002: 10(2), Jul,pp. 119-127.
- McCormack, AL, SK Mak, M Shenasa, WJ Langston, LS Forno, et DA Di Monte. «Pathologic modifications of alpha-synuclein in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated squirrel monkeys.» *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 2008: Aug;67(8):793-802.
- McNaught, K. S., C. W. Olanow, B. Halliwell, O. Isacson, et P. Jenner. «Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease.» *Nature Reviews Neuroscience*, 2001: 2(8), Aug,pp.589-594.
- Menges, S, et al. «Alpha-synuclein prevents the formation of spherical mitochondria and apoptosis under oxidative stress.» *Scientific Reports*, 2017: Feb 22;7:42942.
- Menzies, F.M., B. Ravikumar, et D.C. Rubinsztein. «Protective roles for induction of autophagy in multiple proteinopathies.» *Autophagy*, 2006: 2(3), Jul-Sep,pp. 224-225.
- Meredith, G.E., S. Totterdell, E. Petroske, K. Santa Cruz, R.C.,Jr. Callison, et Y.S. Lau. «Lysosomal malfunction accompanies alpha-synuclein aggregation in a progressive mouse model of Parkinson's disease.» *Brain Research*, 2002: 956(1), Nov 22,pp. 156-165.
- Metcalf, D, et AM Isaacs. «The role of ESCRT proteins in fusion events involving lysosomes, endosomes and autophagosomes.» *Biochem Soc Trans.*, 2010: Dec;38(6):1469-73. .
- Miraglia, F, A Ricci, L Rota, et E Colla. «Subcellular localization of alpha-synuclein aggregates and their interaction with membranes.» *Neural Regeneration Research*, 2018: 13(7):1136-1144.

- Mizushima, N., et al. «Dissection of autophagosome formation using Atg5-deficient mouse embryonic stem cells.» *Journal of Cell Biology*, 2001: 152(4), Feb 19, pp. 657-668.
- Moisan, F, S Kab, E Moutengou, M Boussac-Zarebska, L Carcaillon-Bentata, et A Elbaz. «Fréquence de la maladie de Parkinson en France en 2015 et évolution jusqu'en 2030.» *Bull Epidémiol Hebd.*, 2018: 2018;(8-9):128-40)..
- Mollace, V., et al. «The role of oxidative stress in paraquat-induced neurotoxicity in rats: protection by non peptidyl superoxide dismutase mimetic.» *Neuroscience Letters*, 2003: 335(3), Jan 2, pp. 163-166.
- Moran, J.M., R.A. Gonzalez-Polo, M.A. Ortiz-Ortiz, M. Niso-Santano, G. Soler, et J.M. Fuentes. «Identification of genes associated with paraquat-induced toxicity in SH-SY5Y cells by PCR array focused on apoptotic pathways.» *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 2008: 71(22), 1457-1467.
- Moretto, A, et C Colosio. «Biochemical and toxicological evidence of neurological effects of pesticides: the example of Parkinson's disease.» *Neurotoxicology*, 2011: Aug;32(4):383-91.
- Muqit, MMK, et MB Feany. «Modelling neurodegenerative diseases in Drosophila: a fruitful approach?» *Nature Reviews Neuroscience*, 2002: volume 3, pages 237-243.
- Nagy, P, Á Varga, AL Kovács, S Takáts, et G Juhász. «How and why to study autophagy in Drosophila: it's more than just a garbage chute.» *Methods*, 2015: Mar;75:151-61.
- Nakai, A., et al. «The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress.» *Nature Medicine*, 2007: 13(5), May, pp. 619-624.
- Nässel, DR. «Substrates for Neuronal Cotransmission With Neuropeptides and Small Molecule Neurotransmitters in Drosophila.» *Front Cell Neurosci.*, 2018: 2018 Mar 23;12:83.
- Naudet, N, et al. «Oral Exposure to Paraquat Triggers Earlier Expression of Phosphorylated α -Synuclein in the Enteric Nervous System of A53T Mutant Human α -Synuclein Transgenic Mice.» *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 2017: Dec 1;76(12):1046-1057.
- Navarro, JA, et al. «Analysis of dopaminergic neuronal dysfunction in genetic and toxin-induced models of Parkinson's disease in Drosophila.» *Journal of Neurochemistry*, 2014: Nov;131(3):369-82.

- Navarro-Yepes, J, A Anandhan, E Bradley, I Bohovych, B Yarabe, et A de Jong. «Inhibition of Protein Ubiquitination by Paraquat and 1-Methyl-4-Phenylpyridinium Impairs Ubiquitin-Dependent Protein Degradation Pathways.» *Molecular Neurobiology*, 2016: Oct; 53(8): 5229–5251. .
- Newhouse, K, SL Hsuan, SH Chang, B Cai, Y Wang, et Z Xia. «Rotenone-induced apoptosis is mediated by p38 and JNK MAP kinases in human dopaminergic SH-SY5Y cells.» *Toxicological Sciences*, 2004: 79(1), May,pp. 137-146.
- Nezis, IP, et al. « Ref(2)P, the Drosophila melanogaster homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain.» *THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY*, 2008: 180 (6): 1065.
- Nichols, CD, J Becnel, et UB Pandey. «Methods to assay Drosophila behavior.» *Journal of Visualized Experiments*, 2012: Mar 7;(61). pii: 3795. .
- Nilangekar, K, N Murmu, G Sahu, et BV Shrivastava. «Generation and Characterization of Germline-Specific Autophagy and Mitochondrial Reactive Oxygen Species Reporters in Drosophila. » *Front Cell Dev Biol*, 2019: Apr 3;7:47.
- Ning, B, Q Zhang, M Deng, N Wang, et Y Fang. «Endoplasmic Reticulum Stress Induced Autophagy In 6-OHDA-Induced Parkinsonian Rats.» *Brain Research Bulletin*, 2019: Mar;146:224-227.
- Niso-Santano, M., et al. «Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 is a key factor in paraquat-induced cell death: modulation by the Nrf2/Trx axis.» *Free Radical Biology and Medicine*, 2010: 48(10), May 15,pp. 1370-1381.
- Niso-Santano, M., et al. «ASK1 overexpression accelerates paraquat-induced autophagy via endoplasmic reticulum stress.» *Toxicological Sciences*, 2011: 119(1), Jan,pp. 156-168.
- Niso-Santano, M., et al. «Low concentrations of paraquat induces early activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2, protein kinase B, and c-Jun N-terminal kinase 1/2 pathways: role of c-Jun N-terminal kinase in paraquat-induced cell death.» *Toxicological Sciences*, 2006: 92(2), Aug,pp. 507-515.
- Nixon, R.A., et al. «Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immunoelectron microscopy study.» *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 2005: 64(2), Feb,pp. 113-122.
- Norbury, C.J., et I.D. Hickson. «Cellular responses to DNA damage.» *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2001: 41:367-401.

- Norris, E.H., K. Uryu, S. Leight, B.I. Giasson, J.Q. Trojanowski, et V.M. Lee. «Pesticide exposure exacerbates alpha-synucleinopathy in an A53T transgenic mouse model.» *The American Journal of Pathology*, 2007: 170(2), Feb,pp. 658-666.
- Okochi, M, et al. «Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein.» *Journal of Biological Chemistry*, 2000: Jan 7;275(1):390-7.
- Olanow, C.W. «The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease.» *Movement Disorders*, 2007: 22 Suppl 17Sep,pp. S335-342.
- Ordonez, DG, MK Lee, et MB Feany. « α -synuclein Induces Mitochondrial Dysfunction through Spectrin and the Actin Cytoskeleton.» *Neuron*, 2018: Jan 3;97(1):108-124.e6.
- Pan, T., S. Kondo, W. Le, et J. Jankovic. «The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson's disease.» *Brain*, 2008: 131(Pt 8), Aug,pp. 1969-1978.
- Pandey, UB, et CD Nichols. «Human disease models in Drosophila melanogaster and the role of the fly in therapeutic drug discovery.» *Pharmacological Reviews*, 2011: Jun;63(2):411-36. .
- Parkinson, J. «An essay on the shaking palsy. 1817.» *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 2002: Spring;14(2):223-36; discussion 222.
- Pascua-Maestro, R, S Diez-Hermano, C Lillo, MD Ganfornina, et D Sanchez. «Protecting cells by protecting their vulnerable lysosomes: Identification of a new mechanism for preserving lysosomal functional integrity upon oxidative stress.» *PLoS One*, 2017: Feb 9;13(2):e1006603.
- Patel, M., B. J. Day, J. D. Crapo, I. Fridovich, et J. O. McNamara. «Requirement for superoxide in excitotoxic cell death.» *Neuron*, 1996: 16(2), Feb,pp. 345-355.
- Peng, J., X.O. Mao, F.F. Stevenson, M. Hsu, et J.K. Andersen. «The herbicide paraquat induces dopaminergic nigral apoptosis through sustained activation of the JNK pathway.» *Journal of Biological Chemistry*, 2004: 279(31), Jul 30,pp. 32626-32632.
- Perez, RG, JC Waymire, E Lin, JJ Liu, F Guo, et MJ Zigmond. «A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis.» *Journal of Neuroscience*, 2002: Apr 15;22(8):3090-9.
- Poças, GM, J Branco-Santos, F Herrera, TF Outeiro, et PM Domingos. « α -Synuclein modifies mutant huntingtin aggregation and neurotoxicity in Drosophila.» *Human Molecular Genetics*, 2015: Apr 1; 24(7): 1898–1907. .

- Poehler, AM, et al. «Autophagy modulates SNCA/ α -synuclein release, thereby generating a hostile microenvironment.» *Autophagy*, 2014: 2014;10(12):2171-92. .
- Polymeropoulos, M.H., et al. «Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease.» *Science*, 1997: 276(5321), Jun 27,pp. 2045-2047.
- Prasad, V, Y Wasser, F Hans, A Goswami, I Katona, et TF Outeiro. «Monitoring α -synuclein multimerization in vivo.» *The FASEB Journal*, 2019: 33, 000–000.
- Prigione, A., et al. «Alpha-synuclein nitration and autophagy response are induced in peripheral blood cells from patients with Parkinson disease.» *Neuroscience Letters*, 2010: 477(1), Jun 14,pp. 6-10.
- Rahman, AA, et BE Morrison. «Contributions of VPS35 Mutations to Parkinson's Disease.» *Neuroscience*, 2019: Volume 401, 1 March 2019, Pages 1-10.
- Ravikumar, B., et D.C. Rubinsztein. «Can autophagy protect against neurodegeneration caused by aggregate-prone proteins?» *NeuroReport*, 2004: 15(16), Nov 15,pp. 2443-2445.
- Reijnders, JS, U Ehrt, WE Weber, D Aarsland, et AF Leentjens. «A systematic review of prevalence studies of depression in Parkinson's disease.» *Movement Disorders*, 2008: Jan 30;23(2):183-9; quiz 313.
- Ren, JP, YW Zhao, et XJ Sun. «Toxic influence of chronic oral administration of paraquat on nigrostriatal dopaminergic neurons in C57BL/6 mice.» *Chinese Medical Journal*, 2009: Oct 5;122(19):2366-71.
- Riabinina, O, et al. «Improved and expanded Q-system reagents for genetic manipulations.» *Nature Methods*, 2015: Mar;12(3):219-22,.
- Richardson, J. R., Y. Quan, T. B. Sherer, J. T. Greenamyre, et G. W. Miller. «Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone.» *Toxicological Sciences*, 2005: 88(1), Nov,pp. 193-201.
- Richarme, G, M Mihoub, J Dairou, LC Bui, T Leger, et A Lamouri. «Parkinsonism-associated protein DJ-1/Park7 is a major protein deglycase that repairs methylglyoxal- and glyoxal-glycated cysteine, arginine, and lysine residues.» *Journal of Biological Chemistry*, 2015: Jan 16;290(3):1885-97. .
- Rideout, H.J., I. Lang-Rollin, et L. Stefanis. «Involvement of macroautophagy in the dissolution of neuronal inclusions.» *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004: 36(12), Dec,pp. 2551-2562.

- Riederer, P, et al. « α -Synuclein in Parkinson's disease: causal or bystander?» *J Neural Transm.*, 2019: Jul;126(7):815-840.
- Riemensperger, T, et al. «A single dopamine pathway underlies progressive locomotor deficits in a Drosophila model of Parkinson disease.» *Cell Reports*, 2013: Nov 27;5(4):952-60.
- Robin, M, et al. «Drosophila p53 integrates the antagonism between autophagy and apoptosis in response to stress.» *Autophagy*, 2019: May;15(5):771-784.
- Rogulja, D, et MW Young. «Control of Sleep by Cyclin A and its Regulator.» *Science*, 2012: 2012 March 30; 335(6076): 1617–1621.
- Ryu, E.J., H.P. Harding, J.M. Angelastro, O.V. Vitolo, D. Ron, et L.A. Greene. «Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease.» *The Journal of Neuroscience*, 2002: 22(24), Dec 15,pp. 10690-10698.
- Saeed, U, et al. «Imaging biomarkers in Parkinson's disease and Parkinsonian syndromes: current and emerging concepts.» *Translational Neurodegeneration*, 2017: 6:8.
- Sakai, M., K. Yamagami, Y. Kitazawa, N. Takeyama, et T. Tanaka. «Xanthine oxidase mediates paraquat-induced toxicity on cultured endothelial cell.» *Pharmacology & Toxicology*, 1995: 77(1), Jul,pp. 36-40.
- Sapp, E., et al. «Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients.» *Annals of Neurology*, 1997: 42(4), Oct,pp. 604-612.
- Sattler, T., et A. Mayer. «Cell-free reconstitution of microautophagic vacuole invagination and vesicle formation.» *Journal of Cell Biology*, 2000: 151(3), Oct 30,pp. 529-538.
- Schapira, AH, JM Cooper, D Dexter, JB Clark, P Jenner, et CD Marsden. «Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease.» *J. Neurochem.*, 1990: 54 (1990), pp. 823-827.
- Schilder, JC, SS Overmars, J Marinus, JJ van Hilten, et PJ Koehler. «The terminology of akinesia, bradykinesia and hypokinesia: Past, present and future.» *Parkinsonism & Related Disorders*, 2017: Apr;37:27-35. .
- Schmid, AW, B Fauvet, M Moniatte, et HA Lashuel. «Alpha-synuclein post-translational modifications as potential biomarkers for Parkinson disease and other synucleinopathies.» *Mol Cell Proteomics*, 2013: Dec;12(12):3543-58.

- Schmid, AW, et al. «Dissecting the mechanisms of tissue transglutaminase-induced cross-linking of alpha-synuclein: implications for the pathogenesis of Parkinson disease.» *Journal of Biological Chemistry*, 2009: May 8;284(19):13128-42. .
- Shi, MM, CE Shi, et YM Xu. «Rab GTPases: The Key Players in the Molecular Pathway of Parkinson's Disease.» *Front. Cell. Neurosci.*, 2017: 11:81.
- Shukla, AK, P Pragya, HS Chaouhan, DK Patel, MZ Abidin, et D Kar Chowdhuri. «Mutation in *Drosophila* methuselah resists paraquat induced Parkinson-like phenotypes.» *Neurobiology of Aging*, 2014: Oct;35(10):2419.e1-2419.e16.
- Siddiqui, IJ, N Pervaiz, et AA Abbasi. «The Parkinson Disease gene SNCA: Evolutionary and structural insights with pathological implication.» *Scientific Reports*, 2016: volume 6, Article number: 24475 (2016) .
- Snead, D, et D Eliezer. «Alpha-Synuclein Function and Dysfunction on Cellular Membranes.» *Experimental Neurobiology*, 2014: Dec;23(4):292-313.
- Song, C, et al. «Oxidative stress-mediated NFκB phosphorylation upregulates p62/SQSTM1 and promotes retinal pigmented epithelial cell survival through increased autophagy.» *PLoS One*, 2017: Feb 21;12(2):e0171940.
- Song, C., A., Kanthasamy, H., Jin, V., Anantharam, et A. G. Kanthasamy. «Paraquat induces epigenetic changes by promoting histone acetylation in cell culture models of dopaminergic degeneration.» *Neurotoxicology*, 2011: Oct; 32(5): 586–595.
- Spillantini, M. G., M. L. Schmidt, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes, et M. & Goedert. «Alpha-synuclein in Lewy bodies.» *Nature*, 1997: 388(6645), Aug 28, pp. 839-840.
- Spillantini, MG, et M Goedert. «Neurodegeneration and the ordered assembly of α -synuclein.» *Cell Tissue Res.*, 2018: Jul;373(1):137-148.
- Stewart, BA, HL Atwood, JJ Renger, J Wang, et CF Wu. «Improved stability of *Drosophila* larval neuromuscular preparations in haemolymph-like physiological solutions.» *Journal of Comparative Physiology A*, 1994: 175(2):179-91.
- Subramaniam, M, et al. «Mutant α -synuclein enhances firing frequencies in dopamine substantia nigra neurons by oxidative impairment of A-type potassium channels.» *J. Neurosci.*, 2014: 34 (2014), pp. 13586-13599.
- Sugeno, N, et al. «Serine 129 phosphorylation of alpha-synuclein induces unfolded protein response-mediated cell death.» *J Biol Chem.*, 2008: Aug 22;283(34):23179-88.

- Sulzer, D, et RH Edwards. «The physiological role of α -synuclein and its relationship to Parkinson's Disease.» *Journal of Neurochemistry*, 2019: Sep;150(5):475-486. .
- Sun, J, et al. «Neural Control of Startle-Induced Locomotion by the Mushroom Bodies and Associated Neurons in *Drosophila*.» *Front Syst Neurosci.*, 2018: Mar 28;12:6. .
- Suzuki, K., T. Kirisako, Y. Kamada, N. Mizushima, T. Noda, et Y. Ohsumi. «The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation.» *The EMBO Journal*, 2001: 20(21), Nov 1,pp. 5971-5981.
- Suzuki, M, N Fujikake, T Takeuchi, A Kohyama-Koganeya, K Nakajima, et Y Hirabayashi. «Glucocerebrosidase deficiency accelerates the accumulation of proteinase K-resistant alpha-synuclein and aggravates neurodegeneration in a *Drosophila* model of Parkinson's disease.» *Human molecular genetics*, 2015: 24(23):6675–86.
- Szabo, A, et GK Tofaris. «Monitoring α -Synuclein Proteotoxicity in *Drosophila* Models.» *Methods in Molecular Biology*, 2019: 2019;1948:199-208.
- Taguchi, K, Y Watanabe, A Tsujimura, et M Tanaka. «Brain region-dependent differential expression of alpha-synuclein.» *J Comp Neurol.*, 2016: Apr 15;524(6):1236-58. .
- Takahashi, T, et al. «Identification and characterization of a novel Pyk2/related adhesion focal tyrosine kinase-associated protein that inhibits alpha-synuclein phosphorylation.» *Journal of Biological Chemistry*, 2003: Oct 24;278(43):42225-33. Epub 2003 Jul 31.
- Tanner, C.M., et al. «Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease.» *Environmental Health Perspectives*, 2011: 119 (6), Jun,pp. 866-872.
- Tarakad, A, et J Jankovic. «Anosmia and Ageusia in Parkinson's Disease.» *Int Rev Neurobiol.*, 2017: 133:541-556.
- Thayer, JA, et al. «The PARK10 gene USP24 is a negative regulator of autophagy and ULK1 protein stability.» *Autophagy*, 2019: Apr 7:1-14.
- Thiruchelvam, M, et al. «Age-related irreversible progressive nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity in the paraquat and maneb model of the Parkinson's disease phenotype.» *European Journal of Neuroscience*, 2003: 18(3):589-600.
- Tian, C, et al. «Erythrocytic α -Synuclein as a potential biomarker for Parkinson's disease.» *Transl Neurodegener.*, 2019: May 15;8:15. .
- Trist, BG, DJ Hare, et KL Double. «Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease.» *Aging Cell*, 2019: Aug 20:e13031.

- Trojanowski, J.Q., et V.M. Lee. «"Fatal attractions" of proteins. A comprehensive hypothetical mechanism underlying Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders.» *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2000: 92462-67.
- Uhl, GR, D Walther, D Mash, B Faucheux, et F Javoy-Agid. «Dopamine transporter messenger RNA in Parkinson's disease and control substantia nigra neurons.» *Annals of Neurology*, 1994: Apr;35(4):494-8.
- Uversky, V.N., J. Li, et A.L. Fink. «Pesticides directly accelerate the rate of alphasynuclein fibril formation: a possible factor in Parkinson's disease.» *FEBS Letters*, 2001: 500(3), Jul 6,pp. 105-108.
- Valek, L, G Auburger, et I Tegeder. «Sensory neuropathy and nociception in rodent models of Parkinson's disease.» *Disease Models & Mechanisms*, 2019: Jun 27;12(6).
- Van Den Brink, DM, et al. «Physiological and pathological roles of FATP-mediated lipid droplets in Drosophila and mice retina.» *PLOS Genetics*, 2018: Sep 10;14(9):e1007627. .
- van der Wateren, IM, TPJ Knowles, AK Buell, CM Dobson, et C Galvagnion. «C-terminal truncation of α -synuclein promotes amyloid fibril amplification at physiological pH.» *Chem Sci*, 2018: May 24;9(25):5506-5516. .
- Vande Walle, L, M Lamkanfi, et P Vandenabeele. «The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi:an overview.» *Cell Death and Differentiation*, 2008: 15,453-460.
- Varga, SJ, C Qi, E Podolsky, et D Lee. «A new Drosophila model to study the interaction between genetic and environmental factors in Parkinson's disease.» *Brain Research*, 2014: Oct 2;1583:277-86.
- Venda, LL, SJ Cragg, VL Buchman, et R Wade-Martins. « α -Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease.» *Trends in Neuroscience*, 2010: Dec;33(12):559-68.
- Venken, KJ, JH Simpson, et HJ Bellen. «Genetic manipulation of genes and cells in the nervous system of the fruit fly.» *Neuron*, 2011: Oct 20;72(2):202-30.
- Vila-Chã, N, et al. «Sleep disturbances in Parkinson's disease are associated with central parkinsonian pain.» *Journal of Pain Research*, 2019: Jul 12;12:2137-2144.
- Vilariño-Güell, C, et al. «VPS35 Mutations in Parkinson Disease.» *American Journal of Human Genetics*, 2011: Jul 15; 89(1): 162-167.

- Walls, K.C., et al. «Lysosome dysfunction triggers Atg7-dependent neural apoptosis.» *Journal of Biological Chemistry*, 2010: 285(14), Apr 2, pp. 10497-10507.
- Wang, XF, S Li, AP Chou, et JM Bronstein. «Inhibitory effects of pesticides on proteasome activity: implication in Parkinson's disease.» *Neurobiol. Dis.*, 2006: 23, 198-205. .
- Warner, TT, et AHV Schapira. «Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease.» *Annals of Neurology*, 2003: 53 Suppl 3:S16-23; discussion S23-5.
- Whitworth, AJ. «Drosophila models of Parkinson's disease.» *Advances in Genetics*, 2011: 2011;73:1-50.
- Wills, J, et al. «Paraquat, but not maneb, induces synucleinopathy and tauopathy in striata of mice through inhibition of proteasomal and autophagic pathways.» *PLoS One.*, 2012: 7(1):e30745.
- Winslow, AR, et al. « α -Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease.» *J Cell Biol.*, 2010: 2010 Sep 20;190(6):1023-37.
- Worth, A., A.J. Thrasher, et H.B. Gaspar. «Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype.» *British Journal of Haematology*, 2006: 133(2), Apr, pp. 124-140.
- Xilouri, M, OR Brekk, et L Stefanis. «Alpha-synuclein and Protein Degradation Systems: a Reciprocal Relationship.» *Molecular Neurobiology*, 2012: Apr;47(2):537-51.
- Xiong, Y, et J Yu. «Modeling Parkinson's Disease in Drosophila: What Have We Learned for Dominant Traits?» *Frontiers in Neurology*, 2018: Apr 9;9:228. .
- Yamamoto, S, et ES Seto. «Dopamine dynamics and signaling in Drosophila: an overview of genes, drugs and behavioral paradigms.» *Experimental Animals*, 2014: 2014;63(2):107-19.
- Yang, W., E. Tiffany-Castiglioni, H.C. Koh, et I.H. Son. «Paraquat activates the IRE1/ASK1/JNK cascade associated with apoptosis in human neuroblastoma SHSY5Y cells.» *Toxicology Letters*, 2009: 191(2-3), Dec 15, pp. 203-210.
- Yang, W., et E. Tiffany-Castiglioni. «The bipyridyl herbicide paraquat induces proteasome dysfunction in human neuroblastoma SH-SY5Y cells.» *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 2007: 70(21), Nov, pp. 1849-1857.
- Yang, W., et E. Tiffany-Castiglioni. «Paraquat-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: involvement of p53 and mitochondria.» *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 2008: 71(4), 289-299.

- Zeng, XS, WS Geng, et JJ Jia. «Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment.» *ASN Neuro*, 2018: Jan-Dec; 10: 1759091418777438. .
- Zhao, J, S Yu, Y Zheng, H Yang, et J Zhang. «Oxidative Modification and Its Implications for the Neurodegeneration of Parkinson's Disease.» *Mol Neurobiol.*, 2017: Mar;54(2):1404-1418.
- Zheng, L., J. Marcusson, et A. Terman. «Oxidative stress and Alzheimer disease: the autophagy connection?» *Autophagy*, 2006: 2(2), Apr-Jun,pp. 143-145.